

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



EFFECTO DE LA ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO EN EL  
DESARROLLO ONTOGENÉTICO DE LA GALLETA DE MAR

*Dendraster excentricus*

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y  
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**LUVIA LOREI GARCÍA ECHAURI**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO, SEPTIEMBRE 2012

## **Efecto de la acidificación del medio en el desarrollo ontogenético de la galleta de mar *Dendraster excentricus***

### **Resumen**

El aumento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera está incrementando la temperatura media del planeta y disminuyendo el pH de los océanos. Los organismos que viven en esas condiciones no han experimentado cambios tan rápidos en el último millón de años. Este cambio climático y la acidificación del océano afectarán una gran variedad de procesos en los organismos marinos, entre los que se incluyen el intercambio gaseoso respiratorio, la calcificación, el balance metabólico y modificará aspectos fundamentales de su ciclo de vida como la reproducción, fertilización, desarrollo larvario y alimentación. En particular, al ser los estadios tempranos de desarrollo los más sensibles a cambios ambientales, incluyendo aumentos de concentración de CO<sub>2</sub> y temperatura, resulta fundamental entender el impacto que estas alteraciones tendrán en los diversos grupos que habitan el medio marino. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la disminución del pH, en los estadios larvales y en postlarvas recién metamorfoseados de la galleta de mar *Dendraster excentricus*. Para esto se cultivaron larvas de este equinodermo en tres condiciones de pH: 8.0, 7.7 y 7.5. Los escenarios se establecieron considerando de manera general las proyecciones del IPPC. En estas condiciones se evaluó la sobrevivencia larval, tamaño, forma, calcificación (estimado por el contenido de ceniza) y se cuantificaron las variaciones de expresión de la anhidrasa carbónica, como indicadora de la conversión de CO<sub>2</sub> en las distintas condiciones de pH experimentales para evaluar el efecto de su disminución en el desarrollo e integridad de los organismos. La sobrevivencia larval fue equivalente a lo largo del periodo experimental y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En cambio, si fue posible detectar cambios morfológicos, de contenido de ceniza y de expresión de anhidrasa carbónica en los distintos tratamientos. Para el caso de la morfología, las larvas de 4 y 6 brazos resultaron más pequeñas cuando fueron cultivadas en pH 7.5, y las larvas de 8 brazos fueron de mayor tamaño. Las larvas competentes fueron de tamaños similares en los diferentes tratamientos y en postlarvas las cultivadas en el pH 7.7 fueron las que menor tamaño alcanzaron. Hubo reducción en ceniza de las larvas cultivadas a pH más ácido en larvas de 4 a 8 brazos. En las competentes esta reducción solo se notó en el tratamiento intermedio a pH 7.7 y en postlarvas hubo un aumento de ceniza a pH 7.5. En la expresión de la anhidrasa carbónica hubo aumento en los estadios de 4 y 8 brazos pero en larvas competentes solo hubo diferencias en el tratamiento intermedio, con aumento de expresión de la anhidrasa carbónica. Las larvas en un medio con pH disminuido tratan de compensar la dificultad de calcificar aumentando la síntesis de la anhidrasa carbónica, pero la calcificación en estos organismos fue menor que en condiciones control, y forman un cuerpo más pequeño. En larvas competentes y postlarvas en pH 7.5 fueron similares al tratamiento control, pero en pH 7.7 tuvieron el mismo comportamiento que en los estadios anteriores.

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

EFFECTO DE LA ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO EN EL  
DESARROLLO ONTOGENÉTICO DE LA GALLETA DE MAR  
*Dendraster excentricus*

TESIS

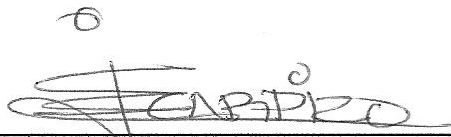
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS


PRESENTA

LUVIA LOREI GARCÍA ECHAURI

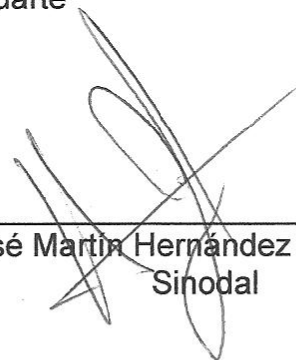
Aprobada por:



Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte  
Director de tesis



Dra. Tatiana Nenetzen Oliyares Bañuelos  
Sinodal



Dr. José Martín Hernández Ayón  
Sinodal

## **Agradecimientos**

Al Dr. Carpizo por su tiempo, atención y por guiarme durante la realización del trabajo, gracias por sus comentarios, sugerencias y analogías que lograron hacerme entender cómo escribir una tesis.

Muchas gracias a Tatiana por su gran apoyo en la realización del trabajo experimental, disponibilidad para ayudarme a resolver dudas y problemas y por su amistad.

Gracias a Martín por su amable disposición y por responder, con paciencia las dudas que tuve. Muchas gracias por sus sugerencias al trabajo y por los comentarios al escrito.

Gracias a los compañeros, y ex-compañeros de laboratorio por su apoyo y amistad, gracias a Dora, Raquel, Polo, Carlos, Paola, Claudia y Juan Antonio. Gracias por hacer del laboratorio un lugar cálido donde trabajar.

Gracias a todos los estudiantes que me ayudaron a realizar las mediciones de pH del agua de la bahía.

Muchas gracias a Ana y a Norma por ayudarme con las mediciones de la química del agua.

Gracias a Roberto Escobar y a Marco González por su ayuda en el laboratorio y por su apoyo para resolver los problemas que llegaron a surgir. Gracias a Teresa Viana por permitirme utilizar aparatos de su laboratorio.

Gracias a mi familia, a mis padres y a mi hermano por su apoyo, insistencia y ánimos.

Gracias a mis amigos que han estado presentes cuando los necesito, por ayudarme a distraerme y por hacer que estos años fueran de crecimiento tanto en la parte académica como personal.

Gracias a CONACyT por el apoyo económico con la beca No. 42337, al IIO y a la UABC por las instalaciones y por aceptarme en el posgrado.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
Justificación .....	24
Hipótesis .....	24
Objetivo general .....	24
Objetivos particulares .....	25
METODOLOGÍA .....	25
-Cultivo de larvas .....	25
-Tratamientos experimentales .....	26
-Monitoreo de pH .....	27
-Morfometría de las larvas .....	29
-Cenizas .....	32
-Extracción de RNA total .....	33
-PCR Tiempo Real.....	35
RESULTADOS.....	37
-Medición de pH de los cultivos .....	37
-Sobrevivencia de las larvas en cultivo.....	38
-Morfometría de las larvas .....	39
Larvas de 4 brazos.....	39
Larvas de 6 brazos.....	44
Larvas de 8 brazos.....	50
Larvas competentes .....	55
Postlarvas.....	57
-Cenizas .....	59

-PCR en Tiempo Real.....	64
DISCUSIÓN .....	69
CONCLUSIONES .....	77
Recomendaciones .....	78
Referencias.....	78

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Asociación entre la emisión de CO <sub>2</sub> y la acidificación del océano..	4
Figura 2. Desarrollo embrionario de la galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> desde la fertilización hasta gastrulación.	10
Figura 3. Desarrollo larval de <i>Dendraster excentricus</i> .	10
Figura 4. Esquema de mediciones realizadas.	31
Figura 5. Mediciones realizadas en larvas competentes de galleta de mar para los análisis de morfometría.	31
Figura 6. Mediciones realizadas a postlarvas de galleta de mar para análisis de morfometría.	32
Figura 7. Densidad de larvas total en los cultivos a pH 8.0, 7.7 y 7.5.	38
Figura 8. Ancho del cuerpo larval en la zona posterior (BWT) en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	39
Figura 9. Distancia entre la región posterior de la larva hasta el arco ventral (BLV) en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	40
Figura 10. Largo del cuerpo larval a la mitad del cuerpo (BW), en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	41
Figura 11. Suma de todas las mediciones realizadas en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	41
Figura 12. Longitud del brazo transversal izquierdo (LTR) en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	42
Figura 13. Suma de las medidas del largo del brazo postoral y brazo izquierdo (LPO+LBR), en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	43
Figura 14. Suma de mediciones esqueléticas (TSL) de larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	44
Figura 15. Ancho del cuerpo larval en la región posterior de la larva (BWT), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	45
Figura 16. Largo del cuerpo larval a la mitad del cuerpo (BW), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.	46

Figura 17. Suma de todas las mediciones realizadas en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	46
Figura 18. Distancia entre la región posterior de la larva hasta el arco ventral (BLV), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	47
Figura 19. Longitud del brazo transversal izquierdo (LTR) en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	48
Figura 20. Suma de las medidas del largo del brazo postoral y brazo transversal izquierdo (LPO+LTR), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	49
Figura 21. Suma de mediciones del esqueleto (TSL) de larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	49
Figura 22. Ancho de la región posterior de la larva (BWT), en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	50
Figura 23. Medición del Largo del cuerpo larval en la parte media (BW) en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	51
Figura 24. Distancia entre la parte posterior de la larva y hasta el arco ventral (BLV), en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	52
Figura 25. Suma de todas las mediciones realizadas en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	52
Figura 26. Longitud del brazo transversal izquierdo (LTR) en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	53
Figura 27. Suma de las medidas del largo del brazo postoral y brazo izquierdo (LPO+LBR), en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	54
Figura 28. Suma de mediciones del esqueleto (TSL) de larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH diferentes.....	54
Figura 29. Largo de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH.....	55
Figura 30. Ancho de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH.....	56
Figura 31. Suma de las mediciones del ancho y largo de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH.....	56
Figura 32. Medición del ancho de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH.....	57
Figura 33. Largo total de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH.....	58

Figura 34. Suma de las mediciones del ancho y largo de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH.....	59
Figura 35. Porcentaje de cambio de cenizas respecto al peso seco de larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH.....	60
Figura 36. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	61
Figura 37. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	62
Figura 38. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	63
Figura 39. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH. ....	63
Figura 40. Curva de aumento de detección del gen R18s al aumentar su concentración.. ....	65
Figura 41. Expresión relativa de la anhidrasa carbónica en larvas de 4 brazos .....	66
Figura 42. Expresión relativa de la anhidrasa carbónica en larvas de 8 brazos .....	66
Figura 43. Expresión relativa de la anhidrasa carbónica en larvas competentes. ....	67
Figura 44. Curva melt de anhidrasa carbónica y R18s en larvas de 4 brazos en 3 condiciones de pH .....	68
Figura 45. Curva melt de anhidrasa carbónica y R18s en larvas de 8 brazos en 3 condiciones de pH. ....	68
Figura 46. Curva melt de anhidrasa carbónica y R18s en larvas competentes en 3 condiciones de pH. ....	69

## **INTRODUCCIÓN**

Debido a la creciente actividad antropogénica, el planeta experimenta un aumento en la concentración de gases invernadero en la atmósfera, principalmente CO<sub>2</sub>. Estos gases atrapan calor evitando que se irradie al espacio, lo que ha tenido como resultado un creciente incremento en la temperatura media del aire en la atmósfera y en consecuencia, también un aumento en la temperatura media del mar. Se estima que el siglo pasado la temperatura del aire y del agua superficial aumentó entre 0.4-0.8°C. Estos aumentos de temperatura han ocasionado la expansión del mar por derretimiento de los polos y se estima que el nivel del mar aumenta 2 mm al año (IPCC 2007).

Además el CO<sub>2</sub> atmosférico es atrapado por los océanos, se mezcla con el agua liberando iones hidrógeno y cambia la concentración de iones necesarios para la calcificación (Feely et al. 2004). Al ir en aumento las emisiones a la atmósfera de este gas se espera que la disminución del pH continúe, lo que expondrá a los organismos marinos a medios cada vez más ácidos (Floch et al 2008). Esto afectará principalmente a los organismos calcificadores e indirectamente a los que se encuentran arriba de ellos en la cadena alimenticia. Los organismos que serán más vulnerables a los cambios producidos por la acidificación del océano serán los invertebrados marinos calcificadores, y se sabe que los estadios de vida tempranos son los más vulnerables (Raven et al. 2005). Gran parte de los invertebrados marinos presentan un estadio larval, entre ellos están los

equinodermos como la galleta de mar *Dendraster excentricus* que presenta una larva equinopluteus que es planctónica, es decir se desarrolla en la columna de agua, y que forma un esqueleto de calcita de alto magnesio (Beniash et al. 1997). Esta larva forma un rudimento que posteriormente conformará el cuerpo juvenil de la galleta de mar. Al ser un organismo calcificador y necesitar mantener la homeostasis estas larvas podrían ser vulnerables ante cambios de pH en el medio. Debido a esto se decidió investigar cómo podría afectar la acidificación del océano a las diferentes etapas del desarrollo embrionario y larvario de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.

### **Antecedentes**

El aumento de la temperatura en el océano ha ido acompañado de aumentos en las presiones parciales de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y como resultado se ha incrementado la absorción de CO<sub>2</sub> en el océano. De acuerdo con la "U.S Energy Information Administration", durante el año 2006 las emisiones mundiales de CO<sub>2</sub> por consumo y quema de combustibles fósiles fueron de 29,195.42 millones de toneladas métricas y se estima que un tercio de estas emisiones de CO<sub>2</sub> son atrapadas por el agua de mar (Caldeira y Wickett 2003). Comparado con épocas pre-industriales el pH del mar ha disminuido en 0.1 unidades y de acuerdo a modelos de escenarios futuros, en 100 años habrá disminuido otras 0.4 unidades (Caldeira y Wickett 2003). El CO<sub>2</sub> al mezclarse con el agua de mar forma ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), que se disocia en iones

bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) liberando iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) (Sabine et al. 2004). El aumento de iones hidrógeno trae consigo la disminución en el pH del mar. El carbón inorgánico disuelto (CID), es la suma de todas las especies de carbón inorgánico en solución, esto incluye el dióxido de carbono, el ácido carbónico, el anión bicarbonato y el carbonato. Con la acidificación del océano aumenta la concentración del ión bicarbonato y disminuye la concentración del ión carbonato, esta disminución afecta la tasa de calcificación de invertebrados marinos (Feely et al. 2004). Al aumentar los niveles de  $\text{CO}_2$  acuoso y disminuir los niveles de  $\text{CO}_3^{2-}$ , trae como consecuencia una disponibilidad menor de iones carbonato haciendo energéticamente más difícil la calcificación biológica que requiere de estos iones para la biomineralización, siendo un proceso fundamental en una gran variedad de organismos marinos (Orr et al. 2005); asimismo, los horizontes de saturación de aragonita y calcita se harán más someros facilitando la disolución del carbonato de los invertebrados marinos calcificadores. La cantidad de  $\text{CO}_2$  disuelto en agua, así como la temperatura, determinan la estabilidad de la calcita y aragonita (Guinotte y Fabry 2008). El estado de saturación del carbonato de calcio se representa por medio de la omega aragonita ( $\Omega_{\text{arag}}$ ) y omega calcita ( $\Omega_{\text{cal}}$ ). Cuando la  $\Omega_{\text{arag}}$  y la  $\Omega_{\text{cal}}$  es mayor a 1 se favorece la formación de conchas y esqueletos, y cuando es menor a 1 la calcificación es limitada y se favorece la disolución de  $\text{CaCO}_3$  (Feely et al. 2002).

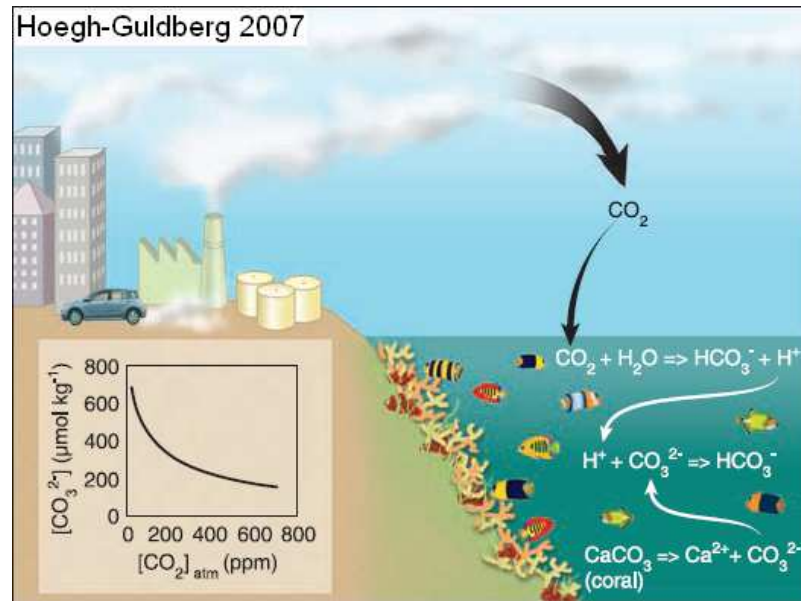


Figura 1. Asociación entre la emisión de CO<sub>2</sub> y la acidificación del océano. Aproximadamente una tercera parte del CO<sub>2</sub> liberado a la atmósfera es absorbido por el océano y al mezclarse con el agua produce ácido carbónico, que libera un protón que se combina con un ión carbonato. Esto disminuye la concentración del carbonato utilizado en la calcificación de organismos marinos. Modificado de Hoegh-Guldberg (2007).

Estos cambios de concentración de CO<sub>2</sub> son más rápidos a los que se han visto en la historia de la Tierra en los últimos 800,000 años y los organismos marinos se verán expuestos a condiciones de pH y temperatura a los que no se han enfrentado en épocas recientes (Floch et al. 2008). En forma paralela, en el mar el pH ha tenido variaciones a lo largo de los años como consecuencia del cambio climático. A escala regional, también se presentan variaciones temporales, ocasionadas por eventos de surgencias costeras, producidas por movimientos de masa de agua de profundidad hacia la superficie ocasionados por vientos; esto ocurre en el hemisferio norte, donde los vientos mueven las

masas de agua hacia el oeste, y en el hemisferio sur hacia el este por la fuerza de Coriolis (Rykaczewski y Checkley 2008).

La costa del Pacífico Norte de la península de Baja California es influenciada por aguas de la Corriente de California, la cual le aporta aguas frías provenientes del norte. Debido a la dirección prevalente de los vientos del noroeste, las surgencias se presentan en la costa oeste de Estados Unidos y México. La presencia de estas surgencias, transporta a la superficie costera aguas profundas, las cuales son frías y ricas en nutrientes. Una característica particular de esta agua es su pH menor a las aguas superficiales, las cuales se encuentran en mayor equilibrio con la atmósfera. Con el cambio climático se espera que las surgencias aumenten de frecuencia al aumentar el gradiente de presión entre la tierra y el mar (Bakun 1990). En Pacífico Norte los horizontes de saturación de la aragonita son los más someros del planeta (Feely et al. 2004) y desde la época preindustrial se han hecho entre 50 y 100 metros más someros. Se ha visto que las surgencias traen a la superficie aguas corrosivas subsaturadas con respecto a aragonita, lo que expone a los organismos marinos a estas aguas corrosivas (Feely et al. 2008). También existe fluctuación en el pH del agua costera del Pacífico norte a escalas cortas (de algunos días) de hasta 0.67 unidades (Yu et al. 2011), esto nos dice que actualmente los organismos que habitan la zona costera experimentan variaciones amplias de pH y que los modelos mundiales no reflejan lo que pasa a escalas locales cercanas a la costa.

Además existen variaciones temporales, teniendo el carbonato de calcio niveles de saturación más someros en el verano y otoño que durante el invierno y principios de la primavera (Alin et al. 2012).

La sinergia del aumento de temperatura y disminución del pH del mar muestran diferentes efectos en invertebrados marinos dependiendo del estadio de vida estudiado. Los gametos y la fertilización de diversas especies parecen presentar una tolerancia variable al aumento de temperatura previsto para el año 2100, pero las larvas podrían ser más sensibles a la acidificación y los juveniles tempranos podrían ser vulnerables a disolución del esqueleto, aunque el aumento de temperatura podría disminuir el impacto negativo (Gibson et al. 2011).

En escenarios de acidificación extrema (pH 7.2 a 6.5) se espera una pérdida de biodiversidad y función de los ecosistemas por pérdida de organismos sensibles a estos cambios (Kroeker et al. 2011). El aumento de temperatura tendrá efectos sobre la fenología de organismos (Edwards y Richardson 2004), fisiología, morfología y conducta y estos efectos variarán en relación con sus diferentes etapas de desarrollo (Harley et al. 2006).

El aumento de temperatura tiene un efecto estimulante del metabolismo hasta llegar a niveles críticos que pasan rápidamente a niveles letales (Gibson et al. 2011). Algunos de los efectos fisiológicos negativos del aumento de temperatura son daños de proteínas, cambios en la fluidez de membranas y mal funcionamiento de los órganos (Hochachka y Somero 2002), y el efecto es más

acentuado en los organismos que viven cerca de su límite de tolerancia térmica (Somero 2002).

El calentamiento del océano también está implicado en muertes masivas, aumento de enfermedades, hipoxia, blanqueamiento de corales, invasión de especies, cambios fenológicos en la dinámica de redes alimenticias planctónicas, aumento de costos metabólicos y limitación fisiológica en el transporte de oxígeno (Gibson et al. 2011).

Entre los organismos marinos se prevé que los calcificadores serán los más afectados por la reducción en la disponibilidad de elementos necesarios para la calcificación, y los estadios tempranos son los más sensibles a aumentos de concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto, lo cual se presume tendrá repercusiones en el tamaño poblacional y estructura de las comunidades (Raven et al. 2005).

En el caso de equinodermos, las larvas forman espículas durante el desarrollo embrionario, y son estructuras formadas en un principio por carbonato de calcio amorfo y se va reemplazando por carbonato de calcio y carbonato de magnesio ( $\text{CaCO}_3$  y  $\text{MgCO}_3$ ) (Beniash et al. 1997). Estas estructuras proveen de soporte a los brazos larvales en formación, sitio de inserción y palanca para sus músculos (Mortensen 1931), ayudan a resistir deformaciones de la larva al alimentarse (Strathmann 1971) y ayudan en la orientación vertical pasiva de la larva (Pennington 1985). También se ha sugerido que protegen a la larva de depredadores (Emlet 1983).

Las espículas se empiezan a formar en la gástrula tardía a partir de células mesenquimales primarias (PMCs por sus siglas en inglés), las cuales se originan de los cuatro micrómeros que salen del polo vegetal del embrión. Las PMCs acumulan y secretan calcita, tomada del calcio del agua de mar (Nakano et al. 1963). Las PMCs forman sincitios por donde se va formando la espícula. La anhidrasa carbónica (CA) se expresa en las PMCs precursoras de brazos larvales, en la futura localización del crecimiento de los brazos postorales (Love et al. 2007). La CA es una enzima que participa en la depositación de  $\text{CaCO}_3$  en las espículas de las larvas de equinodermos (Mitsunaga et al. 1986). Una de sus funciones principales, es catalizar reacciones de dióxido de carbono con agua, movilizar dióxido de carbono a carbonato y bicarbonato, con las implicaciones que esto tiene para el balance ácido-base, transporte iónico y calcificación a nivel celular y tisular (Burnett et al. 1985).

La galleta de mar (*Dendraster excentricus*), habita costas abiertas desde la zona intermareal y hasta profundidades entre 40 y 90 metros, y su distribución va desde las costas del sur de Alaska hasta las costas de Baja California Sur (Mooi 2007). Es un equinoideo irregular que presenta simetría pentarradial y pertenece a la familia Dendrasteridae. Se entierra en la arena donde recoge partículas en suspensión, diatomeas y fragmentos de algas con los pies ambulacrales y los pasan hasta la boca. La galleta de mar habita en el fondo de bahías arenosas, estuarios y en la zona externa de costas arenosas. Su orientación en la arena depende del movimiento del agua, si hay poco

movimiento se mantienen en zonas someras, se mueven constantemente y tienen una posición horizontal. En zonas con movimiento moderado de agua los adultos tienen poco movimiento y presentan una posición inclinada en la arena, y en zonas con alto movimiento de agua se mantienen enterradas en la arena. Las poblaciones se distribuyen paralelas a las costas, donde los juveniles al crecer se van adentrando a zonas más profundas. Tienen como predadores a peces, cangrejos y estrellas de mar (Merrill y Hobson 1970). En el Estero de punta banda, en Ensenada, Baja California, *Dendraster excentricus* presenta dos picos reproductivos, uno en el inicio de primavera y otro en el verano, aunque se pueden obtener gametos viables durante todo el año (Olivares-Bañuelos et al. 2012). Las galletas de mar son dioicos y liberan sus gametos al mar, donde ocurre la fertilización (Fig. 2). Presentan un desarrollo larvario que incluye una forma larval denominada equinopluteus (Fig. 3) que se distribuye en la columna de agua en profundidades no mayores a 6 metros (Pennington y Emler 1986). El desarrollo larvario culmina con el estadio de competencia, a partir del cual las larvas son capaces de responder a estímulos para metamorfosearse.

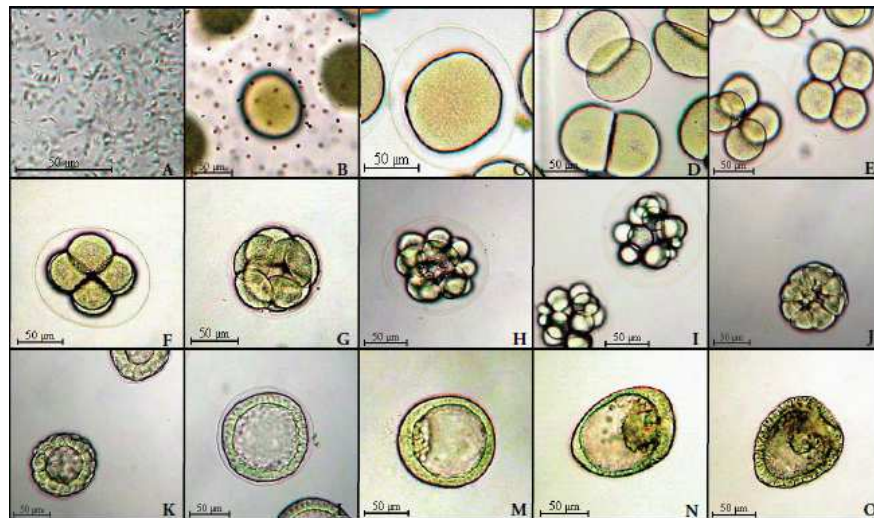


Figura 2. Desarrollo embrionario de la galleta de mar *Dendraster excentricus* desde la fertilización hasta gastrulación. A: espermatozoides, B: ovocitos, C: ovocitos fertilizados, D: primera división celular, E: segunda división celular, estadio de 4 células, F: estadio de 8 células, G: estadio de 16 células, H: estadio de 32 células, I: estadio de 64 células, J: estadio de 128 células, K: estadio de blástula temprana, L: estadio de blástula, M: estadio de blástula mesenquimal, N: estadio de gástrula temprana, O: gástrula. Tomado de Olivares-Bañuelos et al. 2012.



Figura 3. Desarrollo larval de *Dendraster excentricus*. A: estadio de 4 brazos, B: estadio de 6 brazos, C: estadio de 8 brazos, D: estadio de competencia, E: eversión de pies ambulacrales, F: Postlarva. Las flechas blancas indican el estómago larval, las flechas negras señalan espículas y la estrella (\*) indica el rudimento. Tomado de Olivares-Bañuelos et al. 2012.

En este trabajo se presentan los resultados de experimentos sobre el efecto de la disminución de pH en larvas de galleta de mar *Dendraster excentricus*. Lo anterior con el objetivo de documentar el posible efecto de la acidificación del océano en el desarrollo de este organismo calcificador que habita zonas intermareales y submareales de bahías protegidas. Se utilizó a este organismo por su parentesco con el erizo morado que tiene su genoma secuenciado, por presentar estadios larvales con calcificación, por tener una amplia distribución, por su facilidad de cultivo y para dar continuidad a otros experimentos realizados de choque térmico realizados con esta misma especie.

El estudio del efecto del cambio climático sobre organismos marinos ha tenido diferentes aproximaciones y en ellas se ha evaluado el efecto del aumento de temperatura, aumento de salinidad y disminución de pH en diferentes organismos y a diferentes niveles. Los estudios van desde experimentos con gametos (Havenhand y Schlegel 2009; Havenhand 2008; Byrne et al. 2009; Morita et al. 2010; Reuter et al. 2011), larvas (Kurihara y Shirayama 2004; Dupont et al. 2008; O'Donnell et al. 2008; Clark et al. 2009; Stumpp et al. 2011), juveniles (Albright et al. 2012), en organismos adultos (Michaelidis et al. 2005; Spicer et al. 2007), en mesocosmos (Kuffner et al. 2007, Edmunds et al. 2012) y hasta existen observaciones de cambios poblacionales en el campo (Porzio et al. 2011).

Los resultados de estas investigaciones, han mostrado observaciones contrastantes. Por ejemplo, en muestreos realizados de algas creciendo en

aguas con gradiente de concentración de CO<sub>2</sub> disuelto, por la presencia de chimeneas volcánicas, se ha encontrado cambios y encontraron disminución en la diversidad algal al disminuir el pH, tanto de algas calcáreas como no calcáreas (Porzio et al. 2011). También se ha encontrado disminución en el reclutamiento y crecimiento de algas coralina al estar en aguas a pH 7.91 durante 11 días (Kuffner et al. 2007).

En juveniles del pez *Acanthochromis polyacanthus* expuestos a pH disminuido (entre 7.95 y 7.83) no se encontró ningún efecto sobre crecimiento, mortalidad, calcificación o simetría (Munday 2011), por otra parte en adultos del Ofiuroideo *Amphiura filiformis*, al someterlos a pH de 8.0, 7.7, 7.3 y 6.8 no se encontró disminución en la calcificación y presentaron un mayor porcentaje de calcio en la regeneración de brazos, pero con masa muscular disminuida. En este mismo trabajo se encontró un aumento en el consumo de oxígeno por parte de los organismos expuestos a disminución de pH (Wood et al. 2008). En cambio en larvas del ofiuroideo *Ophiothrix fragilis* al ser expuestas a pH 7,9 y 7.7 durante 8 días mostraron un desarrollo retrasado y aumento en la mortalidad que se manifestó al día 7 de exposición (Dupont et al. 2008). Asimismo en adultos del cangrejo *Carcinus maenas* y la estrella de mar *Asterias rubens*, así como su presa, el mejillón *Mytilus edulis* al ser expuestos durante 10 semanas a un medio a pH ~7.25 y los autores encontraron que las conchas del mejillón fueron más frágiles, la estrella de mar creció más lento y las estrellas de mar y los cangrejos se alimentaron menos (Appelhans et al. 2012). Por otra parte en

juveniles y adultos del mejillón *Mytilus edulis* y del ostión *Crassostrea gigas* expuestos a 2 o 3 incubaciones diarias a un pH entre 8.13 y 7.43 la tasa de calcificación disminuyó linealmente con el aumento de  $p\text{CO}_2$  (Gazeau et al. 2007). En el abulón *Haliotis kamtschatkana* en larvas cultivadas a pH 7.81 se encontró disminución en la sobrevivencia larval y desarrollaron conchas con deformidades y en algunas ocasiones no formaron conchas (Crim et al. 2011). En cuanto a gametos, en el copépodo *Calanus glacialis* se ha visto que la disminución de pH a 7.6 6.9 no tiene efecto en la producción de ovocitos (Weydmann et al. 2012). Asimismo, en el coral *Acropora digitifera* la disminución del pH a 7.74 ocasionó una disminución en la movilidad espermática en 30% (Nakamura y Morita 2012).

Otros estudios en el erizo *Strongylocentrotus droebachiensis* la fecundidad de las hembras disminuyó 4.5 veces al estar durante 4 meses a pH 7.7 durante temporada de acondicionamiento reproductivo; sin embargo cuando la aclimatación fue de 16 meses no hubo ningún cambio, explicado por los autores como que los organismos se aclimataron por completo a los 16 meses, pero en los 4 meses de exposición no lograron aclimatarse; en ambas duraciones de acondicionamiento el tamaño de los ovocitos no tuvo diferencias con respecto al tratamiento control (Dupont et al. 2012).

Otros estudios realizados para evaluar el éxito de fertilización, han mostrado en el erizo *Helicidaris erythrogramma* que utilizando tratamientos de pH entre 7.5 y 8.2 a 20, 24 y 26°C, siendo 20°C y pH 8.2 las condiciones control, el aumento

de temperatura, y no la disminución de pH fue la que determinó el nivel de éxito de la fertilización y la viabilidad de los estadios tempranos de desarrollo (Byrne et al. 2009). Otros estudios en este mismo erizo encontraron que con disminuciones de 0.4 unidades de pH hubo una disminución en la movilidad y velocidad espermática así como reducción en el éxito de la fertilización (Havenhand, 2008b). Ambos trabajos utilizaron metodologías similares, pero utilizaron densidades espermáticas diferentes; de  $1 \times 10^3$ /ml en el primer trabajo y de  $1 \times 10^5$ /ml en el segundo. A pesar de trabajar con mayor densidad de espermatozoides encontraron que al disminuir el pH a 7.7 el porcentaje de fertilización fue significativamente menor a los encontrados en los tratamientos control (Havenhand, 2008b).

En contraste, en el ostión japonés *Crassostrea gigas* se vio que la disminución del pH en 0.35 unidades no afectó la cinética de fertilización ni la movilidad espermática (Havenhand y Schlegel, 2009), lo que resulta contrastante con un trabajo realizado por el mismo investigador, el cual encontró disminución en la fertilización por disminución de pH en *Heliocidaris erythrogramma*. La diferencia en los resultados parece estar relacionada con la fisiología y cinética de la fertilización, particular de cada una de estas especies.

En el erizo *Paracentrotus lividus* se encontró que disminuciones de pH hasta 7.0 no afectaron el éxito de fertilización (Martin et al. 2011). Por otra parte, en los erizos *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Echinometra mathaei* se encontró una disminución en el éxito reproductivo por disminución de pH a partir de 7.8, así

como un retraso en el desarrollo y alteraciones en la morfología y tamaño de las larvas pluteus dependiente de la magnitud en la disminución del pH (Kurihara y Shirayama, 2004). En este trabajo los autores utilizaron escenarios de pH desde el control a 8.2 hasta 6.8 y aunque reportan disminuciones en porcentaje de fertilización no fueron significativamente diferentes, con porcentajes de disminución de alrededor del 5% a pH 7.6 y cerca de 20% a pH 7.4. En el erizo *Strongylocentrotus franciscanus* al disminuir el pH a 7.81 y 7.55 a partir de un pH cercano a 8.0, se encontró un incremento en la limitación de espermatozoides disponible para la fertilización. Los autores utilizaron 9 concentraciones de espermatozoides que oscilaron entre  $1 \times 10^1$  y  $1 \times 10^7$  por mililitro y reportan que para alcanzar el máximo porcentaje de fertilización al reducir el pH se necesitaba cada vez de una mayor concentración de espermatozoides. También encontraron reducción en la eficiencia del bloqueo de la polispermia (calculado a partir de su tiempo de inicio) al disminuir el pH a 7.55 unidades (Reuter et al. 2010).

Existen muchas otras investigaciones sobre el efecto de la acidificación del océano en el éxito de fertilización en organismos marinos con resultados variados (ver Parker et al. 2009, Morita et al. 2010, Byrne et al. 2010a, Byrne et al. 2010b, Frommel et al. 2011).

La diferencia entre resultados de los trabajos podría deberse a diferencias interespecíficas o por el uso de diferentes metodologías o infiriendo el éxito de fertilización a partir de diferentes parámetros, pero la mayoría de ellos coinciden

en la disminución de la movilidad del esperma en condiciones de acidificación del océano.

En cuanto a desarrollo larval en los erizos *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Echinometra mathaei* se ha analizado el porcentaje de embriones que lograban pasar del estadio de una célula a dos y cuatro células y realizaron mediciones del tamaño larval (talla del cuerpo, talla total y longitud del brazo postoral) y en ambos casos no encontraron diferencias significativas hasta que las larvas estuvieron sometidas a condiciones experimentales con pH 6.8, pero si encontraron una tendencia a la disminución de estos parámetros al reducirse el pH a pesar de que las diferencias no fueron significativas (Kurihara y Shirayama 2004) y considerando además, que solo se trabajaron en estadios tempranos de desarrollo (hasta 3 días después de la fertilización). Por otra parte, en trabajo de O'Donnell et al. (2010) se cultivaron larvas a pH 7.93, 7.87 y 7.78 y realizaron 9 mediciones larvales y encontraron que las larvas en el pH menor fueron más pequeñas y triangulares que en el control a las 48, 53 y 70 horas después de la fertilización, teniendo brazos más cortos y menor capacidad de capturar alimento.

En erizos de *Strongylocentrotus droebachiensis* aclimatados por 4 meses a pH 7.7 entre 5 y 9 veces menos de los ovocitos fecundados llegaban a juveniles, pero durante el desarrollo larvario no se detectó ningún efecto sobre el asentamiento. Sin embargo, si la aclimatación de los adultos era de 16 meses no se encontró cambios en la mortalidad de las larvas durante las dos primeras

semanas después de la fertilización, lo anterior podría ser debido a que los ovocitos producidos por adultos aclimatados logran mantener una buena calidad aun en condiciones de pH disminuido y los efectos negativos de la acidificación no se manifiestan tan temprano en el desarrollo. En juveniles de esta misma especie expuestos a pH 7.7 entre 46 y 67% sobrevivieron 3 meses después de la metamorfosis, pero cuando se expusieron a pH 7.7 desde larvas la mortandad de juveniles fue de 95% (Dupont et al. 2012). Podría ser que el rudimento no se esté logrando formar bien o por el incremento energético originado por el cambio de estadio, entonces el porcentaje de larvas expuestas a bajos niveles de pH que lleguen a juveniles no indica que sean capaces de llegar a adultos porque hay que medir otros factores como la calidad del rudimento, expresión de proteínas de estrés o de metabolismo energético que nos den un mejor panorama de las condiciones con las que estos organismos llegan a los diferentes estadios de su desarrollo. En forma paralela, otros estudios han abordado el efecto sinérgico de varios factores que se están alterando como consecuencia del cambio climático. Se ha visto que la sinergia entre la disminución del pH y el aumento de temperatura disminuyen la capacidad de desarrollar una respuesta fisiológica por parte de larvas del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*, evaluada ésta mediante la disminución de la transcripción de la proteína del shock térmico 70 (Hsp70, por sus siglas en inglés), la cual está involucrada en la respuesta al estrés causada por cambios en la temperatura (O'Donnell et al., 2008).

Por su parte, en el erizo *Tripneustes gratilla* se expuso a larvas a pH 8.15 (control), 7.8 y 7.6 y a 24 y 27°C durante 5 días, encontrando reducción en el crecimiento larval y un esqueleto más corto. En este estudio, el aumento de temperatura de 3 grados estimuló el crecimiento en todos los tratamientos de pH y disminuyó el efecto negativo de la acidificación. La reducción de pH también disminuyó la calcificación, estimada en este estudio por la longitud de las espículas (Sheppard-Brennand et al. 2010). Aunque en estudios de un solo factor en *Arachnoides placenta* el aumento de 3°C disminuyó el porcentaje de larvas que llegaban a metamorfosis y produjo larvas y juveniles de menor tamaño (Chen y Chen 1992).

En juveniles del gasterópodo *Strombus luhuanus* y los erizos *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Echinometra mathaei*, se les expuso a condiciones de pH de 7.94 como control y 7.89 como pH acidificado durante 6 meses, y con esta pequeña disminución encontraron disminución en el crecimiento, medido en los erizos por cambio de peso y en el gasterópodo por peso y tamaño de la concha. Las diferencias se empezaron a notar a partir de la semana 14 y al final del experimento los erizos presentaron testas frágiles y los investigadores adjudican los cambios de peso por la disminución del ancho de las testas. En los gasterópodos disminuyó la altura de las conchas y su peso, por lo que no solo se afectó la calcificación de la concha, sino su fisiología. Los erizos fueron más sensibles a la disminución de pH que los gasterópodos, aparentemente por tener mayor contacto con el agua del medio por su madreporita y por tener testa

de calcita de alto magnesio, mientras que la concha del gasterópodo está hecha de calcita, que es menos soluble que la calcita de alto magnesio (Shirayama y Thornton 2004).

En otros estudios que han incluido desde fertilización hasta etapas juveniles, se ha reportado que en el abulón *Haliotis coccoradiata* y el erizo *Heliocidaris erythrogramma* en condiciones de 2 y 4 grados de aumento de temperatura y a pH 7.6 y 7.8 resultaron en larvas sin concha (en el caso de los abulones) y juveniles anormales, siendo el abulón el más sensible pero sin sinergia entre los dos factores. En el erizo el aumento de temperatura de 2 grados disminuyó el grado de afectación por disminución del pH, como lo reportan Sheppard-Brennand et al. (2010); sin embargo, en este mismo estudio se reporta que el aumento de 4 grados de temperatura fue mayor a la tolerancia térmica, y la disminución del pH produjo cada vez menos espinas en los juveniles (Byrne et al. 2011).

Otro trabajo reciente, en donde se expuso a juveniles de 175 días del erizo *Lytechinus variegatus* durante 89 días a condiciones de pH 8.1 (control) y 7.96 y 7.83 los autores reportan que a menor pH los organismos pesaron menos y esto fue acompañado de pérdida de la integridad estructural en las espinas; estas diferencias fueron encontradas hasta después del día 53 del tratamiento (Albright et al. 2012). Un aumento de temperatura que no sobrepase el límite de tolerancia podría reducir los efectos negativos de la acidificación del océano en

la galleta de mar, que se puede deber al aumento de actividad metabólica (Sheppard-Brennand et al 2010).

En cuanto a la calcificación se ha reportado que en la almeja *Mercenaria* sp., juveniles con concha entre 0.39 y 2.9 mm de alto, expuestos durante 8 horas a pH 8.02, 7.64 y 7.41 la tasa de calcificación disminuye en todos los tamaños pero es menor entre más pequeñas son las conchas, ocasionando en ellas disolución neta. Los cambios de calcificación se midieron por el método de anomalía de alcalinidad donde se relacionó la disminución de alcalinidad con un incremento de  $\text{CaCO}_3$  en la concha (Waldbusser et al. 2010).

En otras investigaciones, encaminadas a medir el posible efecto de la acidificación a nivel de comunidad, se cuantificó el efecto en la calcificación en 18 especies del bentos marino, incluyendo crustáceos, cnidarios, equinoideos, rodofitas, clorofitas, gasterópodos, bivalvos y anélidos, exponiéndolos durante 60 días a condiciones de 2, 3 y hasta 10 veces mayor de  $p\text{CO}_2$  comparado con niveles preindustriales. En el tratamiento 10 veces mayor de  $p\text{CO}_2$  se encontró disminución de la calcificación neta, y en 6 de las especies incluidas hubo disolución neta de la concha en el tratamiento con  $p\text{CO}_2$  más alto (las especies afectadas fueron: *Eucidaris tribuloides*, *Mercenaria mercenaria*, *Mya arenaria*, *Strombus alatus*, *Littorina littoria* y *Urosalpinx cinerea*). En 4 especies hubo incremento en la calcificación neta en los escenarios intermedios de  $p\text{CO}_2$  con disminución en el escenario más alto (incluyendo *Crepidula fornicata*, *Arbacia punctulata*, *Neogoniolithon* sp y *Oculina arbuscula*). En el cangrejo *Callinectes*

*sapidus*, el camarón *Penaeus plebejus* y la langosta *Homarus americanus* la calcificación fue mayor en el escenario de  $p\text{CO}_2$  mayor y en *Mytilus eludis* los altos niveles de  $p\text{CO}_2$  no tuvieron efecto en la calcificación. La calcificación fue determinada por el peso de flotación y por el peso seco de los organismos (Ries et al. 2009).

En varias especies de erizo se ha reportado erosión en sus espículas, con índices de calcificación y crecimiento disminuido al ser expuestos a rangos de pH entre 6 y ambiental (8.1) observado esto por micrografía electrónica de barrido (Clark et al. 2009). En este trabajo encontraron que la sobrevivencia es afectada solo debajo del pH 7.0 y también encontraron disminución en el tamaño, pero no en la forma de las larvas, a diferencia de los estudios mencionados anteriormente como el de Kurihara y Shirayama (2004) y O'Donnell et al. (2010); sin embargo se debe considerar que estos últimos trabajos se realizaron con especies diferentes de erizo a la que fue utilizada en el trabajo de Clark et al. (2009).

En la mayoría de los casos la acidificación tiene un efecto negativo en la calcificación, la cual se ha medido por medio de diferentes metodologías, algunas más indirectas que otras. En el presente estudio se aproxima por mediciones de expresión genética, cantidad de ceniza y longitud del esqueleto larval para tener una mejor idea del efecto que pudiera tener condiciones de acidificación en la calcificación de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.

Otra manera de valorar el efecto de la variación de factores ambientales, como pH y temperatura, es mediante la evaluación de los cambios en la expresión de genes involucrados en los procesos que se presupone son afectados. Los estudios de transcriptomas (conjunto de moléculas de RNA sintetizados por una o más células) nos permiten evaluar la plasticidad que tienen los organismos para modificar sus tasas de transcripción para ajustarse a cambios externos (Somero 2011).

En estudios recientes, se han evaluado cambios en expresión de genes en pólipos del coral *Acropora millepora* al ser expuestos por 8 horas a pH 7.96 y 7.86. Se encontró supresión del metabolismo y aumento de la síntesis de matrices extracelulares orgánicas; no hubo cambio en la expresión de proteínas involucradas con transporte iónico, mientras que la anhidrasa carbónica tuvo una expresión disminuida. También hubo una combinación de aumento y disminución en la expresión de algunas galaxinas, proteínas ácidas secretadas, SCRiPs (proteínas pequeñas ricas en cisteína) y otros genes exclusivos de corales. Esto sugiere diferentes roles en la calcificación de estas proteínas.

En el trabajo de O'Donnell et al. (2010) además de las evaluaciones morfológicas, los autores analizaron cambios en la expresión genética por medio de microarreglos y encontraron disminución en la expresión de genes relacionados con metabolismo energético y biomineralización y un aumento en la expresión de genes involucrados con regulación de iones y rutas de balance ácido-base. Resultados similares fueron reportados por Todgham y Hofmann

(2009) quienes encontraron una disminución en la expresión de genes involucrados con la calcificación; en este caso, los autores manejaron cultivos a pH 8.01 como control y 7.96 y 7.88 como condiciones acidificadas. Ambos trabajos estudiaron larvas de erizo durante sus estadios tempranos, pero utilizaron diferentes especies de erizo. En contraste otros autores reportan un aumento en la expresión de genes involucrados en la calcificación, cuando se expusieron larvas en cinco niveles de pH diferentes desde 8.1 a 7.0 durante 3 días, a partir de la fertilización (Martin et al. 2011).

También se ha reportado en el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* un aumento en la expresión de genes metabólicos, una disminución en la expresión de genes relacionados con la biomineralización por la disminución del pH y un retraso en el desarrollo de las larvas en cultivos a pH 7.7 (Stumpp et al. 2011).

Son muchos los genes involucrados con la calcificación y con el transporte de iones que podrían cambiar su expresión como consecuencia de la acidificación del océano y estos genes podrían variar su respuesta en diferentes organismos, en este trabajo se eligió trabajar con la anhidrasa carbónica para comparar su expresión con los niveles de ceniza y morfometría obtenidos para encontrar alguna relación.

### **Justificación**

Los estadios tempranos de desarrollo de invertebrados marinos son los más sensibles a cambios ambientales y el estudio de ellos nos permitirán conocer en qué forma los posibles escenarios de cambio climático van a afectar a las poblaciones marinas. Lo anterior resulta fundamental para estimar y evaluar posibles cambios en los ecosistemas. La galleta de mar representa a un organismo que es de fácil obtención, y no está sujeto a explotación, por lo que sus poblaciones pueden resultar un buen indicador de la salud de ecosistemas costeros.

### **Hipótesis**

La disminución del pH del medio afectará el desarrollo de *Dendraster excentricus* retrasando el desarrollo larval y modificando su respuesta fisiológica ante el estrés.

### **Objetivo general**

Documentar el efecto que tiene la disminución del pH en el desarrollo larvario de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.

### **Objetivos particulares**

- Analizar el efecto de la disminución del pH en la sobrevivencia de larvas de la galleta de mar de 4, 6 y 8 brazos, así como en larvas competentes y postlarvas recién metamorfoseadas
- Evaluar la proporción de cenizas en larvas cultivadas en 3 condiciones de pH
- Evaluar el efecto en la morfometría de larvas cultivadas en 3 condiciones de pH
- Cuantificar la expresión de anhidrasa carbónica en larvas de galleta de mar de 4, 6 y 8 brazos, así como en larvas competentes y postlarvas recién metamorfoseadas en diferentes condiciones de pH

### **METODOLOGÍA**

#### **-Cultivo de larvas**

Se colectaron 47 organismos adultos de galleta de mar en la bahía aledaña al hotel Coral y Marina, zona llamada Playitas en Ensenada, Baja California (31°51'54"N 116°39'42"W). Los ejemplares adultos se mantuvieron en peceras a 17°C con arena, donde se dejaron aclimatar por un mínimo de 2 días antes de inducir al desove. Se indujeron los desoves por medio de inyecciones intracelómicas de 300 µl de KCl 0.5M de acuerdo con lo descrito por Strathmann (1987). Se recolectaron los gametos para realizar conteos de densidad y revisar su calidad. Los organismos se colocaron con el poro genital

en contacto con el agua de mar, en frascos de vidrio con 30 ml de agua de mar filtrada e irradiada con UV (AMF). Los espermatozoides y los ovocitos liberados por los adultos, se dejaron en los frascos para posteriormente llevar a cabo la fertilización.

Para estimar el número de gametos se tomaron alícuotas de 50µl para realizar conteos de ovocitos mediante observaciones en el microscopio estereoscópico Zeiss® stemi 2000 C y de 10µl para el conteo de espermatozoides, estos últimos con ayuda de un hematocitómetro. Se eligieron 5 parejas de machos y hembras que presentaron una buena cantidad, suficiente para los tratamientos experimentales y con buena calidad de gametos, esperma con buena movilidad y ovocitos de apariencia madura. Cada pareja se utilizó por separado para los 3 ensayos de pH. Los cultivos se mantuvieron en recipientes de 4.5 L con una densidad máxima de 4 larvas/ml a 15°C. Se alimentaron con 20 ml de cultivo de *Rhodomonas* sp. (con concentración final en el cultivo de 50 células/ml) desde gástrula hasta 6 brazos; a partir de ese estadio se incrementó el alimento a 35 ml (87.5 células/ml). La metamorfosis fue espontánea.

#### **-Tratamientos experimentales**

Se realizaron fertilizaciones de galleta de mar en 3 condiciones de pH: 8.0, 7.7 y 7.5. Se mantuvieron los cultivos desde la fertilización hasta la metamorfosis en la misma condición de pH. El agua se cambió diariamente, tamizando las larvas a través de un tamiz de 80 µm de luz de malla.

Se realizaron 5 experimentos independientes en los cuales se extrajo el RNA de las larvas y en 3 de esos experimentos se tomaron larvas tanto para la cuantificación de cenizas como para la morfometría. Los detalles de cada extracción se especifican más adelante.

### **-Monitoreo de pH**

Se realizaron mediciones del pH de los cultivos con un potenciómetro (Horiba ®) y se realizaron cambios de agua diariamente, ajustando el pH mediante burbujeo de CO<sub>2</sub>. También se colectaron muestras de los tres tratamientos para realizar mediciones de carbón inorgánico disuelto (CID) y alcalinidad total (AT) en el laboratorio de Oceanografía Química del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

La medición del CID se realizó por el método de coulometría descrito por Johnson et al. (1987) usando material de referencia certificado como control de calidad. Previo al análisis de muestras, las soluciones catódica y anódica que absorben el CO<sub>2</sub> eran acondicionadas inyectando aproximadamente 10 adiciones de muestras de agua de mar filtrada. Posteriormente, se medía la exactitud y estabilidad utilizando el material certificado con valor de CID conocido, proporcionado por el Dr. Andrew Dickson de Scripps Institution of Oceanography. Si el valor obtenido del estándar se encontraba dentro del rango de  $\pm 3\mu\text{mol}$  del valor certificado de CID, se procedía a medir las muestras. Para cada titulación se tomaron alícuotas de peso conocido determinado en una

balanza analítica marca Mettler Toledo. Posterior a cada inyección la muestra se hizo reaccionar con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 8% para convertir el carbono inorgánico a  $\text{CO}_2$  gas. Esto se realizó en una celda cerrada conectada a un flujo constante de gas nitrógeno que transporta el  $\text{CO}_2$  liberado a otra celda que contiene monoetanolamina, una solución catódica. Al reaccionar con la solución catódica se realiza una titulación y un fotodetector detecta los cambios de transmitancia. Dentro de la celda hay una membrana que separa a un electrodo de platino inmerso en una solución de monoetanolamina con un indicador colorimétrico de pH de un lado y del otro lado hay un electrodo de plata (ánodo) inmerso en una solución anódica. Se registró la corriente necesaria para la titulación en forma de conteos por minuto y se usa la ley de Faraday para transformar la corriente equivalente a una concentración.

Para medir la alcalinidad se siguió el método descrito por Dickson *et al.* (2003), el cual es un método potenciométrico. Previo a la medición de las muestras, se preparó el equipo realizando las mediciones de agua de mar necesarias para que el electrodo se encontrara en las condiciones óptimas antes de comenzar con los análisis. Un criterio utilizado fue iniciar con análisis de muestras después de que el valor medido del material de referencia se encontrara en el intervalo de  $\pm 3\mu\text{moles}$  del valor de referencia. La titulación se llevó a cabo con un equipo controlado por computadora utilizando un programa en Labview para el control de los instrumentos. Para llevar a cabo el análisis, normalmente se tomó una alícuota de la muestra de peso conocido y se llevó a  $20^\circ\text{C}$  en una

celda abierta conectada a un termocirculador de agua con temperatura controlada. La titulación se realizó con una pipeta automática marca Radiometer con la cual se añadió HCl ~0.1N, con fuerza iónica  $0.7 \text{ moles kg}^{-1}$ , hasta un pH aproximado de 3.5 con burbujeo para liberar el  $\text{CO}_2$ . Posteriormente se disminuyó el pH a 3.0 realizando un total de 20 adiciones de 0.025 mL de HCl registrando el cambio en milivoltaje. Con estos datos se realizó una linealización entre el pH, masa de la muestra y el volumen del HCl que se necesita para neutralizar las bases contenidas en ella, entre un pH de 3.5 a 3.0. Con esta información y con los datos de CID, AT, salinidad, temperatura, presión y las constantes de disociación de Mehrbach et al. (1973) se calculó el pH en la escala de agua de mar, ( $\text{pH}_{\text{EAM}}$ ) y el  $\Omega_{\text{arag}}$  de las muestras por medio del programa CO2Sys.xls (Lewis y Wallace 1998)

#### **-Morfometría de las larvas**

Para detectar cambios morfológicos en las larvas por efecto de los tratamientos de pH se realizaron 9 mediciones morfométricas a larvas de 4, 6 y 8 brazos, de sus componentes esqueléticos y de su talla total. En larvas competentes y postlarvas se realizaron 2 mediciones correspondientes a largo y ancho del cuerpo.

Se recolectaron del cultivo 100 larvas de cada estadio de desarrollo de los 3 tratamientos y se precipitó a las larvas con una centrifuga de mesa para remover exceso de agua. Lo anterior se realizó en forma separada para los cohortes de larvas obtenidos de las 3 parejas independientes. A partir de su

colecta, las larvas se colocaron en tubos Eppendorf con 1.5 ml de paraformaldehído al 4% preparado con AMF, para preservarlas hasta el momento del análisis. Las larvas se observaron por medio de un microscopio compuesto Axioskop 2 Zeiss ® y se tomaron fotografías para poder analizar posteriormente su morfología íntegra.

En las larvas de 4 a 8 brazos se tomaron 9 mediciones (Fig. 4) de acuerdo con lo descrito por O'Donnell et al (2010), las cuales fueron : BLV: distancia desde la región posterior de la larva hasta el arco ventral, LBR: largo del brazo izquierdo, RBR: largo del brazo derecho, LPO: largo del brazo postoral izquierdo, RPO: largo del brazo postoral derecho, LTR: largo del brazo transversal izquierdo, RTR: largo del brazo transversal derecho, BW: ancho del cuerpo a la mitad del cuerpo, BWT: ancho del cuerpo en la región posterior de la larva, TSL: esqueleto total, sacado de la suma de LBR + RBR + LPO + RPO + LTR + RTR y Suma: suma de todas las medidas anteriores.

En larvas competentes y postlarvas se tomaron 2 medidas: ancho y largo (Figs. 5 y 6).

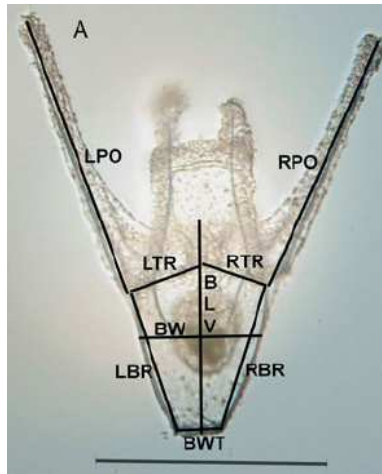


Figura 4. Esquema de mediciones realizadas. Larva de erizo *Lytechinus pictus* donde se observa la región correspondiente a cada medición realizada. Las siglas significan: BLV: distancia desde la región posterior de la larva hasta el arco ventral, LBR: largo del brazo izquierdo, RBR: largo del brazo derecho, LPO: largo del brazo postoral izquierdo, RPO: largo del brazo postoral derecho, LTR: largo del brazo transversal izquierdo, RTR: largo del brazo transversal derecho, BW: ancho del cuerpo a la mitad del cuerpo, BWT: ancho del cuerpo en la región posterior de la larva (Tomado de O'Donnell et al. 2010).

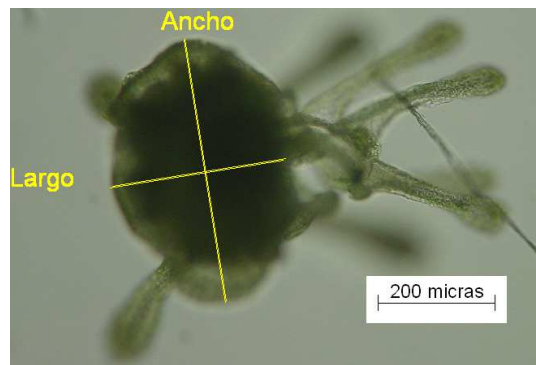


Figura 5. Mediciones realizadas en larvas competentes de galleta de mar para los análisis de morfometría. Las larvas llegaron a este estado aproximadamente de 17 días después de la fertilización.

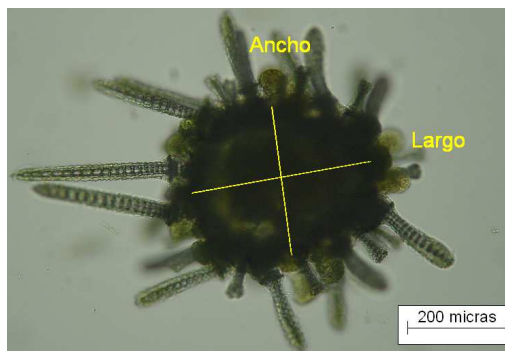


Figura 6. Mediciones realizadas a postlarvas de galleta de mar para análisis de morfometría. Las larvas llegaron a este estadio entre 23 y 28 días después de la fertilización.

Se realizaron ANOVAS de una vía y comparaciones múltiples de Dunn para ver si los diferentes tratamientos de pH tuvieron efectos sobre la morfometría de las larvas.

### **-Cenizas**

Para cuantificar calcificación se midió la cantidad de ceniza, ya que al quemar una muestra biológica permanecen residuos inorgánicos. Se comparó el peso de las larvas secas con el peso de ceniza obtenida para obtener el porcentaje de ceniza de cada muestra y realizar comparaciones entre las muestras obtenidas de cada tratamiento en los diferentes estadios de desarrollo de la galleta de mar.

Para esto se colectaron 1000 larvas de cada estadio estudiado (4, 6 y 8 brazos, competente y postlarva) y se almacenaron en formol al 4% preparado en AMF.

Para cuantificar las cenizas se removió el formol y se dejaron las larvas toda la noche en 500 µl de agua de mar esterilizada para quitar los residuos de formol.

Al día siguiente se removió el agua de mar y se enjuagaron las larvas con una solución de etanol al 20% en agua destilada para eliminar sales. Después de descartar esa solución se resuspendieron en 300 µl de etanol al 70% en agua destilada y se repartieron las 1000 larvas en 3 cápsulas de aluminio previamente pesadas. Se comprobó la integridad de las larvas por medio de observaciones al microscopio. Para eliminar el etanol en exceso se colocaron dentro de una estufa a 60 °C por lo menos durante 24 horas. A continuación se volvió a pesar las cápsulas de aluminio y se colocaron en una mufla a 450°C por 4 horas. Después se volvieron a pesar las cápsulas y se calculó el porcentaje de ceniza.

Se realizaron pruebas de ANOVA y comparaciones múltiples de Tukey para encontrar diferencias entre el porcentaje de ceniza presente en los diferentes tratamientos.

#### **-Extracción de RNA total**

Se realizó la extracción de RNA total de las muestras obtenidas de los diferentes tratamientos para después por medio de PCR tiempo real evaluar los cambios de expresión de la anhidrasa carbónica.

Se tomaron 2000 individuos de cada estadio larval y tratamiento de pH. Estos organismos se centrifugaron con una centrifuga de mesa y se colocaron en microtubos de plástico de 2 ml (Eppendorf®) con un mínimo de agua de mar y se homogeneizaron en 400 µl de Trizol ® que es una solución que produce lisis

celular y tisular aislando RNA, DNA y proteínas. Una vez homogeneizados, se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un mínimo de 2 días para dejar actuar al Trizol<sup>®</sup> y obtener una mejor extracción de RNA. Posteriormente se les añadieron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo por cada mililitro de Trizol<sup>®</sup> utilizado y se homogeneizaron las muestras por medio de vortex. Posterior a la agitación, los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 3 min, para finalmente centrifugarlos a 12,000 X g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se removió la fase acuosa la cual se pasó a microtubos de plástico (Eppendorf<sup>®</sup>) de 1.5 ml con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío (aproximadamente a  $4^{\circ}\text{C}$ ); esta solución se mezcló delicadamente e incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  por un mínimo de 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se centrifugaron a 12,000 X g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se retiró el sobrenadante decantando con cuidado. El pellet obtenido se lavó con 1ml de etanol al 75% y se realizó una última centrifugación a 7,500 X g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se removió el etanol decantando, y se dejaron secar los pellets para luego resuspenderlos en 10-20  $\mu\text{l}$  de agua inyectable, dependiendo del tamaño del pellet obtenido en cada tubo.

Se analizó la integridad y la concentración de los ácidos nucleicos por medio de un espectrofotómetro Nanodrop<sup>®</sup> 1000 (Thermo scientific), con ayuda del software V3.7.1.

Se sintetizó cDNA de las muestras de larvas de 4 brazos, 8 brazos y competentes mediante el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems<sup>®</sup>) usando 500 ng de RNA como templado.

### **-PCR Tiempo Real**

El PCR tiempo real es un método cuantitativo que nos permite determinar la cantidad relativa de síntesis de uno o varios genes, en este caso se investigó la expresión de la anhidrasa carbónica para conocer como la disminución de pH afecta su expresión. En esta técnica se realizan amplificaciones como en un PCR común, donde a partir de una muestra pequeña de cDNA se obtienen muchas copias de una secuencia de interés por acción de una enzima polimerasa, que por medio de ciclos de cambio de temperatura amplifica exponencialmente las copias de la secuencia de interés. En el método de Tiempo Real se añade a la reacción un fluoróforo, para este ensayo se usó SYBR Green® el cual en un intercalador de bases, entonces al amplificarse los segmentos deseados se incorpora el fluoróforo entre las bases del nuevo producto. A medida que se amplifican las muestras se va midiendo la fluorescencia producida en tiempo real. Para realizar la cuantificación relativa se amplifica el producto del gen de interés así como de un gen que tenga una expresión constitutiva (a niveles constantes), y se grafica la fluorescencia obtenida contra el número de ciclos en que la fluorescencia de la amplificación sobrepasa los niveles de la fluorescencia de fondo (Ct). Después por el método  $\Delta\Delta\text{CT}$  se normaliza la variación del producto de las diferentes muestras se resta el Ct del gen constitutivo y se resta el Ct del tratamiento control. Se considera que la expresión del gen en el tratamiento control equivale a 1 y se ajustan los demás valores a partir de ese dato.

Para la cuantificación de la expresión mediante la técnica de PCR tiempo real, primeramente se realizó una curva de estandarización para validar el uso de la expresión del gen R18s como gen constitutivo. Una vez obtenida la curva de calibración para el gen R18s, se procedió a cuantificar la expresión de la anhidrasa carbónica. Se utilizó un termociclador StepOnePlus (Invitrogen®) y se usó como gen constitutivo el R18s.

Las reacciones de PCR fueron de 10  $\mu$ l y tuvieron las siguientes condiciones:

Para anhidrasa carbónica:  $MgCl_2$  2.5 mM, dNTP's 10 mM, Templado 1:10, cebador hacia delante 1.5  $\mu$ M, cebador reverso 2.5  $\mu$ M, con temperatura de alineación de 57°C.

Para R18s:  $MgCl_2$  1.25 mM, dNTP's 10 mM, Templado 1:10, cebador hacia delante 0.6 $\mu$ M, cebador reverso 1  $\mu$ M, con temperatura de alineación de 55°C.

Estas condiciones, incluyendo la secuencia de los cebadores utilizados se resumen en la Tabla I.

Tabla I. Condiciones de reacción y secuencias de cebadores.

Primer	Origen de secuencia	Secuencia	MgCl <sub>2</sub>	Concentración final	Temperatura de alineación	TM
R18SF	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	5'- CGCTACACTGGCGGAATCA-3'	2.5 mM	0.6µM	55°C	57.6
R18SR	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	5'-GTTTAGCGGATTACCCAGACCTT-3'	2.5 mM	1µM	55°C	56.8
Anhidrasa Carbónica F	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	5'- GTGCGAAGGAAAGATACCA-3'	1.25 mM	1.5µM	57°C	56.3
Anhidrasa Carbónica R	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	5'- TACTGTCAGGGAACCATTGT-3'	1.25 mM	2.5 µM	57°C	55.4

## RESULTADOS

### -Medición de pH de los cultivos

Se tomaron muestras del agua de los 3 tratamientos de pH para comprobar sus propiedades mediante análisis químicos.

Tabla II. Resultados de los análisis químicos del agua de los cultivos larvales de los tres tratamientos A, B y C. CID: Carbón inorgánico disuelto.

Cultivo	CID umol/kg	$\Omega_{arag}$	pH <sub>EAM</sub>
AI	1989	2.47	8.08
AII	1985	2.33	8.06
BI	2129	1.19	7.72
BII	2128	1.13	7.70
CI	2199	0.70	7.47
CII	2203	0.76	7.51

El tratamiento A corresponde al tratamiento control a pH 8.0, el B al pH intermedio de 7.7 y el C al pH bajo de 7.5. La variación del CID (carbón inorgánico disuelto) es inversa a la del pH, a mayor CID se tiene un pH menor.

Los valores del agua control son característicos de aguas superficiales del océano, donde el pH suele ser más alto. Los valores de  $\Omega_{\text{arag}}$  del tratamiento C a pH 7.5 son similares a los de aguas encontradas a aproximadamente 100 m de profundidad, que durante las surgencias son llevadas a la superficie. Los valores menores a 1.0 de  $\Omega_{\text{arag}}$ , de carbón inorgánico disuelto mayores a 2190 y pH menor a 7.75 indican aguas corrosivas donde la calcificación es limitada (Feely et al. 2008).

#### -Sobrevivencia de las larvas en cultivo

La sobrevivencia de las larvas en los diferentes pH en las que se cultivaron fue menor en el tratamiento de pH 7.5, pero no se detectaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) al finalizar el periodo experimental (Fig. 7). Se analizaron las densidades de los tres tratamientos en todos los estadios larvales estudiados sin encontrar diferencias en ninguno.

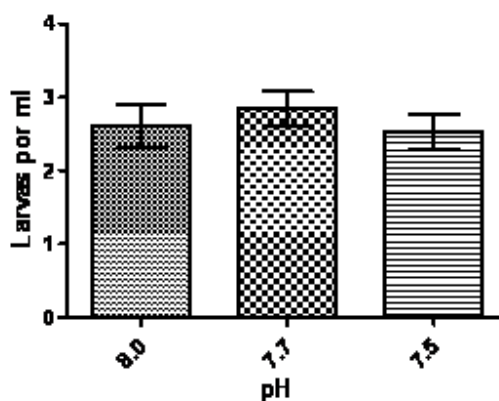


Figura 7. Densidad de larvas total en los cultivos a pH 8.0, 7.7 y 7.5. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 réplicas.

## -Morfometría de las larvas

### Larvas de 4 brazos

Para el estadio larval de 4 brazos (3 días de cultivo) se encontró que las cultivadas a 15°C en un medio con pH disminuido (7.5) fueron de menor tamaño que el resto de los tratamientos. Se encontraron diferencias muy marcadas entre los 3 tratamientos en la medición del ancho de la base larval (BWT), con la media menor en 5.15  $\mu\text{m}$  en los cultivos a 7.7 y de 11.92  $\mu\text{m}$  en cultivos a pH 7.5. (Fig. 8). En la medida BWT las larvas de los tratamientos de pH 8.0 y 7.7 tuvieron una diferencia muy significativa ( $P= 0.001$  a  $0.01$ ), mientras que entre los cultivos 8.0 y 7.5 y entre los cultivos 7.7 y 7.5 hubo diferencias extremadamente significativas ( $P<0.001$ ).

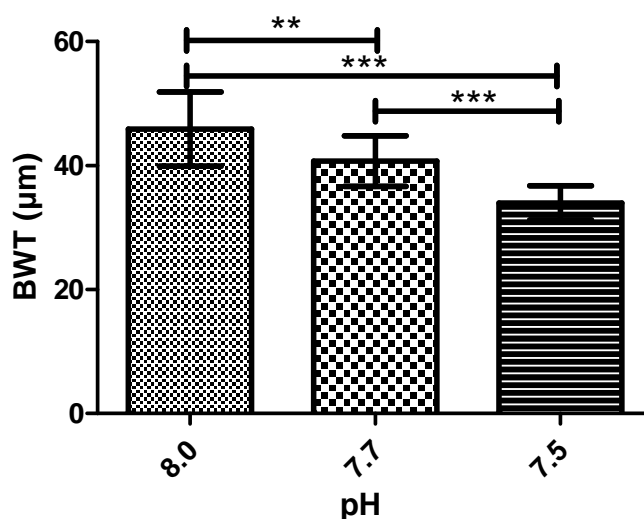


Figura 8. Ancho del cuerpo larval en la zona posterior (BWT) en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar; las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\*  $P<0.001$ , \*\*  $P=0.001$  a  $0.01$ .  $n=25$  en pH 8,  $n=46$  en pH 7.7 y  $n=58$  en pH 7.5.

En la medición de la distancia desde la región posterior de la larva hasta el arco ventral (BLV) hubo una disminución de la media de las larvas en cultivos a pH 7.5 que fue significativa ( $P=0.01$  a  $0.05$ ) al comparar con las mediciones de las larvas a pH 7.7, con una diferencia en la media de estos dos tratamientos de  $8.94 \mu\text{m}$ ; pero comparando los tratamientos con el control no hubo diferencias significativas (Fig. 9).

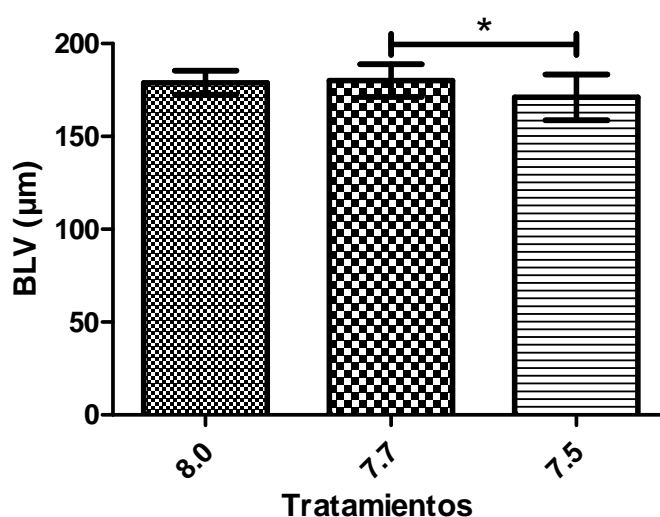


Figura 9. Distancia entre la región posterior de la larva hasta el arco ventral (BLV) en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar; las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. Diferencia no significativa  $P>0.05$ .  $n=25$  en pH 8,  $n=46$  en pH 7.7 y  $n=58$  en pH 7.5.

En el ancho larval a la mitad del cuerpo (BW) se encontró una disminución en esta longitud conforme disminuyó el pH del tratamiento, sin embargo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 10). En la suma de todas las mediciones realizadas y LPO+LBR (largo del brazo postoral izquierdo + largo del brazo izquierdo) se encontró disminución de la longitud en las larvas cultivadas a pH 7.5. En el análisis de la suma de todas las mediciones

realizadas hubo aumento de 13.09  $\mu\text{m}$  en el tratamiento de pH 7.7 y disminución de 66.9  $\mu\text{m}$  en el de pH 7.5 comparado con el tratamiento control de pH 8 siendo una diferencia muy significativa ( $P=0.001$  a  $0.01$ ) entre estos dos últimos tratamientos.

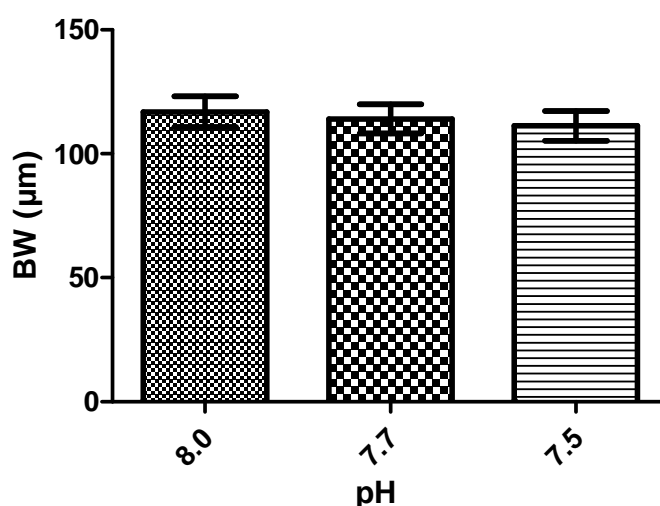


Figura 10. Largo del cuerpo larval a la mitad del cuerpo (BW), en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar. Diferencia no significativa  $P>0.05$ .  $n=25$  en pH 8,  $n=46$  en pH 7.7 y  $n=58$  en pH 7.5.

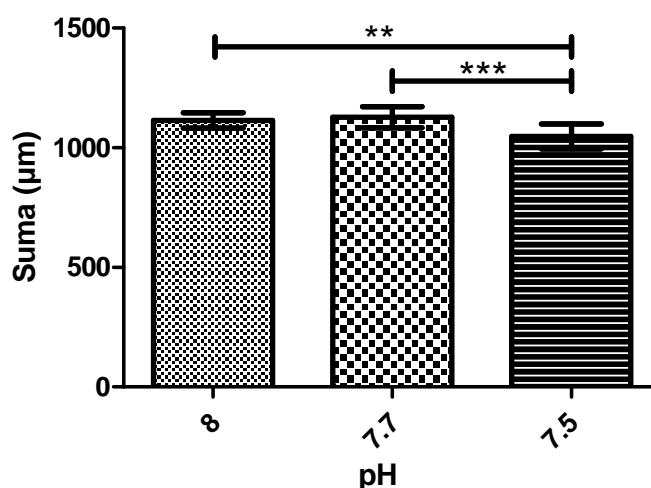


Figura 11. Suma de todas las mediciones realizadas en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*  $P= 0.001$  a  $0.01$ . \*\*\*  $P<0.001$ .  $n=25$  en pH 8,  $n=46$  en pH 7.7 y  $n=58$  en pH 7.5.

En la medición del brazo transversal izquierdo (LTR) se encontró que en las larvas cultivadas a pH 7.7 la media aumentó en 15.64  $\mu\text{m}$  al comparar con el tratamiento control a pH 8.0, siendo ésta una diferencia significativa ( $P=0.01$  a  $0.05$ ) (Fig. 12).

En la suma del brazo transversal y brazo postoral larval izquierdo (LPO+LTR) hubo una disminución en la media en las larvas cultivadas a pH 7.5, esta disminución fue de 18.9  $\mu\text{m}$  entre los tratamientos de 8.0 y 7.5, siendo también ésta, una diferencia significativa ( $P=0.01$  a  $0.05$ ) y entre los tratamientos de 7.7 y 7.5 una diferencia de medias extremadamente significativa de 24.4  $\mu\text{m}$  ( $P<0.001$ ) (Fig. 13).

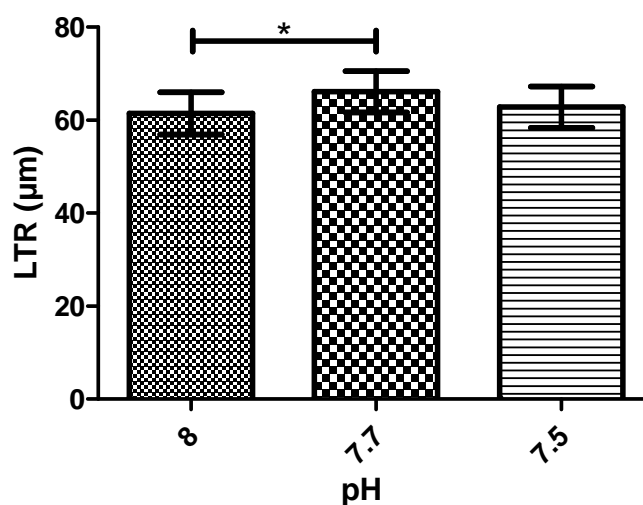


Figura 12. Longitud del brazo transversal izquierdo (LTR) en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \* $P=0.01$  a  $0.05$ .  $n=25$  en pH 8,  $n=46$  en pH 7.7 y  $n=58$  en pH 7.5.

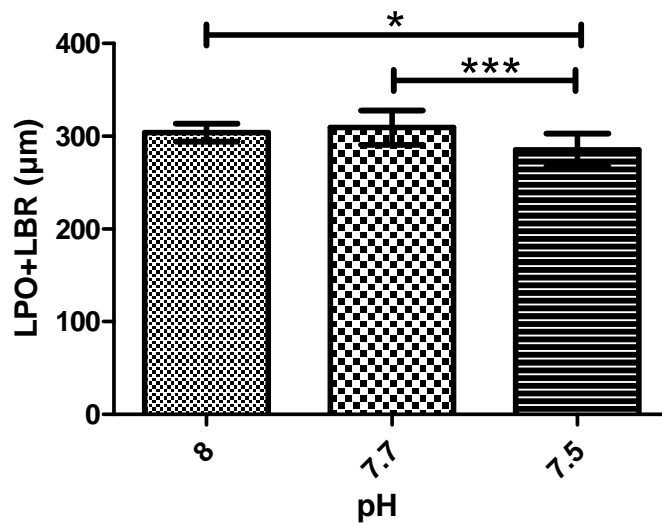


Figura 13. Suma de las medidas del largo del brazo postlarval y brazo izquierdo (LPO+LBR), en larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*  $P=0.01$  a  $0.05$ , \*\*\*  $P<0.001$ .  $n=25$  en pH 8,  $n=46$  en pH 7.7 y  $n=58$  en pH 7.5.

En la medición del esqueleto larval total (TSL) hubo un pequeño aumento en la longitud de las larvas a pH 7.7 y una disminución en los cultivos a pH 7.5. Hubo un aumento en la media de  $25.13 \mu\text{m}$  en el tratamiento de pH 7.7 y una disminución de la media de  $29.66 \mu\text{m}$  en el tratamiento de pH de 7.5 comparado con el tratamiento control. Entre las medias de los tratamientos de pH 7.7 y 7.5 hubo diferencias extremadamente significativas ( $P<0.001$ ) (Fig. 14).

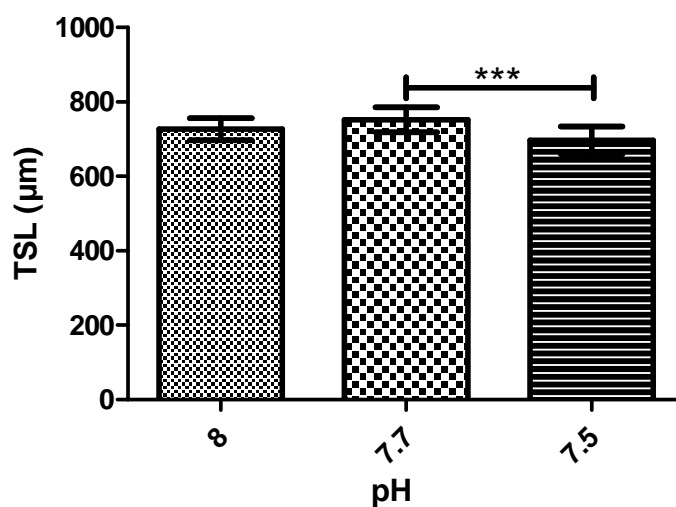


Figura 14. Suma de mediciones esqueléticas (TSL) de larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. Diferencia no significativa  $P > 0.05$ .  $n=25$  en pH 8,  $n=46$  en pH 7.7 y  $n=58$  en pH 7.5.

### Larvas de 6 brazos

En la medida BWT hubo una pequeña disminución de la media en las larvas cultivadas a pH 7.7 y un aumento en las cultivadas a pH 7.5 comparadas con el tratamiento control. El aumento de la media de esta medida en el cultivo a pH 7.5 fue de  $13.71 \mu\text{m}$  respecto al tratamiento control, siendo extremadamente significativas las diferencias ( $P < 0.001$ ). Entre los tratamientos 7.7 y 7.5 la diferencia de medias fue de  $16.28 \mu\text{m}$ , siendo también extremadamente significativas las diferencias (Fig. 15).

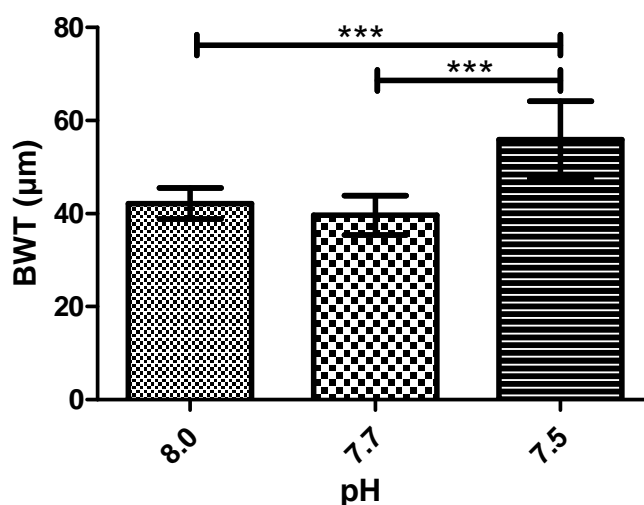


Figura 15. Ancho del cuerpo larval en la región posterior de la larva (BWT), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\*  $P < 0.001$ .  $n = 60$  en pH 8,  $n = 52$  en pH 7.7 y  $n = 83$  en pH 7.5.

En BW se encontró un aumento de la media en el tratamiento de pH 7.5 de 7.72  $\mu\text{m}$  respecto al control y entre 7.7 y 7.5 de 7.61  $\mu\text{m}$  que representan diferencias muy significativas ( $P = 0.001$  a 0.01) en ambos casos (Fig. 16).

Se encontró una disminución de la suma de todas las mediciones en las larvas en cultivos a pH 7.5, y comparado con las larvas de los cultivos a pH 7.7 tuvieron una diferencia de medias de 23.83  $\mu\text{m}$ , la cual resultó extremadamente significativa ( $P < 0.001$ ) (Fig. 17).

En la medición BLV los tres tratamientos tuvieron medias muy similares y no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Fig. 18).

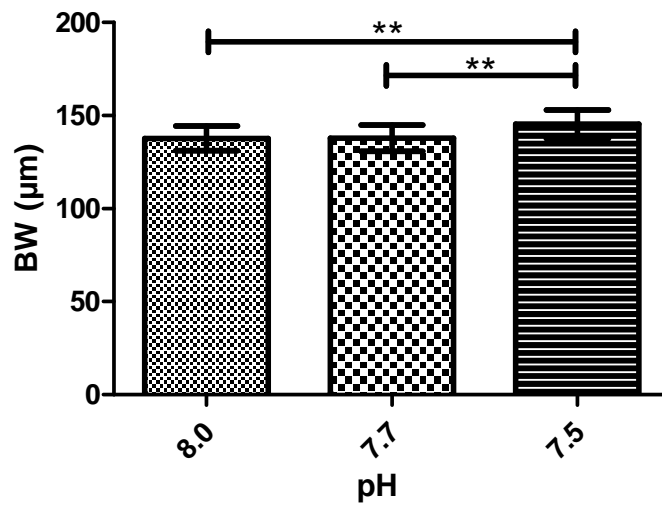


Figura 16. Largo del cuerpo larval a la mitad del cuerpo (BW), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*P= 0.001 a 0.01. n=60 en pH 8, n=52 en pH 7.7 y n=83 en pH 7.5.

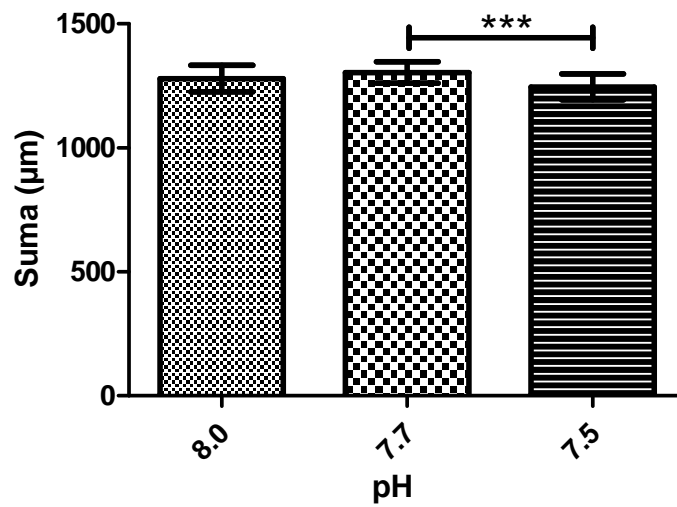


Figura 17. Suma de todas las mediciones realizadas en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, la barra horizontal une tratamientos con diferencias estadísticas. Diferencia no significativa  $P>0.05$ . n=60 en pH 8, n=52 en pH 7.7 y n=83 en pH 7.5.

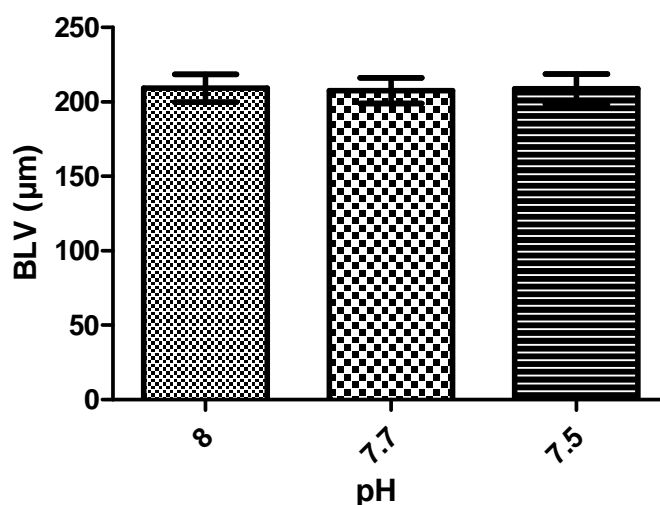


Figura 18. Distancia entre la región posterior de la larva hasta el arco ventral (BLV), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar. Diferencia no significativa  $P>0.05$ .  $n=60$  en pH 8,  $n=52$  en pH 7.7 y  $n=83$  en pH 7.5.

Se observó una disminución de 6  $\mu\text{m}$  en la media de la longitud LTR en las larvas cultivadas a pH 7.5 al comparar con el tratamiento control y de 10.60  $\mu\text{m}$  comparado con las cultivadas a pH 7.7 (Fig. 19). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P<0.001$ ).

En LPO+LTR se encontró una disminución en las larvas cultivadas a pH 7.5. Entre las medias del tratamiento a pH 8.0 y 7.5 hubo una diferencia de 28.92  $\mu\text{m}$  y entre las larvas de los tratamientos de pH 7.7 y 7.5 la diferencia de medias fue de 38.05  $\mu\text{m}$ ; en ambas comparaciones las diferencias estadísticas fueron significativas ( $P<0.001$ ) (Fig. 20).

En TSL hubo un aumento de 30.94  $\mu\text{m}$  en la media registrada en el tratamiento de pH 7.7 de comparado con el tratamiento control y una disminución de 68.35  $\mu\text{m}$  en esta medición en las larvas cultivadas a pH 7.5 comparado con el

tratamiento control y de 99.29  $\mu\text{m}$  comparado con el tratamiento de pH de 7.7. Entre la media de esta medición en larvas en cultivos a pH 8.0 y 7.7 hubo diferencia significativa ( $P=0.01$  a  $0.05$ ) y entre las medias de esta medición en larvas en cultivos a pH 7.5 al comparar con las cultivadas tanto a pH 8.0 y 7.7 se encontraron también diferencias significativas ( $P<0.001$ ) (Fig. 21).

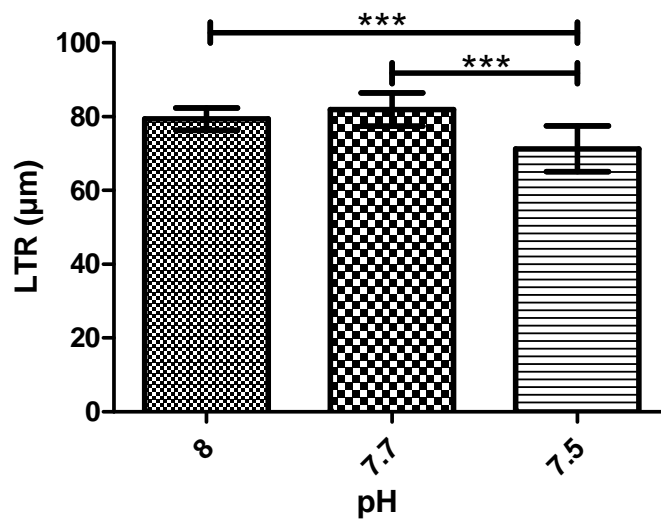


Figura 19. Longitud del brazo transversal izquierdo (LTR) en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\* $P<0.001$ .  $n=60$  en pH 8,  $n=52$  en pH 7.7 y  $n=83$  en pH 7.5.

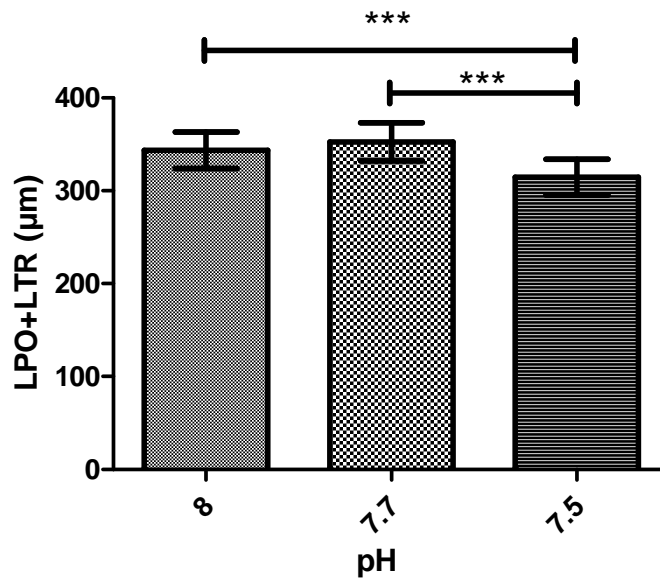


Figura 20. Suma de las medidas del largo del brazo postoral y brazo transversal izquierdo (LPO+LTR), en larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\*  $P < 0.001$ .  $n=60$  en pH 8,  $n=52$  en pH 7.7 y  $n=83$  en pH 7.5.

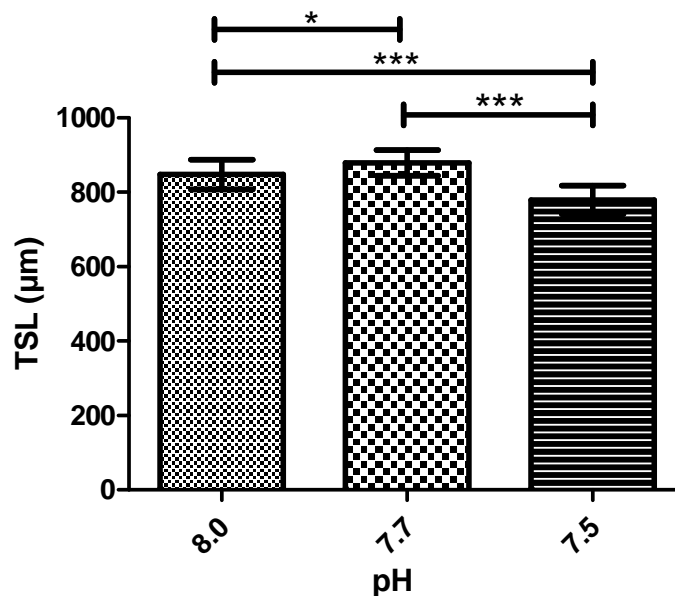


Figura 21. Suma de mediciones del esqueleto (TSL) de larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P = 0.01$  a  $0.05$ .  $n=60$  en pH 8,  $n=52$  en pH 7.7 y  $n=83$  en pH 7.5.

### Larvas de 8 brazos

Las larvas de 8 brazos cultivadas a pH 7.5 fueron de mayor tamaño que las de los otros dos escenarios de pH. Se encontró un aumento de la media de BWT en las larvas cultivadas a pH 7.5 de 15.45  $\mu\text{m}$  comparado con larvas del tratamiento control, representando una diferencia significativa ( $P=0.01$  a  $0.05$ ) y de 28.03  $\mu\text{m}$  al comparar el control con larvas del tratamiento de pH 7.7, siendo una diferencia extremadamente significativa ( $P<0.001$ ) (Fig. 22).

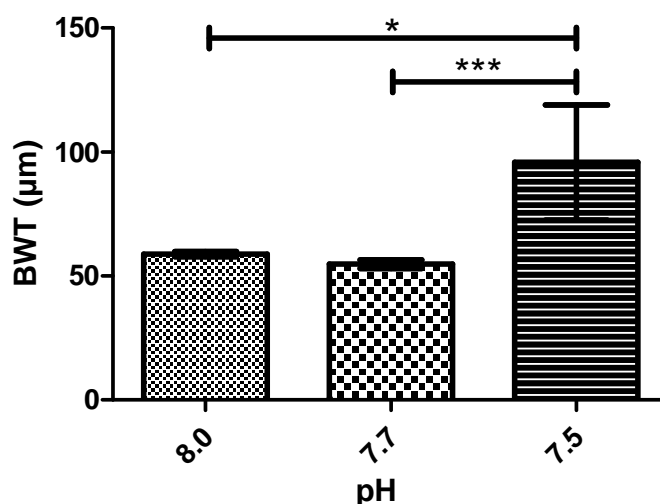


Figura 22. Ancho de la región posterior de la larva (BWT), en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar, la barra horizontal une tratamientos con diferencias estadísticas. \* $P=0.01$  a  $0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ ,  $n=83$  en pH 8,  $n=34$  en pH 7.7 y  $n=80$  en pH 7.5.

En BW, BLV y la suma de las mediciones se encontraron diferencias entre los tratamientos de pH 8.0 y los otros dos tratamientos a pH 7.7 y 7.5 (Figs. 23, 24 y 25). La media de BW aumentó en 24.5  $\mu\text{m}$  a pH 7.7 y a pH 7.5 aumentó 29.9  $\mu\text{m}$  comparadas estas con el tratamiento control a pH 8.0. En ambos casos, los incrementos fueron estadísticamente significativos ( $P<0.001$ ) (Fig. 23).

La talla promedio obtenida para BLV aumentó en 86  $\mu\text{m}$  en el tratamiento a pH 7.7 y en el tratamiento a pH 7.5 aumentó 128.7  $\mu\text{m}$ . Igualmente, en ambos casos estas diferencias fueron significativas en relación con el tratamiento control  $P < 0.001$  (Fig. 24).

En la suma de las mediciones el promedio se incrementó en 189.4  $\mu\text{m}$  para el pH 7.7 en relación con el tratamiento control, siendo esta diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) y en 387.8  $\mu\text{m}$  para el tratamiento a pH 7.5 respecto al mismo control, donde la diferencia fue igualmente significativa ( $P = 0.001$  a 0.01) (Fig. 25).

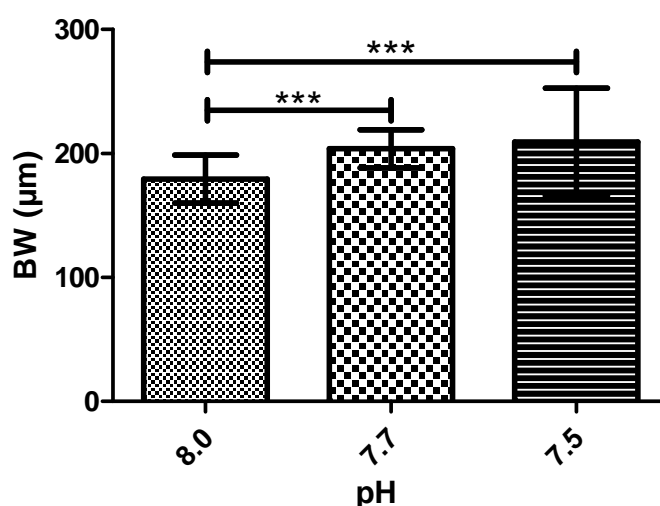


Figura 23. Medición del Largo del cuerpo larval en la parte media (BW) en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar; las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\* $P < 0.001$ .  $n = 83$  en pH 8,  $n = 34$  en pH 7.7 y  $n = 80$  en pH 7.5.

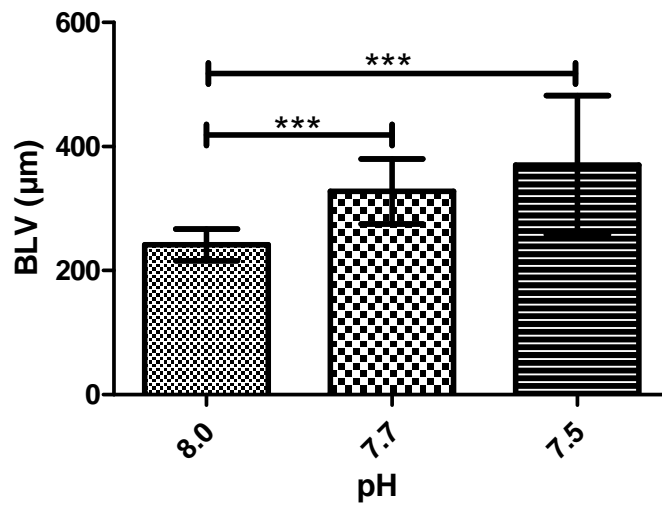


Figura 24. Distancia entre la parte posterior de la larva y hasta el arco ventral (BLV), en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\* $P < 0.001$ .  $n=83$  en pH 8,  $n=34$  en pH 7.7 y  $n=80$  en pH 7.5.

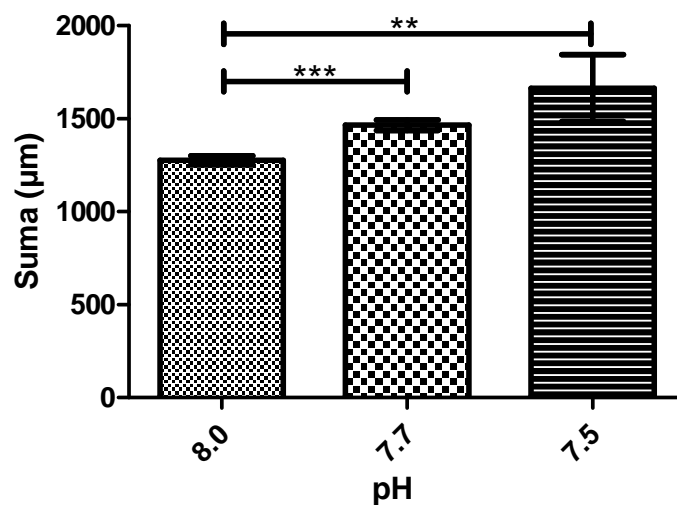


Figura 25. Suma de todas las mediciones realizadas en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=83$  en pH 8,  $n=34$  en pH 7.7 y  $n=80$  en pH 7.5.

Se encontró aumento en la medición de LTR al disminuir el pH del cultivo. A pH 7.7 la media aumentó en  $17.96 \mu\text{m}$  y a pH 7.5 aumentó  $35.42 \mu\text{m}$  comparadas

estas con el tratamiento control. La diferencia de medias entre las mediciones obtenidas de los cultivos a pH 7.7 y 7.5 fue de 17.45  $\mu\text{m}$ . En la comparación de todos los tratamientos hubo diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) (Fig. 26).

Se observó un aumento en la media de la longitud de la medición LPO+LTR en las larvas cultivadas a pH 7.5 en relación con el control, sin ser estadísticamente significativa esta diferencia ( $P > 0.05$ ) (Fig. 27).

También se observó un aumento de 182.27  $\mu\text{m}$  en la media de la longitud del esqueleto en la medición TSL en las larvas cultivadas a pH 7.5, y un aumento de la media de 80.21  $\mu\text{m}$  en las larvas cultivadas a pH 7.7, en relación con el tratamiento control, siendo diferencias significativas ( $P = 0.01$  a 0.05) (Fig. 28).

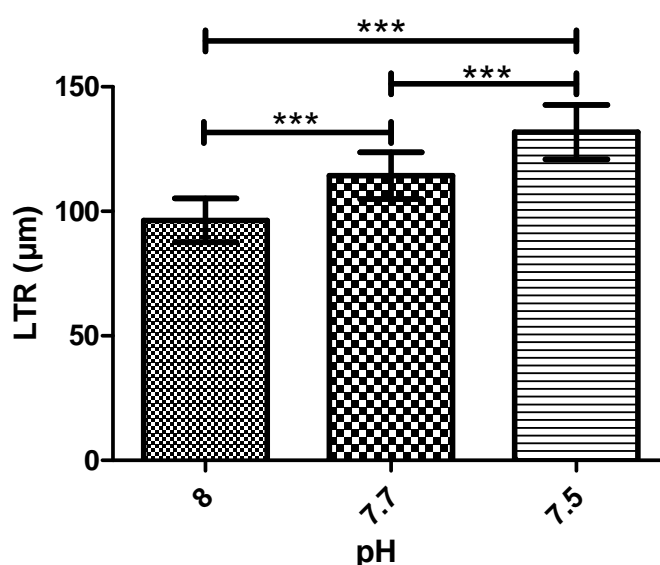


Figura 26. Longitud del brazo transversal izquierdo (LTR) en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 83$  en pH 8,  $n = 34$  en pH 7.7 y  $n = 80$  en pH 7.5.

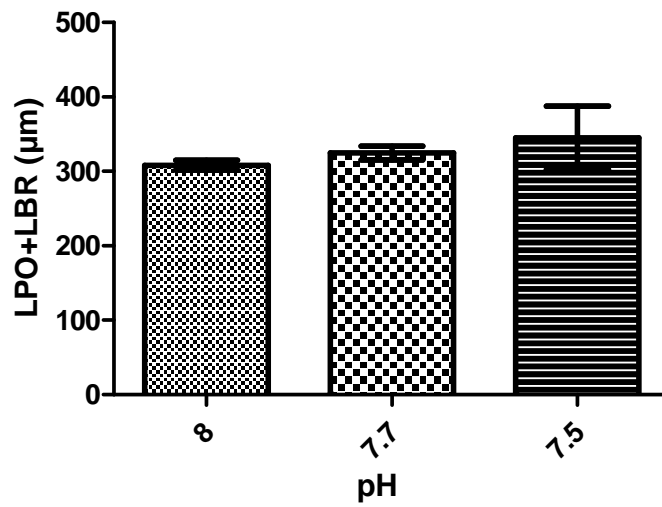


Figura 27. Suma de las medidas del largo del brazo postoral y brazo izquierdo (LPO+LBR), en larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar. Diferencia no significativa  $>0.05$ .  $n=83$  en pH 8,  $n=34$  en pH 7.7 y  $n=80$  en pH 7.5.

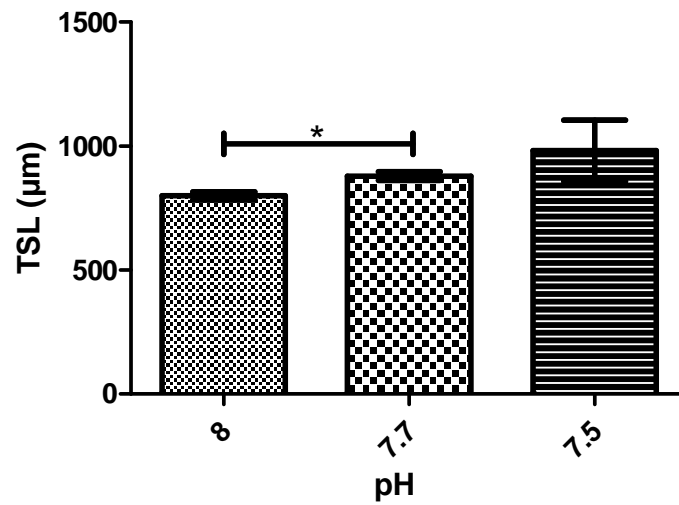


Figura 28. Suma de mediciones del esqueleto (TSL) de larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH diferentes (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar, la barra horizontal una tratamientos con diferencias estadísticas. \* 0.01 a 0.05.  $n=83$  en pH 8,  $n=34$  en pH 7.7 y  $n=80$  en pH 7.5.

### Larvas competentes

Cuando las larvas alcanzaron el estadio de competencia, estas fueron más anchas y más cortas en el tratamiento de pH 8.0.

En la medición de largo de la larva se encontró un aumento de la media de 42.53 $\mu\text{m}$  en el tratamiento a pH 7.7, siendo una diferencia muy significativa ( $P=0.001$  a 0.01), pero el aumento de la media del tratamiento a pH 7.5 comparado con el de 8.0 es de 13.1 $\mu\text{m}$  (Fig. 29).

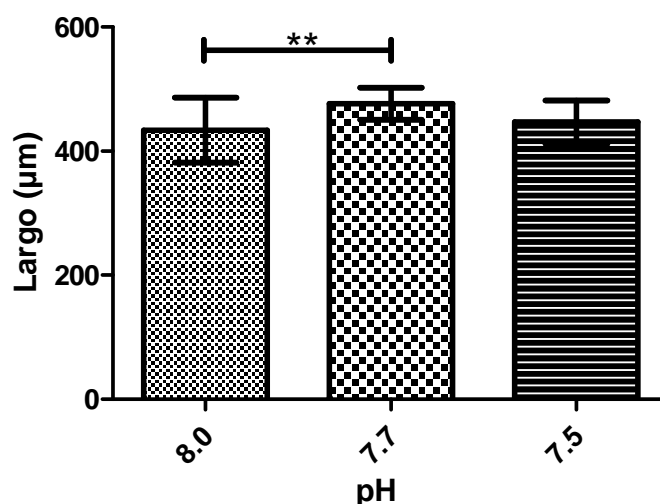


Figura 29. Largo de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, la barra horizontal una tratamientos con diferencias estadísticas. \*\* $P= 0.001$  a 0.01.  $n=58$  en pH 8,  $n=61$  en pH 7.7 y  $n=42$  en pH 7.5.

En la medida del ancho se encontró una disminución de 16.44  $\mu\text{m}$  de la media en las larvas a pH 7.7 y a pH 7.5 de 23.25  $\mu\text{m}$  comparadas estas con el control y siendo está última una diferencia significativa con respecto al mismo ( $P=0.01$  a 0.05) (Fig. 30).

Al sumar ambas medidas se encontró un aumento de la media de 26.1  $\mu\text{m}$ , en el tratamiento a pH 7.7 comparado con el tratamiento control, pero no se encontraron diferencias significativas entre ningún tratamiento ( $P > 0.05$ ) (Fig. 31).

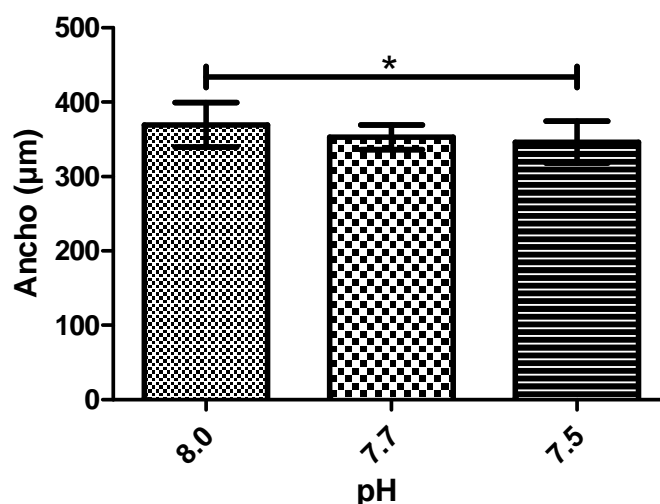


Figura 30. Ancho de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, la barra horizontal una tratamientos con diferencias estadísticas. \* $P = 0.01$  a  $0.05$ .  $n = 58$  en pH 8,  $n = 61$  en pH 7.7 y  $n = 42$  en pH 7.5.

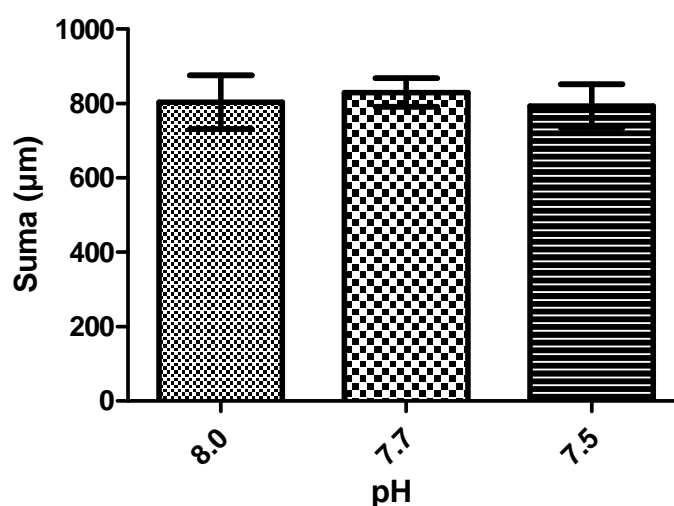


Figura 31. Suma de las mediciones del ancho y largo de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar. Diferencia no significativa  $P > 0.05$ .  $n = 58$  en pH 8,  $n = 61$  en pH 7.7 y  $n = 42$  en pH 7.5.

## Postlarvas

Las postlarvas del tratamiento de pH intermedio de 7.7 fueron las que presentaron el menor tamaño.

En las medidas del ancho de la postlarva se encontró disminución de las medias entre los tratamientos de 8 y 7.7 de 49.20  $\mu\text{m}$  resultando esta diferencia significativa ( $P < 0.001$ ). Entre los tratamientos 7.7 y 7.5 la diferencia de medias fue de 31.29  $\mu\text{m}$  con valores menores en el tratamiento de menor pH, siendo también esta diferencia significativa ( $P < 0.001$ ). Entre los tratamientos de 8.0 y 7.5 la disminución de la media fue de 17.91  $\mu\text{m}$ , con una media menor en el tratamiento de pH 7.5 (Fig. 32).

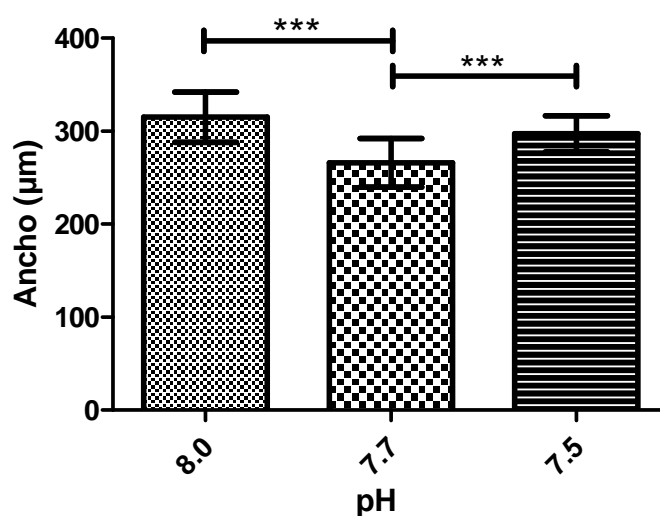


Figura 32. Medición del ancho de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\*  $P < 0.001$ .  $n=55$  en pH 8,  $n=31$  en pH 7.7 y  $n=36$  en pH 7.5.

En la medición del largo de las postlarvas hubo una disminución de  $50.21\mu\text{m}$  en las cultivadas a pH 7.7 y un aumento de  $1\mu\text{m}$  en pH 7.5 en comparación con el control a pH 8.0. Asimismo, entre el tratamiento de pH de 7.7 y 7.5 hubo un aumento de  $51.2\mu\text{m}$ , siendo más largas las larvas que permanecieron a pH menor. Las diferencias entre las medias del largo de las postlarvas en pH 8.0 vs. 7.7 y pH 7.7 vs. 7.5 fueron significativas ( $P < 0.001$ ) (Fig. 33).

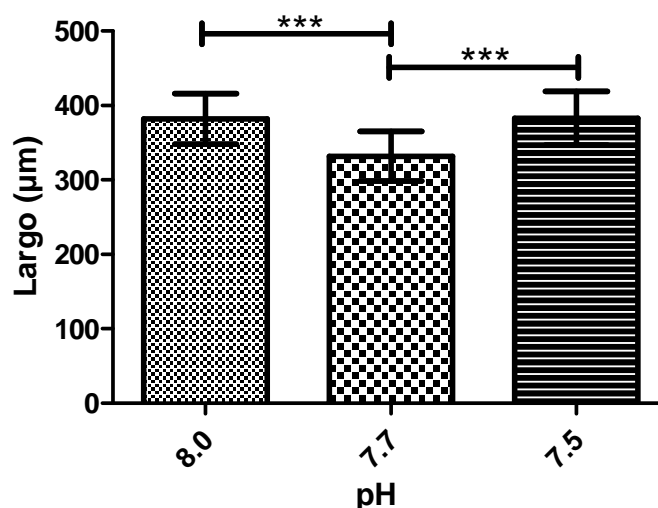


Figura 33. Largo total de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\*  $P < 0.001$ .  $n=55$  en pH 8,  $n=31$  en pH 7.7 y  $n=36$  en pH 7.5.

En la suma de las mediciones del ancho y largo de las postlarvas, se encontró una disminución de la media de  $99.41\mu\text{m}$  en las larvas cultivadas a pH 7.7 y de  $16.92\mu\text{m}$  en pH 7.5 comparadas con el control a pH 8.0. El aumento de medias entre la medida obtenida del pH 7.7 y 7.5 fue de  $82.5\mu\text{m}$ , siendo mayor en las

larvas cultivadas a pH 7.5. Las diferencias entre las medias de esta medida de las postlarvas en pH 8.0 vs. 7.7 y 7.7 vs. 7.5 fueron significativas ( $P < 0.001$ ) (Fig. 34).

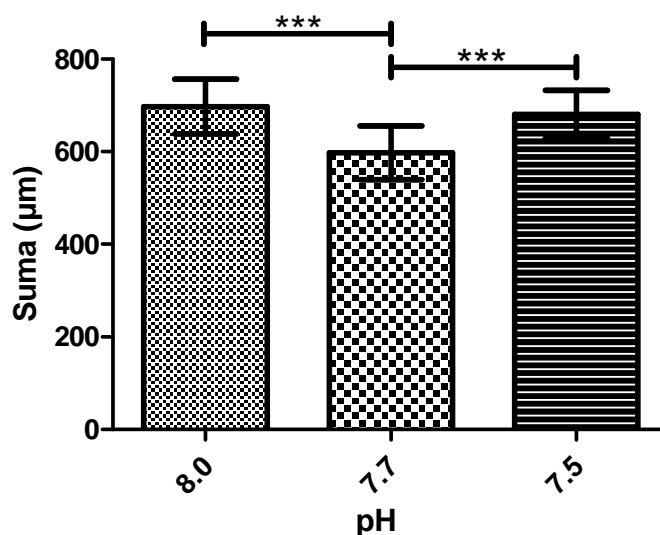


Figura 34. Suma de las mediciones del ancho y largo de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5). Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  desviación estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\*  $< 0.001$ .  $n=55$  en pH 8,  $n=31$  en pH 7.7 y  $n=36$  en pH 7.5.

### -Cenizas

La cantidad de ceniza que tiene un organismo refleja la cantidad de material inorgánico que tiene y en este estudio se relaciona a la cantidad de material calcificado por los organismos cultivados en medios con pH disminuido (pH 7.7 y 7.5) para compararlo con la calcificación en organismos cultivados en el pH control de 8.0

En las larvas de 4, 6 y 8 brazos se registró una disminución de la cantidad de cenizas al comparar las larvas en cultivos a pH 7.7 y 7.5 con el tratamiento control a pH 8.0 (Figs. 35, 36 y 37)

En larvas de 4 brazos en cultivos a pH 7.7 la disminución de la media observada de ceniza fue de 1.2% y a pH 7.5 de 4.67% comparando con el tratamiento control, siendo esta última una diferencia significativa ( $P= 0.01$  a  $0.05$ ). La diferencia entre las medias obtenidas de los cultivos a pH 7.7 y 7.5 fue de 3.44% (Fig. 35).

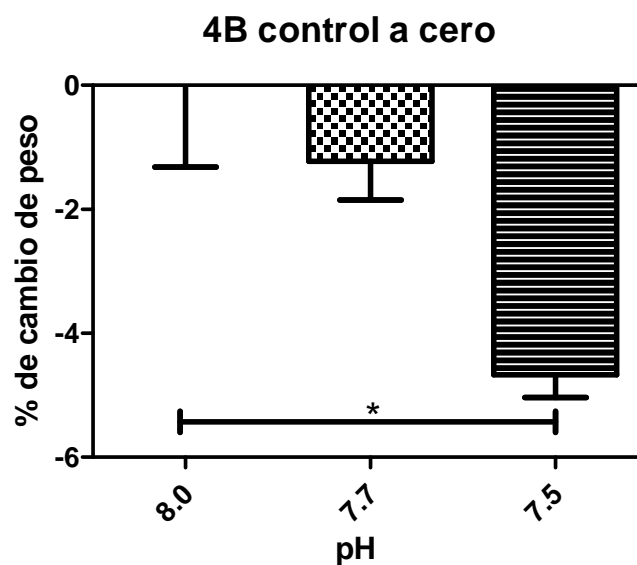


Figura 35. Porcentaje de cambio de cenizas respecto al peso seco de larvas de 4 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5) normalizando el valor a cero con la media del cultivo a pH 8.0. Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \* $P= 0.01$  a  $0.05$ .  $n=1000$  en cada tratamiento.

En larvas de 6 brazos la media del porcentaje de cenizas disminuyó 0.55% en cultivos a pH 7.7 y 1.7% en cultivos a pH 7.5 sin ser estas variaciones significativas (Fig. 36).

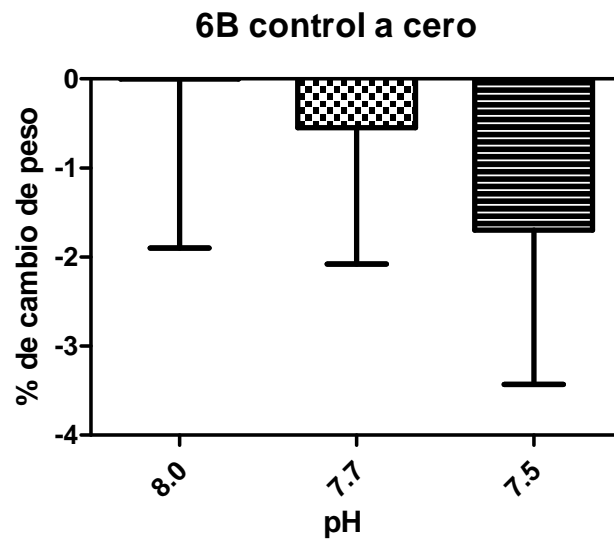


Figura 36. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de larvas de 6 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5) normalizando el valor a cero con las larvas cultivadas a pH 8.0. Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar. Diferencia no significativa  $>0.05$ .  $n=1000$  en cada tratamiento.

En larvas de 8 brazos la disminución de la media fue de 0.98% en cultivos a pH 7.7 y de 4.6% en cultivos a pH 7.5, comparadas estas con el tratamiento control a pH 8.0. Ambas diferencias fueron significativas ( $P<0.001$ ) (Fig. 37).

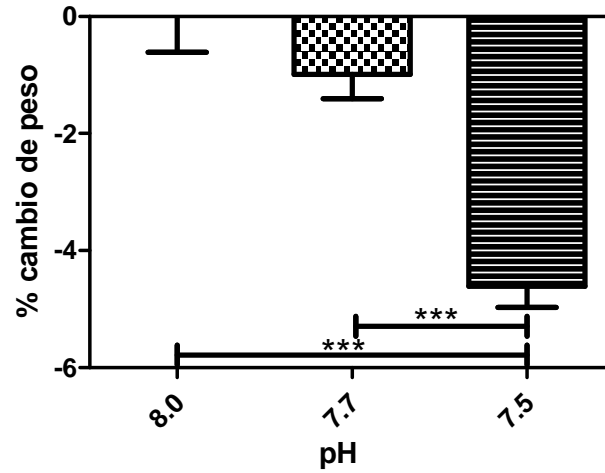


Figura 37. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de larvas de 8 brazos cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5) normalizando con las cultivadas a pH 8.0. Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*\*\*  $P < 0.001$ .  $n = 1000$  en cada tratamiento.

En el estadio de competencia hubo una disminución del 11.13% de la media registrada del en la cantidad de ceniza en las larvas cultivadas a pH 7.7 y de 0.9% en los cultivos a pH 7.5 comparadas con el tratamiento control (Fig. 38). Esta disminución de ceniza en larvas cultivadas a pH 7.7 fue estadísticamente significativa ( $P = 0.01$  a  $0.05$ ) al comparar con las cultivadas tanto a pH 8.0 como a 7.5.

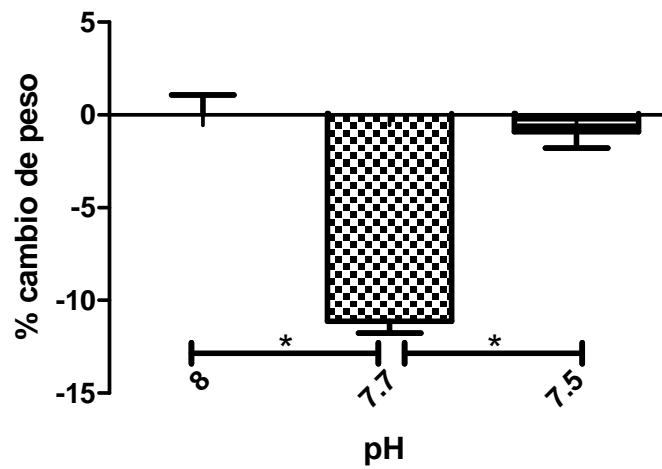


Figura 38. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de larvas competentes cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5) normalizando con las cultivadas a pH 8.0. Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar, las barras horizontales unen tratamientos con diferencias estadísticas. \*P= 0.01 a 0.05. n=1000 en cada tratamiento.

En postlarvas hubo una disminución de la media de ceniza registrada de 1.68% en los cultivos a pH 7.7 y un aumento de 18.72% en cultivos a pH 7.5 comparado con el tratamiento control a pH 8.0 (Fig. 39).

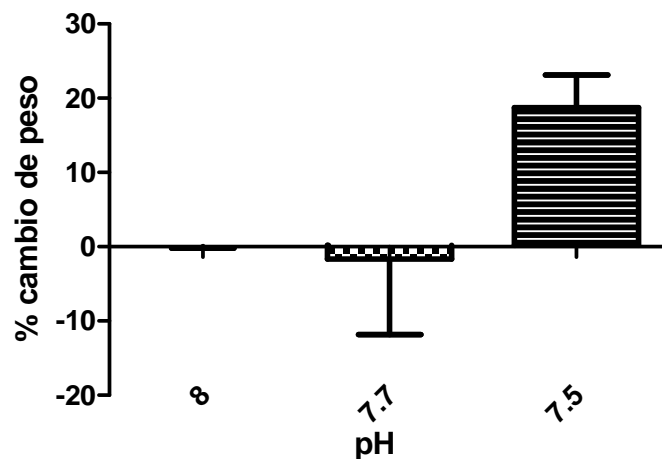


Figura 39. Porcentaje de cambio cenizas respecto al peso seco de postlarvas cultivadas en 3 escenarios de pH (8.0, 7.7 y 7.5) normalizando con las cultivadas a pH 8.0. Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar. Diferencia no significativa  $P > 0.05$ . n=1000 en cada tratamiento.

### **-PCR en Tiempo Real**

Para cuantificar la expresión relativa de la anhidrasa carbónica se utilizó el método de PCR en tiempo real, que nos permite conocer los cambios que se producen en la expresión de este gen por los tratamientos de pH. La anhidrasa carbónica está relacionada con la calcificación en la galleta de mar, entonces si hay poca disponibilidad de iones necesarios para la calcificación se espera que aumente su expresión.

Este método hace cuantificaciones relativas, es decir que compara la expresión del gen de interés con la expresión de un gen cuya síntesis sea constante. En este estudio se utilizó el gen R18s como control constitutivo y se realizó una curva de concentración de cDNA para validar uso del (Fig. 40). Esta curva sirve para comprobar que el aumento de concentración de cDNA de este gen tiene una relación inversa con la disminución del Ct (ciclo umbral, por sus signas en inglés). El Ct es el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia del producto de la amplificación sea mayor que la fluorescencia de fondo, entonces entre menor sea el valor de Ct mayor es la cantidad de templado. Se encontró una relación inverso en la presencia de este del gen R18s respecto al aumento de su concentración con una  $R^2$  de 0.98, lo que valida el uso del gen R18s como control constitutivo.

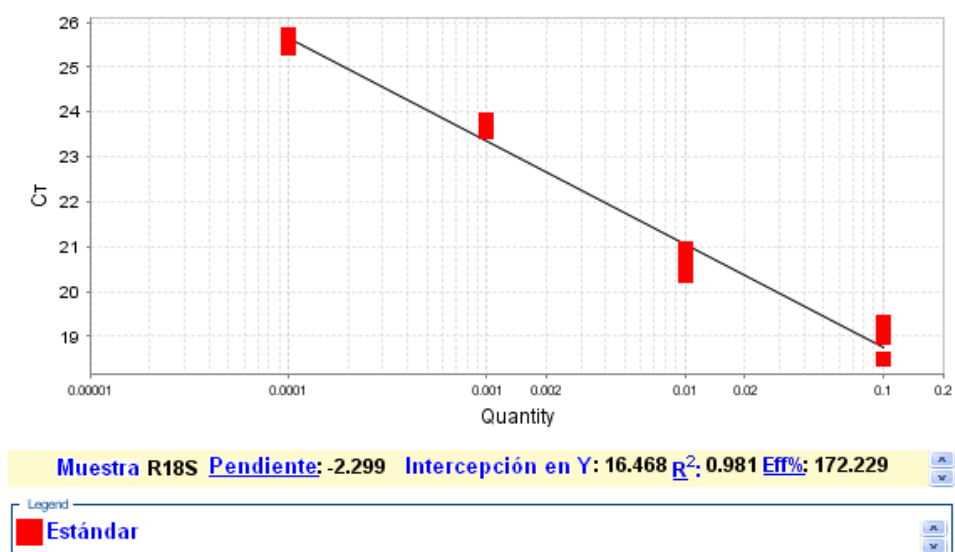


Figura 40. Curva de aumento de detección del gen R18s al aumentar su concentración. Se ve un comportamiento lineal respecto a la disminución del Ct al aumentar la concentración del templado.

En el método de cuantificación relativa se tomó la expresión obtenida del tratamiento control a pH 8.0 como 1, y los valores obtenidos de los tratamientos a pH 7.7 y 7.5 se calcularon a partir de esto por el método  $\Delta\Delta CT$ .

En la expresión relativa de anhidrasa carbónica en larvas de 4 brazos se encontró un incremento de las medias de 2.48 veces en cultivos a pH 7.7 y de 5.9 veces en cultivos a pH 7.5 en relación con el control a pH 8.0 (Fig. 41).

En larvas de 8 brazos el incremento en la expresión relativa de anhidrasa carbónica fue de 1.04 veces en cultivos a pH 7.7 y de 2.07 veces en cultivos a pH 7.5, siendo este último un incremento significativo ( $P=0.01$  a  $0.05$ ) (Fig. 42).

En larvas competentes en los cultivos a pH 7.7 se obtuvo un aumento de la expresión relativa de anhidrasa carbónica de 5.45 veces, lo cual fue significativo ( $P=0.01$  a  $0.05$ ), y en cultivos a pH 7.5 el aumento fue de 1.06 veces al comparar con el control (Fig. 43).

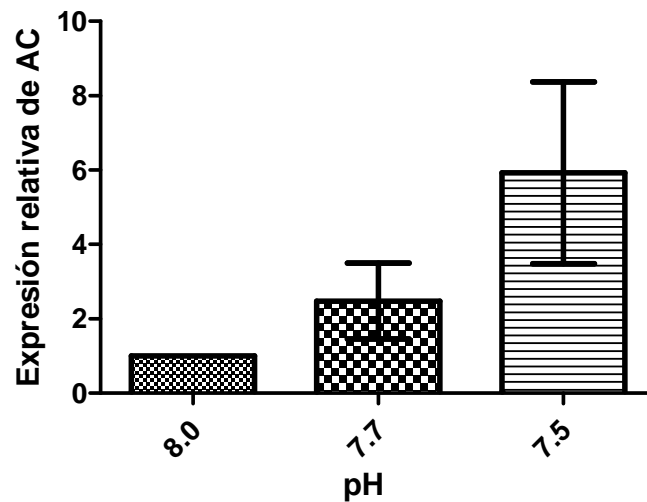


Figura 41. Expresión relativa de la anhidrasa carbónica en larvas de 4 brazos usando como control la expresión de R18s. Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar. Diferencia no significativa  $P>0.05$ .  $n=5$ .

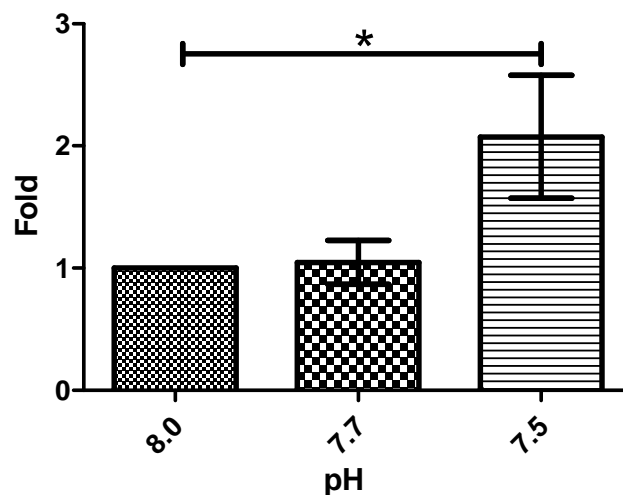


Figura 42. Expresión relativa de la anhidrasa carbónica en larvas de 8 brazos usando como control la expresión de R18s. Las barras verticales representan el promedio de larvas

observadas  $\pm$  error estándar, la barra horizontal une tratamientos con diferencias estadísticas significativas. \* P=0.01 a 0.05.

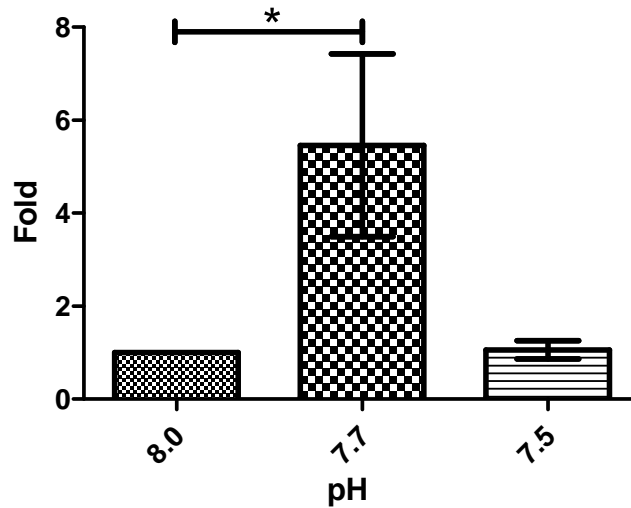


Figura 43. Expresión relativa de la anhidrasa carbónica en larvas competentes usando como control la expresión de R18s. Las barras verticales representan el promedio de larvas observadas  $\pm$  error estándar, la barra horizontal une tratamientos con diferencias estadísticas significativas. \*P=0.01 a 0.05.

Mediante la revisión de las curvas “melt” se pudo comprobar que no hubiera amplificación no específica para cada uno de los genes; es decir que el único producto de la amplificación del PCR fuera de los cebadores utilizados, ya sea para anhidrasa carbónica o R18s y que los cambios de expresión relativa pudieran ser atribuidos solo al gen de interés como lo muestran las figuras 44, 45 y 46.

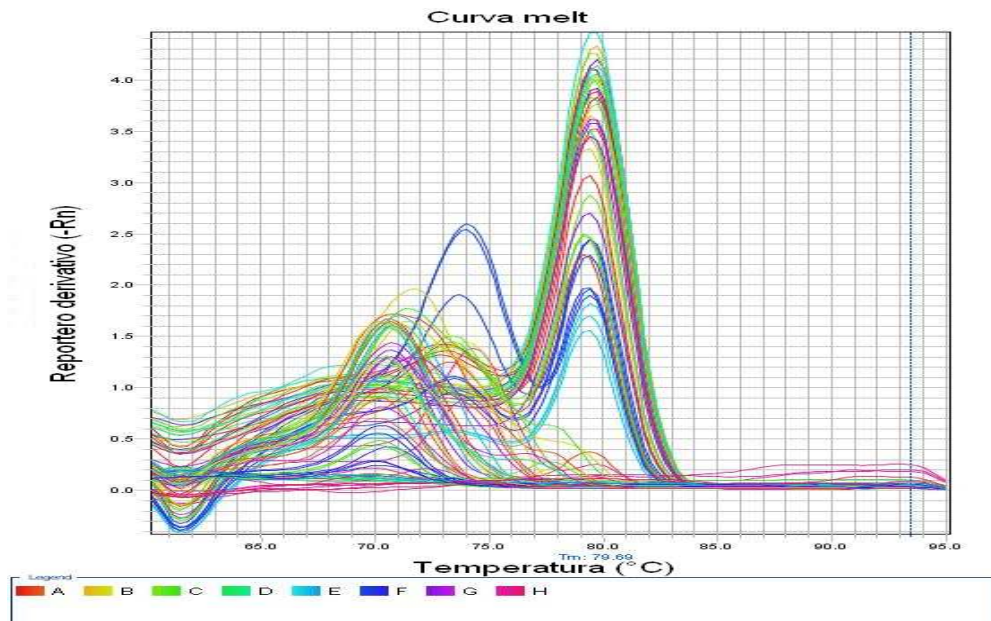


Figura 44. Curva melt de anhídrido carbónico y R18s en larvas de 4 brazos en 3 condiciones de pH, 8.0, 7.7 y 7.5. Cada pico indica la amplificación de un producto y cada color indica una muestra. n=5

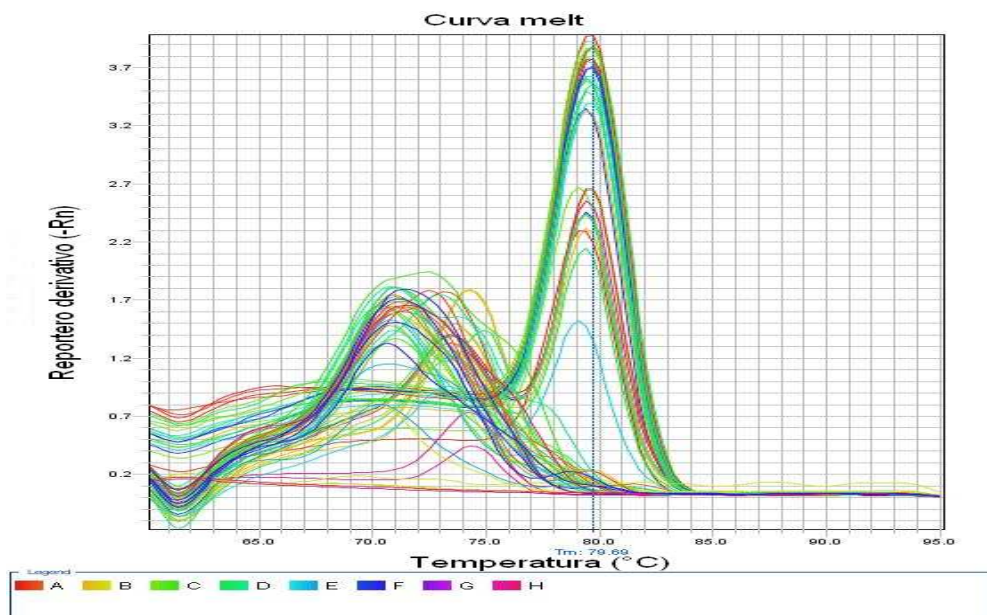


Figura 45. Curva melt de anhídrido carbónico y R18s en larvas de 8 brazos en 3 condiciones de pH, 8.0, 7.7 y 7.5. Cada pico indica la amplificación de un producto y cada color indica una muestra. n=5.

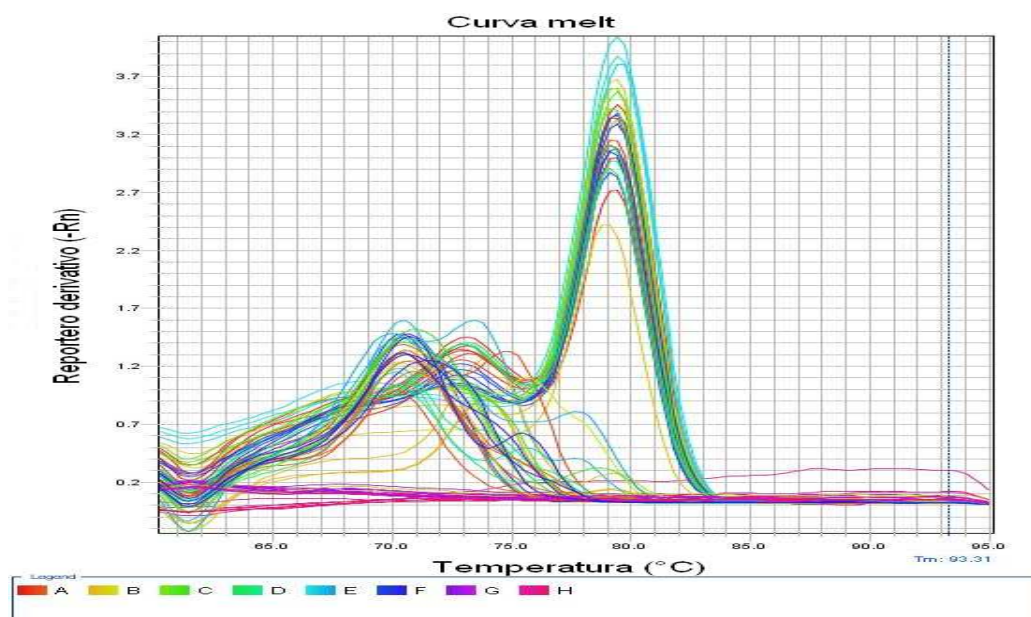


Figura 46. Curva melt de anhidrasa carbónica y R18s en larvas competentes en 3 condiciones de pH, 8.0, 7.7 y 7.5. Cada pico indica la amplificación de un producto y cada color indica una muestra. n=5.

## DISCUSIÓN

El efecto que tiene la acidificación del medio en el desarrollo larval fue distinto para los diferentes estadios larvales, lo que podría deberse a las prioridades del desarrollo en cada etapa específica (crecimiento, formación de brazos, formación de rudimento entre otros). Desde el estadio de prisma a competencia la larva aumenta un poco más del doble de su longitud (de 311 a 699  $\mu\text{m}$ ), incrementa su contenido proteico de 130 a 600 ng, su tasa metabólica aumenta 28 veces y el volumen larval aumenta 3 veces, el incremento de talla en los primeros estadios es principalmente por elongación de brazos, para aumentar la banda ciliada y así mantener la capacidad alimenticia respecto al tamaño larval, después de la formación de los 8 brazos el crecimiento empieza a ser

alométrico y se empieza a formar el rudimento juvenil (McEdward y Herrera 1984). Por lo tanto, en los primeros estadios de desarrollo (equinopluteus de 4 y 6 brazos), el crecimiento está determinado por la disponibilidad de alimento para las larvas.

Aunque el costo de síntesis por proteína no varía dependiendo del estadio larval, tasa de síntesis, tamaño larval ni estado fisiológico de alimentación (Pace y Manahan 2006), sí ocurre crecimiento alométrico, principalmente en el crecimiento de brazos postorales y posterodorsales y la formación del rudimento (McEdward 1999). Además la tasa metabólica va en aumento desde la fertilización hasta llegar a la competencia, donde disminuye (Bryan 2004).

Todo esto nos indica que la formación del rudimento implica un alto costo energético, y si se le suma la energía que se requiere para compensar el encontrarse en un ambiente más ácido del considerado como promedio para el océano (pH 8.01), esta etapa del desarrollo larvario (la formación del rudimento juvenil), resulta particularmente sensible y pudiera llevar a un agotamiento energético mayor que pudiera tener consecuencias al momento del asentamiento y la metamorfosis.

Entonces al no variar el costo energético por proteína sintetizada, los cambios observados pueden explicarse por la dificultad asociada a la disminución de la disponibilidad de elementos para la calcificación, al incrementarse la necesidad de estos, con la calcificación de elementos constitutivos del rudimento juvenil, como lo son la testa y las espinas juveniles. Lo anterior podría respaldar los

resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde según los análisis químicos del agua donde se mantuvieron los cultivos, aquellos en los que estuvieron a pH 7.5 mostraron condiciones “corrosivas” y con posibles implicaciones para la calcificación.

En el presente estudio se encontró que la exposición de la galleta de mar *Dendraster excentricus* de 4 y 6 brazos a condiciones de pH disminuido tuvo como consecuencia una reducción en el tamaño larval; lo anterior coincide con lo reportado por O'Donnell et al. (2010) en el erizo *Lytechinus pictus*. También se han sido reportado cambios morfológicos en *Dendraster excentricus* por Chan et al. (2011) quienes sugieren que estas modificaciones en la morfología podrían ser adaptaciones a cuerpos de menor tamaño y con menor calcificación, que mantienen su movilidad a expensas de disminuir su capacidad digestiva. Lo anterior podría explicar los cambios de longitud de los brazos transversales y ancho larval, que al aumentar de longitud cambian la forma larval. Lo anterior se observó con mayor claridad en larvas en estadio de 8 brazos, donde sin haber cambios significativos en la medición total del esqueleto ni en la suma de los brazos transversales y postorales si hubo cambios significativos en la longitud del brazo transversal. Estas larvas fueron de mayor tamaño que en el tratamiento control sin aumentar la longitud del esqueleto, pero al analizar los niveles de ceniza se encontró con una disminución en las mismas, lo que puede representar un menor grado de calcificación, que se traduciría en un esqueleto frágil y poroso comparado con el

de las larvas que se mantuvieron a pH 8.0. Lo anterior ha sido reportado en otros estudios en equinoideos, como consecuencia de ser cultivadas las larvas a pH disminuido hasta 7.6 (Clark et al. 2009). Para comprobar si la reducción en cenizas obtenida en el presente trabajo coincide con un esqueleto más frágil, será necesario hacer estudios con microscopía electrónica de barrido, y verificar visualmente las variaciones en la formación de la estructura esquelética de las larvas. La disminución en cantidad de ceniza podría deberse a la disolución de los elementos esqueléticos, en juveniles del erizo *Lytechinus variegatus* se ha reportado que al ser cultivados a pH disminuido (pH 7.96 y 7.83) tuvieron un menor crecimiento y presentaron degradación en sus espinas, explican que la disolución de los componentes calcáreos podría ser una estrategia para compensar los cambios de pH internos (Albright et al. 2012). También se ha reportado disolución de elementos calcáreos en larvas del erizo *Heliocidaris erythrogramma* y el abulón *Haliotis coccoradiata* al ser expuestos a pH 7.8 y 7.6 (Byrne et al. 2011).

En este estudio se encontró que larvas competentes cultivadas a pH 7.7 fueron más largas y más angostas que las cultivadas a pH 8.0 y 7.5. La parte del ancho larval en este estadio corresponde básicamente a la región que abarca el rudimento juvenil, por lo que se esperaría que después de la metamorfosis estas larvas menos anchas produjeran juveniles de menor tamaño, lo que resultó coincidente con lo que encontramos en el presente estudio. La similitud entre los tratamientos extremos, al tener el tratamiento intermedio tan diferente

es algo que no se ha visto en otros trabajos sobre el efecto de la acidificación en el desarrollo larval. Podría ser que a pH 7.7 hay un aumento en la síntesis del defensoma (grupo de genes que responden a estrés) como se ha visto en organismos expuestos a estrés térmico (Hofmann y Todgham 2010), a expensas del crecimiento, pero en pH 7.5 podría ser que se sobrepasa el límite de expresión del precursor o de algún elemento en la cadena para la expresión de la anhidrasa carbónica y su expresión cae a niveles cercanos al control. Lo anterior podría ser indicativo de que la energía que a pH 7.7 es utilizada en aumentar síntesis de anhidrasa carbónica (y en conjunto de todas las proteínas del defensoma y mecanismos de respuesta al estrés), a pH 7.5 puede ser utilizada en otros procesos, como crecimiento, aunque esto no explicaría las diferencias encontradas en la cantidad de ceniza. Una explicación alternativa podría ser que los organismos competentes y las postlarvas cultivadas a pH 7.5 presentan alteraciones crónicas y de efectos tardíos, en aspectos que no se cuantificaron en este trabajo, y que podrían reflejarse una vez que los juveniles intensifican su crecimiento a partir de la metamorfosis, lo que podría explicar el que se comporten igual que los organismos cultivados en el pH control. Sería interesante explorar elementos de la respuesta energética de los organismos para explicar alteraciones no manifestadas en el presente estudio. Por ejemplo estudios realizados con estresores como la anoxia han documentado que la producción de ATP disminuye ante este estrés en peces (Staples y Buck 2009), pero en estudios en branquias de los peces *Gobionotothen gibberifrons* y

*Notothenia coriiceps* encontraron que al estar en ambientes de  $p\text{CO}_2$  aumentado, se mantenía constante la producción de energía, sin embargo el consumo de energía utilizado en regulación iónica, síntesis proteica y de RNA aumentaba, por lo que hay un cambio en el presupuesto energético disponible para los procesos celulares (Deigweiher et al. 2010). Lo anterior coincide con lo encontrado por Stumpp et al. (2011) quienes reportan un aumento en la expresión de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que participa en la regulación ácido-base.

En cuanto a los cambios en la calcificación, en este trabajo se encontró aumento gradual dependiente del pH en la expresión de la anhidrasa carbónica de las larvas de 4 y 8 brazos cultivadas a pH 7.7 y 7.5. Esto coincide con lo encontrado en *Paracentrotus lividus* expuestos a 6 condiciones de pH diferentes entre 8.1 y 7.0, donde observaron aumento en la expresión de genes involucrados con la biomineralización (Martin et al. 2011). En cuanto a la anhidrasa carbónica, en *Strongylocentrotus purpuratus* también se ha reportado un aumento en su expresión al someter a larvas a pH 7.96 y 7.88 (Todgham y Hofmann 2009), lo que coincide con los resultados del presente trabajo, pero difiere de lo reportado para el erizo *Lytechinus pictus* en tratamientos de pH de 7.93 como control y 7.87 y 7.78 como medio acidificado (O'Donnell et al. 2010) donde se encontró disminución en la expresión de genes involucrados con la calcificación, aunque estos autores no midieron la expresión de la anhidrasa carbónica. En contraste, los resultados reportados por Stumpp et al. (2011) en el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* mostraron una disminución en la

expresión de anhidrasa carbónica en larvas de hasta 7 días después de la fertilización a pH 7.7. Todos estos trabajos de expresión genética estudiaron larvas solamente durante los primeros estadios que incluyen hasta el estadio de equinopluteus de 4 brazos, a diferencia del presente estudio, en donde se llevó el seguimiento del desarrollo a partir de la fertilización y hasta la metamorfosis de las larvas.

En las larvas competentes al igual que en las mediciones morfométricas, en la expresión de la anhidrasa carbónica también tuvo similitudes entre los valores obtenidos de los cultivos a pH 8.0 y 7.5 mientras que en los valores de 7.7 hubo un aumento significativo en la expresión de este gen.

La razón por la cual se encontró aumento de expresión de anhidrasa carbónica podría ser debido a que al aumentar la dificultad de la calcificación se trata de compensar sintetizando más anhidrasa carbónica. Lo anterior posiblemente no haya sido suficiente para llevar a cabo la biomineralización a niveles normales, considerando que la cantidad de ceniza fue mayor en el tratamiento control. Para las condiciones experimentales probadas, la cantidad de cenizas cuantificada en el tratamiento control, podrían considerarse como más aproximados a una biomineralización suficiente y que represente mejor lo que ocurre en el océano con niveles de pH muy cercanos a 8.0. A pesar del incremento en la expresión de la anhidrasa carbónica, esos niveles no resultarían suficientes para mantener una biomineralización constante y podrían tener como consecuencia una disminución en la longitud del esqueleto, en la

forma y tamaño de la larva y en la calidad de la calcificación, como lo encontramos en el presente estudio. De acuerdo a los análisis químicos del agua donde se mantuvieron los cultivos, aquellos que estuvieron a pH 7.5 estuvieron en condiciones que pueden considerarse corrosivas y que pudieran haber limitado la calcificación.

El tamaño reducido de las larvas de estadios tempranos limita su obtención de alimento y si éste es escaso podría prolongar su permanencia en la columna de agua y aumentar la probabilidad de ser depredadas (Hart y Strathmann 1994), además de que se ha documentado que los depredadores prefieren consumir larvas de menor tamaño (Allen 2008), e incluso se ha reportado que una disminución en la alimentación durante el periodo larval disminuye la tasa de crecimiento en juveniles (Pechenik 1999). Esto junto a la disminución de calcificación los hará vulnerables, y aunque lleguen a juveniles, podrían tener un déficit energético que limite sus capacidades de llegar a adultos (Dupont et al. 2012).

Los resultados del presente trabajo indican que la disminución del pH del medio a 7.7 y 7.5 afectará el desarrollo larval, cambiando la morfología larval, con repercusiones en la alimentación y crecimiento, disminuirá la calcificación, que puede afectar la sobrevivencia larval e integridad y resistencia de los elementos calcáreos, y además afectará los niveles de expresión de genes como la anhidrasa carbónica, lo que puede hacer que disminuya la síntesis de otras proteínas, al reducirse la energía disponible para los demás procesos.

## **CONCLUSIONES**

La disminución de pH no afectó la sobrevivencia de las larvas pero si afectó la morfología, expresión de anhidrasa carbónica y calcificación, estimada esta última por medio de las cenizas.

Los resultados indican que las larvas de estadios tempranos al estar en un medio con pH disminuido y menor disponibilidad de iones necesarios para la calcificación tratan de compensar este déficit con un aumento de la síntesis de la anhidrasa carbónica, pero los resultados de ceniza indican que la calcificación en estos organismos fue menor que en condiciones control, por lo que una estrategia a la menor capacidad de calcificación podría ser tener un cuerpo más pequeño.

Se obtuvieron resultados con correlación inversa a partir de la cuantificación de anhidrasa carbónica y de ceniza.

Según escenarios de cambio climático se espera una disminución de pH del mar a 7.8 para el año 2100 (Orr et al. 2005), esto no parece que tenga impacto directo en la sobrevivencia larval, pero puede ocasionar que las larvas tengan un desgaste energético y presenten un esqueleto más frágil y podrían ser más vulnerables al medio y a depredadores; asimismo, podrían presentar alteraciones crónicas que se manifiesten más adelante durante su ciclo de vida.

## Recomendaciones

- Hacer experimentos de choque ácido para ver cómo reaccionan ante cambios abruptos de pH, en lugar de exposición prolongada, como en este estudio.
- Realizar experimentos para probar el efecto sinérgico del aumento de temperatura con disminución de pH e incluso agregar otras variantes como salinidad y oxígeno para tener un panorama más cercano a cómo serán las condiciones a las que estarán expuestos los organismos en un futuro.
- Realizar estudios para determinar la integridad de las espículas producidas en los diferentes escenarios de pH.
- Estudiar la integridad o calidad del rudimento, probando su fragilidad, el tamaño de sus estructuras internas, o midiendo reservas energéticas.

## Referencias

- Albright, R., C. Bland, P. Gillette, J. E. Serafy, C. Langdon y T. R. Capo. 2012. Juvenile growth of the tropical sea urchin *Lytechinus Variegatus* exposed to near-future ocean acidification scenarios. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 426-427: 12–17
- Alin, S. R., R. A. Feely, A. G. Dickson, J. M. Hernández-Ayón, L. W. Juranek, M. D. Ohman y R. Goericke. 2012. Robust empirical relationships for estimating the carbonate system in the southern California Current System and application to CalCOFI hydrographic cruise data (2005–2011). *J. Geophysical Research* 117: C05033
- Allen, J. D. 2008. "Size-specific predation on marine invertebrate larvae". *Biological Bulletin* 214: 42-49

- Appelhans Y, S, J. Thomsen, C. Pansch, F. Melzner, M. Wahl .2012. Sour times: seawater acidification effects on growth, feeding behaviour and acid–base status of *Asterias rubens* and *Carcinus maenas*. *Marine Ecology Progress Series* 459:85-98
- Bakun, A. 1990. Global climate change and intensification of coastal ocean upwelling. *Science* 247: 198–201.
- Beniash E., J. Aizenberg, L. Addadi y S. Weiner. 1997. Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. *Proceedings of the Royal Society* 264: 461-465.
- Bryan, P. J. 2004. Energetic cost of development through metamorphosis for the seastar *Mediaster aequalis* (Stimpson). *Marine Biology* 145: 293-302
- Burnett, L. E, T. N. Dunn y R. L. Infantino. 1985. The function of carbonic anhydrase in crustacean gills. transport processes, iono-and osmoregulation, Springer, Berlin: 159–168.
- Byrne, M., M. Ho, P. Selvakumaraswamy, H. D. Nguyen, S. A. Dworjanyn y A. R. Davis. 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 1883–1888.
- Byrne M., N. A. Soars, M. A. Ho, E. Wong, D. McElroy, P. Selvakumaraswamy, S. A. Dworjanyn y A. R. Davis. 2010a. Fertilization in a suite of coastal marine invertebrates from SE Australia is robust to near-future ocean warming and acidification. *Marine Biology* 157: 2061-2069
- Byrne M., N. Soars, P. Selvakumaraswamy, S. A. Dworjan y A. R. Davis. 2010b. Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO<sub>2</sub> ocean across a range of sperm densities. *Marine environmental research* 69: 234-239
- Byrne M., M. Ho, E. Wong, N. A. Soars, P. Selvakumaraswamy, H. Shepard-Brennan, S. A. Dworjanyn y A. R. Davis. 2011. Unshelled abalone and corrupted urchins: development of marine calcifiers in a changing ocean. *Proceedings of the Royal Society, Biological sciences* 278: 2376-2383
- Caldeira, K. y M. E. Wickett. 2003. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425:365.
- Chan, K. y K., D. Grünbaum y Michael J. O'Donnell. 2011. Effects of ocean-acidification-induced morphological changes on larval swimming and feeding. *The Journal of Experimental Biology* 214: 3857–67.

- Chen C. P. y B. Y. Chen. 1992. Effects of high temperature on larval development and metamorphosis of *Arachnoides placenta* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine biology* 12: 445-449.
- Clark, D., M. Lamare y M. Barker. 2009. Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Marine Biology* 156: 1125–1137.
- Crim R. N., J. M., Sunday y C. D. G. Harley. 2011. Elevated seawater CO<sub>2</sub> concentrations impair larval development and reduce larval survival in endangered northern abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 272-277.
- Deigweier, K., T. Hirse, C. Bock, M. Lucassen y H. O. Pörtner. 2009: Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenioids, *Journal of comparative physiology b* 180: 347-359
- Dupont, S., J. Havenhand, W. Thorndyke, L. Peck y M. Thorndyke. 2008. Near-future level of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Marine Ecology Progress Series* 373: 285–294.
- Dupont S., N. Dorey, M. Stumpp, F. Melzner y M. Thorndyke. 2012. Long term and trans life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine biology* publicado en línea marzo 2012
- Edmunds P. J., D. Brown y V. Moriarty. 2012. “Interactive effects of ocean acidification and temperature on two scleractinian corals from Moorea, French Polynesia”. *Global Change Biology* 18: 2173–2183.
- Edwards, M. y A. J. Richardson. 2004. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. *Nature* 430: 881–884.
- Emllet, R. B. 1983. Locomotion, drag, and the rigid skeleton of larval echinoderms. *The Biological Bulletin* 164: 433–445
- Feely, R. A., C. L. Sabine, K. Lee, F. J. Millero, M. F. Lamb, D. Greeley, J. L. Bullister, R. M. Key, A. Kozyr, T. Ono y C. S. Wong. 2002. In situ calcium carbonate dissolution in the Pacific Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 16: 1–12.
- Feely, R. A. C. L. Sabine, K. Lee, W. Berelson, J. Kleypas, V. J. Fabry y F. J. Millero. 2004. Impact of anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> system in the oceans. *Science* 305: 362-366

- Feely, R. A., C. L. Sabine, J. M. Hernandez-ayon, D. Ianson y B. Hales. 2008. Evidence for upwelling of corrosive continental acidified water onto the continental shelf. *Science* 1490: 1–4.
- Floch, M. L., B. Bereiter, T. Blunier, J. Barnola, U. Siegenthaler, D. Raynaud, J. Jouzel, H. Fischer, K. Kawamura, y T. F Stocker. 2008. High-resolution carbon dioxide concentration record. *Carbon* 453: 379–382.
- Frommel A. Y., A. Schubert, U. Piatkowski y C. Clemmesen. 2012. Egg and early larval stages of Baltic cod, *Gadus morhua*, are robust to high levels of ocean acidification. *Marine Biology* publicado en línea enero 2012.
- Gazeau, F., C. Quiblier, J. M. Jansen, J. Gattuso, J. J. Middelburg y C. H. R. Heip. 2007. Impact of elevated CO<sub>2</sub> on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters* 34: 1–5.
- Gibson, R. N., R. J. A. Atkinson, J. D. M. Gordon, I. P. Smith y D. J. Hughes. 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 49: 1–42.
- Guinotte J. M., V. J. Fabry. 2008. Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1134: 320–342
- Harley, C. D. G., A. R. Hughes, M. Kristin, B. G. Miner, C. J. B. Sorte y S. Carol. 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters* 9: 228–241.
- Hart M. W. y R. R. Strathmann. 1994. Functional consequences of phenotypic plasticity in echinoid larvae. *Biological Bulletin* 186: 291-299
- Havenhand, J. N. y P. Schlegel. 2009. Near-future levels of ocean acidification do not affect sperm motility and fertilization kinetics in the oyster *Crassostrea Gigas*. *Biogeosciences* 2: 3009–3015.
- Havenhand, J. N. 2008. Near-future levels of ocean acidification reduce fertilization success in a sea urchin. *Current Biology* 18: 651–652.
- Hochachka, P. W. y G. N. Somero. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York Oxford University Press. Biochemistry and Molecular Biology Education. Vol. 30. Oxford University Press.

- Hoegh-Guldberg O, P. J. Mumby, A. J. Hooten, R. S. Steneck, P. Greenfield, E. Gomez, C. D. Harvell, P. F. Sale, A. J. Edwards, K. Caldeira, N. Knowlton, C. M. Eakin, R. Iglesias-Prieto, N. Muthiga, R. H. Bradbury, A. Dubi y M. E. Hatzioios. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 14: 1737-1742.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. "The fourth assessment report of the IPCC". Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Kroeker, K. J., F. Micheli, M. C. Gambi y T. R. Martz. 2011. Divergent ecosystem responses within a benthic marine community to ocean acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14515–14520.
- Kuffner, I. B., A. J. Andersson, P. L. Jokiel, K. S. Rodgers y F. T. Mackenzie. 2007. Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification. *Nature, Geoscience* 1: 114–117.
- Kurihara, H., S. Shimode y Y. Shirayama. 2004. Sub-lethal effects of elevated concentration of CO<sub>2</sub> on planktonic copepods and sea urchins. *Journal of Oceanography* 60: 743–750.
- Kurihara, H. y Y. Shirayama. 2004. Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on sea urchin early development. *Marine Ecology Progress Series* 274: 161–169.
- Love, Al. C., M. E. Andrews y R. A. Raff. 2007. Gene expression patterns in a novel animal appendage: the sea urchin pluteus arm. *Evolution & Development* 9: 51–68.
- Martin, S., S. Richier, M. Pedrotti, S. Dupont, C. Castejon, Y. Gerakis, M. Kerros, F. Oberhänsli, J. Teyssié, R. Jeffree y J. Gattuso. 2011. Early development and molecular plasticity in the mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO<sub>2</sub>-driven acidification. *The Journal of Experimental Biology* 214: 1357–68.
- McEdward L. R. 1984. Morphometric and metabolic analysis of the growth and form of an echinopluteus. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 82: 259–287
- McEdward L. R. y J. C. Herrera. 1999. Body form and skeletal morphometrics during larval development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* Lamarck. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 232: 151–176.

- Merrill R. J. y E. S. Hobson. 1970. Field observations of *Dendraster excentricus*, a sand dollar of western North America. *American Midland Naturalist* 8: 595-624
- Michaelidis, B., C. Ouzounis, A. Palaras y H. Pörtner. 2005. Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series* 293: 109–118.
- Mitsunaga, K., K. Akasaka, H. Shimada, Y. Fujino, I. Yasumasu y H. Numanoi. 1986. Carbonic anhydrase activity in developing sea urchin embryos with special reference to calcification of spicules. *Cell Differentiation* 18: 257–262.
- Morita, M., R. Suwa, A. Iguchi, M. Nakamura, K. Shimada, K. Sakai y A. Suzuki. 2010. Ocean acidification reduces sperm flagellar motility in broadcast spawning reef invertebrates. *Zygote* 18: 103–7.
- Mooi, R. 2007. Sand dollars of the genus *Dendraster* (Echinoidea: Clypeasteroidea): Phylogenetic systematics, heterochrony, and distribution of extant species. *Bulletin of marine science* 61: 343-375
- Mortensen, Theodor. 1931. Contributions to the Study of the Development and Larval Forms of Echinoderms, 1/2-4. København: A.F. Hølst & Søn. I-39
- Munday P. L., Gagliano M., Donelson J. M., Dixson D. L., Thorrold S. R. 2011. Ocean acidification does not affect the early life history development of a tropical marine fish. *Marine Ecology Progress Series* 423:211-221
- Nakamura M., Morita M. 2012. Sperm motility of the scleractinian coral *Acropora digitifera* under preindustrial, current, and predicted ocean acidification regimes. *Aquatic Biology* 15: 299-302.
- Nakano, E., K. Okazaki y T. Iwamatsu. 1963. Accumulation of radioactive calcium in larvae of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Marine Biological Laboratory* 125: 125–132.
- Orr, J. C., V. J. Fabry, O. Aumont, L. Bopp, S. C. Doney, R. A. Feely, A. Gnanadesikan, N. Gruber, A. Ishida, F. Joos, R. M. Key, K. Lindsay, E. Maier-Reimer, R. Matear, P. Monfray, A. Mouchet, R. G. Najjar, G.-K. Plattner, K. B. Rodgers, C. L. Sabine, J. L. Sarmiento, R. Schlitzer, R. D. Slater, I. J. Totterdell, M. Weirig, Y. Yamanaka y A. Yool. 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437: 681–6.

- O'Donnell, Michael J. 2008. Predicted impact of ocean acidification on a marine invertebrate: elevated CO<sub>2</sub> alters response to thermal stress in sea urchin larvae. *Marine Biology* 156: 439–446.
- O'Donnell, M. J., A. E. Todgham, M. A. Sewell, L. M. Hammond, K. Ruggiero, N. A. Fangué, M. I. Zippay y G. E. Hofmann. 2010. Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. *Marine Ecology Progress Series* 398: 157–171.
- Olivares-Bañuelos T., S. Figueroa-Flores, E. Carpizo-Ituarte. 2012. Índice gonadal y desarrollo larvario de la galleta de mar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) en Baja California, México. *Ciencias Marinas* 38: 411-425.
- Parker, L. M., Ross, P. M. y O'Connor, W. A. 2009. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Global Change Biology* 15: 2123–2136.
- Pechenik J. A. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series* 177: 269-297.
- Pennington, J. T. 1985. The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biological Bulletin* 169: 417–430.
- Porzio L., M. C. Buia, y J. M. Hall-Spencer 2011. Effects of ocean acidification on macroalgal communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 278–287.
- Raven, J., K. Caldeira, H. Elderfield, O. Hoegh-Guldberg, P. Liss, U. Riebesell, J. Shepherd, C. Turley y A. Watson. 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *Coral Reefs* 5: 1–60.
- Reuter, K. E., K. E. Lotterhos, R. N. Crim, C. A. Thompson y C. D. G. Harley. 2011. Elevated pCO<sub>2</sub> increases sperm limitation and risk of polyspermy in the red sea urchin *Strongylocentrotus Franciscanus*. *Global Change Biology* 17: 163–171.
- Ries J. B., A. L. Cohen y D. C. McCorkle. 2009. Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification. *Geology* 37: 1131-1134.
- Rykaczewski, R. R. y D. M. Checkley. 2008. Influence of ocean winds on the pelagic ecosystem in upwelling regions. *PNAS* 105: 1965–1970.
- Sabine, C. L., R. A. Feely, N. Gruber, R. M. Key y K. Lee. 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science* 305: 367–371.

- Sheppard-Brennand H., N. Soars, S. A. Dworjanyn, A. R. Davis, M. Byrne. 2010. Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *PLoS ONE* 5: e11372.
- Shirayama, Y. y H. Thornton. 2005. Effect of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on shallow water marine benthos. *Journal of Geophysical Research* 110: C09S08
- Somero, G. N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology* 42: 780–789.
- Somero, G. N. 2011. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *American Journal of Physiology Regulatory, integrative and comparative Physiology* 301: R1-R14
- Spicer, J. I., A. Raffo y S. Widdicombe. 2007. Influence of CO<sub>2</sub>-related seawater acidification on extracellular acid–base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. *Marine Biology* 151: 1117–1125.
- Strathmann, M. F. 1987. Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast. University of Washington Press. 684pp.
- Strathmann, R. R. 1971. The feeding of echinoderm larvae: mechanisms, regulation, feeding and rate of suspension. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 6: 109–160.
- Stumpp, M., S. Dupont, M. C. Thorndyke y F. Melzner. 2011. CO<sub>2</sub> induced acidification impacts sea urchin larval development II: gene expression patterns in pluteus larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 160: 331–340.
- Stumpp, M., J. Wren, F. Melzner, M. C. Thorndyke y S. Dupont. 2011. CO<sub>2</sub> induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 160: 320-331
- Todgham, A. E. y G. E. Hofmann. 2009. Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification. *Experimental Biology* 212: 2579-2594.
- Todgham, A. E. y G. E. Hofmann. 2010. Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual Review of Physiology*. 72: 127-148

- Waldbusser G.G., H. Bergschneider y M. A. Green. 2010. Size-dependent pH effect on calcification in post-larval hard clam *Mercenaria spp.* *Marine Ecology Progress Series* 417:171-182
- Weydmanna A., J. E. Søreideb, S. Kwasniewskia y S. Widdicombe. 2012. Influence of CO<sub>2</sub>-induced acidification on the reproduction of a key Arctic copepod *Calanus glacialis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 428: 39–42
- Wood, H. L., J. I. Spicer y S. Widdicombe. 2008. Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 275: 1767–73.
- Yu, P. C., P. G. Matson, T. R. Martz y G. E. Hofmann. 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 pCO<sub>2</sub>/pH. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 288–295.