



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**RESPUESTAS METABÓLICAS DE**  
*Nodipecten subnodosus* (PECTINIDAE)  
**EXPUESTA A HIPERTERMIA EN SINERGIA**  
**CON HIPOXIA Y EL ESTADO REPRODUCTIVO**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

ROSA LINDA SALGADO GARCÍA

LA PAZ, B. C. S., JULIO DEL 2020.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 15 del mes de Julio del año 2020

El (la) que suscribe M en C. ROSA LINDA SALGADO GARCÍA Alumno (a) del Programa

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro B161003 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ Y DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV

y cede los derechos del trabajo titulado:

"Respuestas metabólicas de *Nodipecten subnodosus* (Pectinidae) expuesta a

hipertermia en sinergia con hipoxia y el estado reproductivo"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: rsalgadog1600@alumno.ipn.mx - marellam@ipn.mx -

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M en C. ROSA LINDA SALGADO GARCÍA

*Nombre y firma del alumno*



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14  
REP 2017

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de  siendo las  horas del día  del mes de  del  se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de:  para examinar la tesis titulada:

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	SALGADO	Apellido Materno:	GARCÍA	Nombre (s):	ROSA LINDA
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	------------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 15 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI  NO  SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.

**JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:** *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

El 15% de similitud que arrojó el análisis en la plataforma Turnitin se localiza en Portada, Índices, citas en el texto (aspectos que son de uso común). Adicionalmente hay coincidencias menores. En todos los casos han sido adecuadamente referidas a la fuente original. Por lo tanto, se puede concluir que en el presente trabajo NO SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR**  la tesis por **UNANIMIDAD**  o **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:

“SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES”

**COMISIÓN REVISORA DE TESIS**

**DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ**  
Director de Tesis  
Nombre completo y firma

**DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ**  
Nombre completo y firma

**DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ**  
Nombre completo y firma

**DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV**  
Director de Tesis  
Nombre completo y firma

**DR. EDOUARD KRAFFE DE LAUBAREDE**  
Nombre completo y firma

**DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO**  
Nombre completo y firma  
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

*A quienes le dieron  
raíces a mis pies,  
y alas a mis sueños*

*María Guadalupe Vaca Lozoya*

*Berta Ma. de J. García Vaca*

*Alejandra Salgado García*

*Berenice Salgado García*

*Rosa Isela Valdez Ruíz*

## AGRADECIMIENTOS

Al instituto Politécnico Nacional que a través del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) hizo posibles mis estudios de doctorado.

A Edouard Kraffe de Laubarede, Ilie S. Racotta Dimitrov y Marcial Arellano Martínez por todas las enseñanzas y el apoyo para realizar este trabajo de investigación.

A los miembros de mi Comité revisor: Bertha Patricia Ceballos Vázquez y Renato Peña Martínez, por sus valiosos comentarios y su apoyo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la financiación otorgada para la realización de este trabajo de investigación a los siguientes proyectos: ECOS-ANUIES-CONACYT (262983), FOINS-CONACYT (266397) y SIP-IPN (20195375).

A todo el personal de *Pacific Clam* y al Laboratorio de Genética Acuícola CIBNOR por las facilidades otorgadas para el seguimiento del crecimiento de los organismos y el monitoreo de las variables ambientales, así como por la disponibilidad de organismos para realizar este estudio.

A Frédéric Jean, Sebastien Artigaud, Jonathan Flye-Sainte-Marie y Margaux Mathieu Resuge por todo su apoyo y entusiasmo durante mi estancia en el Institut Universitaire Européen de la Mer. Université de Brest, CNRS, IRD, Ifremer LEMAR y el Instituto de Recherche pour le Développement (IRD).

A M. Teresa Sicard González por sus valiosos comentarios y el apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A Gilberto González Soriano por todas las facilidades y el apoyo para la realización de los experimentos en el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos CIBNOR.

A José Luis Ramírez-Arce del Laboratorio de Genética Acuícola CIBNOR por toda su dedicación e invaluable apoyo para la obtención y manejo de los organismos en el campo y en el laboratorio.

A Arlett Robles Romo, Claudia Maytorena Verdugo, Miguel A. Tripp Valdez, Dulce Valeria Ramírez Rodríguez, Nairoby Pacheco Carlon y Laura T. Guzmán Villanueva por su entusiasmo y su invaluable contribución durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Alma R. Rivera Camacho del Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos CICIMAR-IPN y a Carmen Rodríguez Jaramillo del Laboratorio de Histología e Histoquímica CIBNOR por su contribución y las facilidades otorgadas para el análisis histológico de los organismos.

A Ma. Olivia Arjona López del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos CIBNOR por todo el apoyo recibido para el análisis de nucleótidos y arginina-fosfato por HPLC.

A Julián Alfonso Garzón Favela del Laboratorio de Microalgas CIBNOR por la disponibilidad de alimento vivo para los organismos.

A Arturo Sierra Beltrán y Delia Posadas Rojas del Laboratorio de Genética Molecular CIBNOR y a Laura Carreón Palau y Bertha Olivia Arredondo Vega del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas CIBNOR por todas las facilidades otorgadas para el análisis de muestras de proteínas.

A mi familia, por su infinito amor y paciencia, y a mis amigos, por ser y estar en todo momento.

Este trabajo de investigación generó:

**publicaciones científicas:**

Salgado-García, R. L., Kraffe, E., Maytorena-Verdugo, C. I., Tripp-Váldez, M., González-Soriano, G., Arellano-Martínez, M.I, Racotta, I.S. Insights into the effects of short acclimation on the metabolic response of scallops *Nodipecten subnodosus*. (en preparación).

Salgado-García, Rosa L., Kraffe, Edouard, Tripp-Valdez, Miguel. A., Ramírez-Arce, Jose. L., Artigaud, Sebastien, Flye-Sainte-Marie, Jonathan, Mathieu-Resuge, Margaux, Sicard, M. Teresa, Arellano-Martínez, Marcial, Racotta, Ilie. S. Energy metabolism of juvenile scallops *Nodipecten subnodosus* under acute temperature elevation and low oxygen availability. (sometido).

Salgado-García, Rosa L., Racotta, Ilie. S. Kraffe, Edouard, Arellano-Martínez, Marcial, Artigaud, Sebastien. Assessing proteome responses to elevated temperatures and acute hypoxia in the scallops *Nodipecten subnodosus*. (en preparación).

Salgado-García, R.L., Kraffe, E., Maytorena-Verdugo, C.I. Alma R. Rivera-Camacho, M. Teresa Sicard, Marcial Arellano-Martínez1 & Ilie S. Racotta. Metabolic responses of adult lion's paw scallops *Nodipecten subnodosus* exposed to acute hyperthermia in relation to seasonal reproductive effort. *Sci Rep* 10, 2449 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59242-6>.

**Ponencias:**

A multi-stress approach to study the impact of temperature and oxygen conditions on the lion's paw *Nodipecten subnodosus* physiology. In: summer school: Combining Modelling and Experimental approaches for Marine Organisms under Stress. Plouzané, Francia. 29 agosto a 2 septiembre del 2016.

# ÍNDICE GENERAL

---

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
RESUMEN .....	XIV
ABSTRACT .....	XVI
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 La mano de león <i>N. subnodosus</i>.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Taxonomía y anatomía .....	4
2.1.2 Ciclo de vida.....	5
2.1.3 Pesquerías y cultivos.....	6
<b>2.2 Respuestas metabólicas a hipertermia y baja disponibilidad de oxígeno .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Tolerancia térmica .....	9
2.2.2 Respuestas a hipoxia.....	11
<b>2.3 Metabolismo energético y la respuesta al ambiente.....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Carga energética adenilica.....	13
2.3.2 Fosfo-arginina.....	13
2.3.3 Metabolismo celular .....	14
2.3.4 Análisis del proteoma .....	17
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>
<b>V. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>20</b>

<b>5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>20</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>6.1 Sitio de cultivo y colecta de organismos.....</b>	<b>21</b>
<b>6.2 Monitoreo de variables ambientales .....</b>	<b>22</b>
<b>6.3 Monitoreo del crecimiento de los juveniles .....</b>	<b>22</b>
<b>VII RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>7.1 Monitoreo de variables ambientales .....</b>	<b>23</b>
<b>7.2 Biometría de los juveniles de mano de león.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>27</b>
<b>Efecto de la aclimatación corta en laboratorio sobre el estado energético de juveniles y reproductores de la mano de león <i>N. subnodosus</i> .....</b>	<b>27</b>
Resumen .....	27
Introducción.....	29
Materiales y métodos.....	30
Monitoreo de datos ambientales .....	30
Colecta de organismos .....	30
Muestreo de tejidos en el campo.....	31
Transporte de organismos.....	31
Aclimatación de organismos en el laboratorio.....	32
Muestreo después de una aclimatación corta al laboratorio.....	32
Índices morfométricos .....	32
Análisis histológico de las gónadas .....	33
Composición de nucleótidos .....	34
Contenido de Fosfo-arginina.....	35
Actividad de las enzimas metabólicas.....	35
Análisis estadísticos .....	37
Resultados.....	38
Tamaño e índices morfométricos de los juveniles .....	38
Composición de nucleótidos de los juveniles .....	38

Carga energética y contenido de fosfo-arginina de los juveniles .....	40
Enzimas metabólicas del músculo aductor de los juveniles.....	40
Análisis de componentes principales en el estado energético del músculo aductor de los juveniles .....	42
Enzimas metabólicas en el manto de los juveniles .....	43
Tamaño e índices morfométricos de los reproductores.....	45
Desarrollo de las gónadas de los reproductores .....	46
Composición de nucleótidos de los reproductores.....	48
Carga energética adenilica y contenido de ArgP de los reproductores .....	48
Enzimas metabólicas en el músculo aductor de los reproductores.....	50
Análisis de componentes principales en el estado energético del músculo aductor de los reproductores.....	53
Enzimas metabólicas en el manto de los reproductores.....	54
Discusión .....	57
Conclusión.....	64

## **CAPÍTULO 2 .....** **65**

### **Metabolismo energético de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* influenciados por el efecto combinado de la hipertermia aguda y la baja disponibilidad de oxígeno.....** **65**

Resumen .....	65
Introducción.....	66
Materiales y métodos.....	67
Datos ambientales de la zona de cultivo .....	67
Diseño experimental y medición del consumo de oxígeno.....	68
Muestreo de tejidos y tasa de mortalidad.....	70
Extracción y cuantificación de metabolitos .....	70
Actividad enzimática .....	70
Análisis de proteoma del manto de los juveniles .....	71
Precipitación y determinación de la concentración de proteínas.....	71
Digestión y preparación de proteínas para el análisis por espectrometría de masas .....	72
Análisis de espectrometría de Masas.....	72
Análisis estadístico .....	73
Resultados.....	75
Tamaño e índices morfométricos .....	75
Consumo de oxígeno y mortalidad .....	75
Composición de nucleótidos .....	76
Carga energética adenilica y contenido de ArgP .....	78
Enzimas metabólicas en el músculo aductor.....	78

Enzimas metabólicas en el manto .....	80
Efecto de la temperatura elevada y la hipoxia sobre el proteoma del manto .....	82
Discusión .....	87
Conclusión .....	94
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>95</b>
<b>Respuestas metabólicas de adultos de la mano de león <i>N. subnodosus</i> expuestos a condiciones de hipertermia aguda y esfuerzo reproductivo .....</b>	<b>95</b>
Resumen .....	95
Introducción.....	96
Materiales y Métodos .....	98
Sitio de colecta.....	98
Colecta de organismos .....	98
Diseño experimental y medición del consumo de oxígeno.....	98
Colecta de tejidos y análisis de desarrollo gonádico.....	99
Extracción y cuantificación de metabolitos .....	100
Actividad de enzimas metabólicas .....	100
Análisis estadístico .....	100
Resultados.....	100
Tamaño e Índices morfométricos.....	100
Consumo de oxígeno.....	101
Composición de Nucleótidos .....	103
Carga energética adenilica y contenido de ArgP .....	103
Enzimas metabólicas en el músculo aductor.....	105
Enzimas metabólicas en el manto .....	108
Discusión .....	111
Conclusión.....	115
<b>VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>116</b>
<b>IX. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>124</b>
<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>125</b>
<b>XI. REFERENCIAS .....</b>	<b>126</b>

<b>XII. ANEXOS .....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>147</b>
Cultivo de juveniles y reproductores de mano de león N. subnodosus.....	147
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>149</b>
Determinación de tiempo máximo de tolerancia de los juveniles de N. subnodosus a temperatura elevada combinada con hipoxia severa.....	149

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

FIGURA 1. Ejemplar adulto de *Nodipecten subnodosus* (altura:149mm, ancho:159mm) colectado a 20 m de profundidad en Baja California, México y clasificación taxonómica de la especie (Sowerby, 1835). Modificado de: pectensite.com. .... 4

FIGURA 2. Anatomía general de *Placopecten magellanicus* (Pectinidae). (1) Sección izquierda de la valva con el manto removido. (2) Sección derecha de la valva con el manto y las branquias removidos. ABV: Vaso branquias aferente. AU: aurícula. C: condróforo DB: banda de filamentos branquiales dorsal EBV: vaso branquial eferente, F: pie, G: branquia. GO: gónada, I: intestino, K: riñón, L: labios, LP: labio paleal, M: manto, O: esófago, PC: pericardio, PV: vasos paliales, R: recto, S: estómago, ST: tentáculo sensorial, SMAM: músculo aductor liso, STAM: músculo aductor estriado, V: velo. Tomado y modificado de: Drew 1906. Revisado en: Beninger y Le Pennec 2016. .... 5

FIGURA 3. Temperatura superficial del mar durante el verano (Julio, 2019) de la costa de la Península de Baja California, resolución 2.5 km obtenida del laboratorio del ambiente marino del Pacífico de la NOAA. Los colores reflejan la temperatura superficial del mar durante el verano (0 a 32°C). Los números indican los principales sitios de cultivo piloto de la mano de león *Nodipecten subnodosus*: (1) Bahía de los Ángeles (2) Guerrero Negro (3) laguna Ojo de Liebre (hacia el oeste) (4) San Roque (hacia el oeste) e Islas Asunción (hacia el sur) (5) Bahía de Loreto (6) Guaymas, Sonora, (7) Bahía Magdalena y (8) Bahía de La Paz. .... 7

FIGURA 4 Modelo de tolerancia térmica de organismos marinos que correlaciona los cambios metabólicos y los patrones del metabolismo aerobio ( $VO_2$ , consumo de oxígeno) y anaerobio (octopina, succinato) para la producción de energía (ATP)  $T_{cI}$  y  $T_{cII}$ : temperatura crítica,  $T_{pI}$  y  $T_{pII}$ : temperaturas pejus,  $T_{dI}$  y  $T_{dII}$ : temperatura de desnaturalización o pérdida de funciones moleculares. Modificado de: Pörtner 2012, 2017. .... 10

FIGURA 5. Modelo general del consumo de oxígeno ( $VO_2$ ,  $\mu\text{mol}^{-1} \text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) a diferentes presiones parciales de oxígeno ( $pO_2$ , kPa). La hipoxia moderada es compensada por mecanismos fisiológicos mientras que la anaerobiosis comienza cuando la condición de hipoxia severa o anoxia van más allá del punto crítico ( $PcO_2$ ). Modificado de: Grieshaber *et al.*, 1992; Greishaber *et al.*, 1994. .... 12

FIGURA 6. Esquema metabólico de la energía durante la anaerobiosis ambiental y/o funcional en el citoplasma y la mitocondria de un ectotermo marino. Las principales diferencias entre especies son en la síntesis de fosfágenos y los metabolitos de la glucólisis anaerobia. Actividad de algunas de las principales enzimas involucradas en el metabolismo energético: (1) Hexoquinasa. (2) Piruvato quinasa. (3) Octopina deshidrogenasa. (4) Arginina quinasa (5) Citrato sintasa. Modificado de: Kreutzer *et al.*, 1989, Pörtner *et al.*, 1984, Schöttler 1983, 1986, Grieshaber *et al.*, 1994. .... 16

FIGURA 7. Localización de sitio de cultivo y colecta de los juveniles y reproductores de mano de león *N. subnodosus*. A. Cultivo de juveniles en Las Casitas, laguna Ojo de Liebre B.C. S, México. B. Cultivo de reproductores en Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B.C.S., México. .... 22

FIGURA 8. Concentración de clorofila *a* ( $\text{mg m}^{-3}$ ) (●), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (●) y oxígeno disuelto ( $\text{mg O}_2 \text{L}$ ) (●) en el sistema de cultivo de juveniles de mano de león *N. subnodosus* en la laguna de Ojo de Liebre, B.C.S., México del 01 de noviembre, 2016 al 30 de junio 2017. Los datos de clorofila *a* se obtuvieron de la base de datos pública NOAA, mientras que los datos de temperatura y oxígeno disuelto fueron obtenidos de un sensor digital de alta frecuencia (miniDOT, Precision, Measurement Engineering Inc., Estados Unidos) colocado en el sistema de cultivo de los organismos. .... 24

FIGURA 9. A. Registro térmico (●) y contenido de clorofila *a* (●) en Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B.C.S. A. Temperatura superficial del mar ( $^{\circ}\text{C}$ ) y concentración de clorofila *a*

(mg m<sup>3</sup>) obtenido de base de datos pública NOAA para la década 2006-2016. B. Temperatura registrada diariamente durante la primavera (abril-mayo, 2016) C. el verano (junio-julio, 2016) en el sitio de cultivo de los reproductores de *N. subnodosus*. T<sub>min</sub> (azul), T<sub>media</sub> (negro), T<sub>max</sub> (rojo): temperatura mínima, media y máxima, respectivamente. .... 25

**CAPÍTULO 1. Efecto de la aclimatación corta en laboratorio sobre el estado energético de juveniles y reproductores de la mano de león *N. subnodosus***

FIGURA 10. Crecimiento de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* durante su cultivo en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S. México de noviembre 2016 a junio 2017. A. Relación entre las variables morfométricas peso seco de tejidos (g) y longitud total de las valvas (cm). B. Crecimiento de los juveniles durante el primer año de vida. N= 134. Media ± SE media de la longitud total de los organismos (cm) por mes de muestreo. .... 26

FIGURA 11. Composición de nucleótidos del músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta (8 días) en el laboratorio (L). A. Adenosin monofosfato, AMP. B. Adenosin difosfato, ADP. C. Adenosin Trifosfato, ATP. D. Ionosina monofosfato, IMP. E. Hipoxantina, HX. T-student,  $p \leq 0.05$ . N=10 (C), 5 (L). Media ± error estándar de la media..... 39

FIGURA 12. Carga energética adenílica (CEA) y contenido de fosfo-arginina (ArgP) en el músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*):  $p \leq 0.001$ . N=10 (C), 5 (L). Media ± error estándar de la media. .... 40

FIGURA 13. Actividad de enzimas metabólicas en el músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). A. Hexoquinasa, HK. B. Piruvato-quinasa, PK. C. Citrato sintasa, CS. D. Citocromo c oxidasa, CCO. E. Octopina deshidrogenasa, ODH. F. Arginina quinasa, AK. T-

student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*):  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media..... 41

FIGURA 14. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. C. Octopina deshidrogenasa / lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*):  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (A). Media  $\pm$  error estándar de la media.42

FIGURA 15. Análisis de componentes principales de las variables metabólicas del músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de aclimatación en el laboratorio (L). El tamaño de los puntos representa la contribución (contrib) de los individuos al comportamiento de los datos. Las elipses representan los límites de confianza (95%) para cada grupo de organismos. .... 43

FIGURA 16. Actividad de enzimas metabólicas en el manto de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C), después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). A. Hexoquinasa, HK. B. Piruvato-quinasa.PK. C. Citrato sintasa, CS. D. Citocromo c oxidasa, CCO. E. Octopina deshidrogenasa, ODH. F. Arginina quinasa, AK. T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*):  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 44

FIGURA 17. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. C. Octopina deshidrogenasa / lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*):  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (A). Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 45

FIGURA 18. Desarrollo de las gónadas de la mano de león *N. subnodosus*. A la izquierda, las secciones histológicas de la porción femenina (izquierda) y masculina (derecha) mostrando solo los estadios de desarrollo observados en los organismos colectados durante la primavera y el verano: desarrollo temprano (II), desarrollo tardío o avanzado (III), maduro (IV) y desove (V). A la derecha, la frecuencia (%) de estadios de desarrollo de los gametos en la porción femenina (♀) y masculina (♂) de la gónada de los reproductores colectados durante la primavera (A) y el verano (B) en el campo (negro) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (8 días) (blanco). Los valores de frecuencia están expresados como porcentaje de los animales de cada grupo. N=10 (C), 10 (L) para cada estación (primavera, verano), respectivamente. .... 47

FIGURA 19. Composición de nucleótidos del músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). A. Adenosín monofosfato, AMP. B. Adenosín difosfato, ADP. C. Adenosín Trifosfato, ATP. D. Guanosin-trifosfato, GTP. E. Ionosina monofosfato, IMP. F. Hipoxantina, HX. ANOVA 2 vías. Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones. N. =10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 49

FIGURA 20. Carga energética adenílica (CEA) y contenido de fosfo-arginina (ArgP) en el músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). ANOVA 2 vías. Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones. N= 10 (C), 10 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 50

FIGURA 21. Actividad de enzimas metabólicas en el músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta

en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). A. Hexoquinasa, HK. B. Piruvato-quinasa, PK. C. Citrato sintasa, CS. D. Citocromo c oxidasa, CCO. E. Octopina deshidrogenasa, ODH. F. Arginina quinasa, AK. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. N= 6 (C), 6 (L). Las letras minúsculas representan interacciones significativas entre grupos. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 51

FIGURA 22. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. C. Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. N= 10 (C), 5 (L). Las letras minúsculas representan interacciones significativas entre grupos. Media  $\pm$  error estándar de la media. 52

FIGURA 23. Análisis de componentes principales de las variables metabólicas del músculo aductor de los reproductores de *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (P) y el verano (V), respectivamente. El tamaño de los puntos representa la contribución (contrib) de los individuos al comportamiento de los datos. Las elipses representan los límites de confianza (95%) para cada grupo experimental. .... 53

FIGURA 24. Actividad de enzimas metabólicas en el manto de reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). A. Hexoquinasa, HK. B. Piruvato-quinasa, PK. C. Citrato sintasa, CS. D. Citocromo c oxidasa, CCO. E. Octopina deshidrogenasa, ODH. F. Arginina quinasa, AK. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. N= 6 (C), 6 (L). Las letras minúsculas representan interacciones significativas entre grupos. Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 55

FIGURA 25. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. C. Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. N= 6 (C), 6 (L). Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 56

**CAPÍTULO 2. Metabolismo energético de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* influenciados por el efecto combinado de la hipertermia aguda y la baja disponibilidad de oxígeno**

FIGURA 26. Diseño experimental de la exposición de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* a C: una temperatura control (22°C) en normoxia (100% SatO<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L), T: hipertermia (30 °C) en normoxia (100% SatO<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) y TH: hipertermia (30 °C) e hipoxia (40% SatO<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L). Los símbolos negros (■) representan las mediciones del consumo de oxígeno de los organismos (VO<sub>2</sub>) a las 0, 6, 12 y 18 horas en cada condición experimental. El tiempo *ctrl* se refiere al consumo de oxígeno de organismos antes de iniciar el experimento (22 °C). n=10 por grupo. .... 69

FIGURA 27. Consumo de oxígeno de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* (VO<sub>2</sub>,  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mantenidos en una temperatura control (22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L). ( $\Delta$ ), hipertermia aguda (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) ( $\bullet$ ) o hipertermia combinada con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) ( $\blacksquare$ ). Las letras (a, b, c) representan efecto significativo entre las condiciones de temperatura y el tiempo de exposición (0, 6, 3, 12 y 18 horas). ANOVA de mediciones repetidas, prueba de Bonferroni  $p \leq 0.05$ . El tiempo *ctrl* se refiere al VO<sub>2</sub> de organismos antes de iniciar el experimento (22 °C). N= 8 organismos por grupo experimental. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 76

FIGURA 28. Composición de nucleótidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) del músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>,

7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia aguda en condiciones de normoxia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco) durante 18h. A. adenosín monofosfato, AMP. B. adenosín difosfato, ADP. C. adenosín trifosfato, ATP. D. Guanosina trifosfato, GTP. E. Inosina monofosfato, IMP. F. Hipoxantina, HX. ANOVA de una vía, Tukey  $p \leq 0.05$ . N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos experimentales. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 77

FIGURA 29. Carga energética adenílica (CEA) y fosfo-arginina (ArgP,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en el músculo aductor de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C; 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia combinada con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). ANOVA de una vía, Tukey  $p \leq 0.05$ . Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos experimentales. N=9 organismos por grupo. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 78

FIGURA 30. Actividad de las enzimas aerobias y anaerobias ( $\text{U g}^{-1}$ ) en el músculo aductor de los juveniles de la mano de león *N subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). A. Hexoquinasa, HK. B. Piruvato quinasa, PK. C. Citrato sintasa, CS, D. Citocromo c oxidasa, CCO. E. Octopina deshidrogenasa, ODH. F. Arginin quinasa, AK. ANOVA de una vía, Tukey  $p \leq 0.05$ . N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos experimentales. Media  $\pm$  error estándar de la media..... 79

FIGURA 31. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de los juveniles de la mano de león *N subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS.

C. Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA de una vía, Tukey  $p \leq 0.05$ . N=9 organismos por grupo. Media  $\pm$  error estándar de la media..... 80

FIGURA 32. Actividad de las enzimas aerobias y anaerobias ( $U\ g^{-1}$ ) en el manto de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). A. Hexoquinasa, HK. B. Piruvato quinasa, PK. C. Citrato sintasa, CS, D. Citocromo c oxidasa, CCO. E. Octopina deshidrogenasa, ODH. F. Arginin quinasa, AK. ANOVA de una vía, Tukey  $p \leq 0.05$ . N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos. Media  $\pm$ error estándar de la media. .... 81

FIGURA 33. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. C. Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA de una vía, Tukey  $p \leq 0.05$ . N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos. Media  $\pm$ error estándar de la media. .... 82

FIGURA 34. Proporción (%) de las funciones biológicas (GenOntology) de las 54 proteínas del manto de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* que fueron afectadas por temperatura elevada en condiciones de normoxia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) y una condición de hipoxia moderada combinada con hipertermia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) en relación a una condición control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L)..... 83

FIGURA 35. Tasa de cambio (FC, *fold change*) de la intensidad de las proteínas del manto de juveniles de mano de león *N. subnodosus*. Se identificaron un total de 638 proteínas con

54 proteínas afectadas por la temperatura elevada (T, 30°C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L), y solo seis proteínas afectadas por la hipoxia moderada combinada con hipertermia (TH, 30°C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) con relación a un grupo control a una temperatura óptima y normoxia (C, 22°C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L). La tasa de cambio (FC) mostró valores negativos para 43 proteínas (79.6%) y valores positivos para once proteínas (20.4%). (\*) proteínas afectadas por una condición H. (\*\*) proteínas con interacción positiva para T y H. ANOVA 2 vías. *Perseus* v 1.6.12.0 (Tyanova *et al.*, 2016). El valor de FC se calculó contrastando la media de la intensidad de las proteínas (log<sub>2</sub>) de cada grupo experimental (C, T, TH). ..... 86

### **CAPÍTULO 3. Respuestas metabólicas de adultos de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones de hipertermia aguda y esfuerzo reproductivo**

FIGURA 36. Diseño experimental de los retos térmicos agudos (22, 26 y 30 °C) de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* durante la primavera y verano. Los símbolos negros (▼) representan la medición del consumo de oxígeno de los organismos (VO<sub>2</sub>) a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de exposición a cada temperatura experimental, el tiempo *ctrl* se refiere al consumo de oxígeno de organismos antes de iniciar el experimento (22 °C). N=10 en cada grupo. .... 99

FIGURA 37. Consumo de oxígeno de los reproductores de *N. subnodosus* (VO<sub>2</sub>, μmol O<sub>2</sub>, g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) expuestos a retos térmicos (22, 26 and 30 °C) en primavera (A) y verano (B). Los asteriscos representan una interacción significativa entre las condiciones térmicas (T) y el tiempo de exposición (t) (0, 6, 12, 18 y 24 h). ANOVA de mediciones repetidas, prueba de Bonferroni *p* < 0.05. T: temperatura. t: tiempo. N=10por grupo. (\*) indica una diferencia significativa en relación con los demás tratamientos y/o tiempos de muestreo. Media ± error estándar de la media. .... 102

FIGURA 38. Composición de nucleótidos (μmol g<sup>-1</sup>) del músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a retos térmicos agudos (22, 26 y 30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). A. Adenosina monofosfato, AMP, B. Adenosina

difosfato, ADP. C. Adenosina trifosfato, ATP). D. Guanosina trifosfato, GTP. E. Ionosina monofosfato, IMP. F. Hipoxantina, HX. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media..... 104

FIGURA 39. Carga energética adenílica (CEA) y contenido de fosfo-arginina (ArgP,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a retos térmicos (22, 26 y 30 °C) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación T: temperatura. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 105

FIGURA 40. Actividades de enzimas aerobias y anaerobias ( $\text{U g}^{-1}$ ) en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control (22 °C) e hipertermia aguda (30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). A. Actividad de hexoquinasa, HK. B. Actividad del piruvato quinasa, PK. C. Actividad del citrato sintasa, CS. D. Actividad del citocromo c oxidasa, CCO. E. Actividad de la octopina deshidrogenasa, ODH. F. Actividad de la arginina quinasa, AK. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 106

FIGURA 41. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control (22 °C) e hipertermia aguda (30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. C. Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 107

FIGURA 42. Actividades de enzimas aerobias y anaerobias ( $U\ g^{-1}$ ) en el manto de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control (22 °C) e hipotermia aguda (30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). A. Actividad de hexoquinasa, HK. B. Actividad del piruvato quinasa, PK. C. Actividad del citrato sintasa, CS. D. Actividad del citocromo c oxidasa, CCO. E. Actividad de la octopina deshidrogenasa, ODH. F. Actividad de la arginina quinasa, AK. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=5 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Las letras minúsculas representan interacción significativa entre temperaturas y estaciones. Media  $\pm$  error estándar de la media..... 109

FIGURA 43. Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control (22 °C) e hipotermia aguda (30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). A. Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. B. Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. C. Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=5 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media. .... 110

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla I. Variables biométricas de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta (8 días) en el laboratorio (L) . ..... 38

Tabla II. Variables biométricas de los reproductores de la mano de león *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante estadios de desarrollo temprano (primavera) y avanzado (verano) de las gónadas..... 46

Tabla III. Datos biométricos de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L), hipertermia aguda en normoxia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) y a hipertermia combinada con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L). ..... 75

Tabla IV. Variables biométricas de los reproductores de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a temperatura control (22 °C) y dos condiciones de hipertermia aguda (26 y 30 °C) de manera independiente durante estadios de desarrollo inicial (primavera) y desarrollo avanzado (verano) de maduración de las gónadas..... 101

## RESUMEN

---

La temperatura afecta virtualmente todas las respuestas fisiológicas de los ectotermos marinos. Los cambios agudos o abruptos en el ambiente estimulan cambios en la respuesta compensatoria de los organismos frecuentemente asociados a la edad, tamaño y sus actividades fisiológicas (locomoción, crecimiento, reproducción). El presente trabajo evaluó la respuesta metabólica de *N. subnodosus* a temperaturas elevadas cercanas a las temperaturas críticas (30 °C) en sinergia con baja disponibilidad de oxígeno disuelto (40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) o en fases iniciales (primavera) y avanzadas (verano) de su desarrollo gonádico. También se analizó la influencia de la aclimatación a condiciones de laboratorio antes de iniciar los bioensayos que simulaban cambios ambientales representativos del medio natural. El estado energético de los organismos se evaluó a través de la medición del consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>), la carga adenilica energética (CEA), el contenido de nucleótidos y fosfo-arginina (ArgP), así como la actividad de siete enzimas metabólicas como la citrato cintasa (CS), la citocromo c oxidasa (CCO), la hexoquinasa (HK), la piruvato quinasa (PK), la octopina deshidrogenasa (ODH), la arginina quinasa (AK) y la lactato deshidrogenasa (LDH). Finalmente, se utilizó un enfoque de análisis proteómico para detectar la expresión funcional de las proteínas involucradas en las respuestas a los cambios de temperatura y disponibilidad de oxígeno. *N. subnodosus* mostró un nivel de energía (CEA) óptimo para el crecimiento y la reproducción en su hábitat (grupo C), acumulando energía (ArgP) después de una aclimatación corta en el laboratorio (grupo L), independientemente de edad, origen y/o temporada de colecta. En los juveniles, la aclimatación al laboratorio se asoció principalmente a la actividad de las mitocondrias (CCO, CS), el metabolismo de fosfágenos (AK) y opinas (ODH) del músculo aductor, mientras que en los reproductores se observaron cambios estacionales en el metabolismo de carbohidratos (HK, PK), fosfágenos (AK) y guaninas (GTP) a medida que avanza el desarrollo de los gametos.

La exposición a una temperatura elevada (30 ° C) estimuló un incremento en el VO<sub>2</sub> de los juveniles con una disminución de su CEA y ArgP en el músculo aductor que coincidió con el aumento de la actividad de AK en el músculo aductor, mientras que una disminución de oxígeno disuelto (40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) en sinergia con el incremento de temperatura,

estimuló una respuesta oxiconformadora con una disminución del 50% del  $VO_2$  de los organismos, mostrando niveles similares de CEA, ArgP sin cambios en la actividad de las enzimas metabólicas en el músculo aductor. Sin embargo, la hipertermia en sinergia con hipoxia (TH) implicó una acumulación de IMP y HX en el músculo aductor, así como una disminución en la actividad aerobia (CS), glucolítica (PK) y anaerobia (ODH) en el manto de los juveniles. A nivel de proteoma, los juveniles responden al incremento de temperatura con cambios en la abundancia de 54 proteínas en el manto que están involucradas en la señalización celular (61.1%), el metabolismo de energía (14.8%), la organización del citoesqueleto (9.3%) entre otros, mientras que un evento sinérgico de hipertermia con baja disponibilidad de oxígeno (TH) estimuló cambios en proteínas involucradas en la apoptosis y el mantenimiento de la homeostasis celular (1.9%). Estas respuestas nos indican una disminución de los procesos que producen y demandan energía, como una estrategia para mantener el balance energético. En los reproductores se observó que la exposición aguda a hipertermia (30 °C) estimuló un aumento en el  $VO_2$  y el metabolismo de carbohidratos (HK) y fosfágenos (AK), compensando parcialmente la demanda de energía (CEA) con el uso de ArgP, con un aumento de IMP y la HX en el músculo aductor. Las respuestas a la hipertermia aguda fueron más pronunciadas en las etapas avanzadas de maduración (verano), lo que indica una posible pérdida de la homeostasis del metabolismo energético, con posibles implicaciones en el desempeño fisiológico de animales expuestos a escenarios futuros de calentamiento global. Este trabajo confirmó que los juveniles y reproductores de *N. subnodosus* exhiben una capacidad metabólica para compensar los cambios ambientales dentro de su rango de tolerancia térmica, y que esta respuesta no solo es específica a los tejidos, sino que, además a la edad o tamaño de los organismos, como un reflejo de la demanda energética del nivel de actividad fisiológica (e. g. crecimiento y reproducción). En conclusión, la exposición aguda a una temperatura cercana al límite crítico (30 °C) estimula los primeros signos de una pérdida de homeostasis energética en los juveniles y en los reproductores, comprobando que, el efecto sinérgico de eventos de hipoxia o esfuerzo reproductivo disminuyen la probabilidad de sobrevivir a cambios de temperatura más intensos o severos, con consecuencias negativas en la abundancia y distribución de la especie.

**Palabras clave:** tolerancia, hipoxia, hiperermia, crecimiento, reproducción.

## ABSTRACT

---

Temperature regulates virtually all physiological processes in marine ectotherms. Abrupt or anomalous environmental variations can stimulate compensatory responses of animals according to age, size, and physiological activities (locomotion, growth, reproduction). The present study evaluated the metabolic responses of scallops *N. subnodosus* exposed to elevated temperatures closed to the upper thermal limit of species (30 °C) in synergy with low availability of dissolved oxygen (40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) during early (spring) and advanced gonadal maturation. Additionally, we assessed the influence of acclimation under laboratory conditions before exposing scallops to elevated temperature or hypoxia conditions simulating natural fluctuations in the habitat. We evaluated the energetic status of animals through oxygen consumption (VO<sub>2</sub>), adenylic energy charge (AEC), nucleotide and phospho-arginine content as well as through the activity of seven metabolic enzymes including citrate synthase (CS), cytochrome c oxidase (CCO), hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK), octopine dehydrogenase (ODH), arginine kinase (AK) and lactate dehydrogenase (LDH) in the adductor muscle and mantle. Finally, we performed proteomic analysis to detect the functional expression of the proteins involved in responses to changes in temperature and oxygen availability.

*N. subnodosus* showed optimum energy levels (AEC) for growth and reproduction in the field (Group C), accumulating energy reserves (ArgP) after a short acclimation to laboratory conditions (Group L), independently of age, sampling site or season. After acclimation, juveniles displayed mainly changes in mitochondrial activity (CCO, CS), phosphagen (AK), and opines (ODH) metabolism in the adductor muscle. Adult scallops, on the other hand, displayed seasonal changes in carbohydrate (HK, PK), phosphagens (AK) and guanines (GTP) metabolism as gonad developed. Elevated temperature (30°C) stimulated VO<sub>2</sub> in juveniles accompanied by a decrease of AEC and ArgP levels in the adductor muscle. In contrast, moderate hypoxia (40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) combined with elevated temperature constrained VO<sub>2</sub> of scallops (oxyconformer), showing a similar level of energy (AEC, ArgP) and no changes in enzymes activities in the adductor muscle. However, hyperthermia combined with hypoxic conditions induced an increase of IMP and HX in the adductor

muscle together with a decrease in the aerobic activity (CS), glycolysis (PK), and anaerobic metabolism (ODH) in the mantle of juveniles. At the proteome level, juvenile scallops responded to hyperthermia, exhibiting changes in abundance of 54 proteins of the mantle, which are involved in cellular signaling (61.1%), energy metabolism (14.8%), cytoskeleton organization (9.3%) among others. In contrast, combined hyperthermia, and low dissolved oxygen) stimulated changes in proteins involved in apoptosis and maintenance of cellular homeostasis. These responses are related to a decrease in cellular energy-consuming processes as a strategy to maintain energy balance.

In the adult scallops, hyperthermia (30 °C) induced an increase of  $VO_2$  and an enhanced of carbohydrate (HK) and phosphagen (AK) metabolism, a partial compensatory response to satisfy energy demand (AEC) through the use of energy reserves (ArgP). Besides, IMP and HX levels increased in the adductor muscle of animals. The hyperthermia effects were most evident during advanced stages of gonad maturation (summer), suggesting a loss of energy balance and cellular homeostasis, with possible implications in the physiological performance of animals exposed to future global climate changes. This study confirmed that juveniles and adults of *N. subnodosus* showed a metabolic capacity to compensate for elevated temperature changes within their thermal tolerance window. Also, the metabolic response to these environmental fluctuations is specific to the tissues according to the level of the physiological activity of animals (e. g. growth and reproduction). In conclusion, the acute exposition to hyperthermia near the critical temperature (30 °C) induces early signs of energy homeostasis disruption in both juveniles and adults, confirming that additional drivers such as hypoxia or an increase in reproductive effort could reduce the survival upon severe temperature changes with negative impacts in the abundance and distribution of the species.

**Keywords:** tolerance, hypoxia, warming, growth, reproduction.

## I. INTRODUCCIÓN

---

Los ecosistemas marinos presentan variaciones ambientales que regulan la actividad, la distribución y la abundancia de las comunidades biológicas. De manera natural, los organismos marinos están expuestos a cambios ambientales (e. g. PDO *oscilación decadal del Pacífico*) o (ENSO, *El Niño Southern Oscillation*) (Doney *et al.*, 2012; Bruno *et al.*, 2015; Dong & McPhaden, 2017). Sin embargo, los organismos también están expuestos a variaciones ambientales atípicas o abruptas generadas principalmente por las emisiones de CO<sub>2</sub> de las actividades antropogénicas (Pörtner & Farrell, 2008; Dooley *et al.*, 2012) que favorecen la estratificación de los mares y el aumento del movimiento de aguas cálidas a zonas frías o templadas; así como cambios en los patrones estacionales con veranos más intensos y temperaturas más altas durante el invierno y la primavera (IPCC, 2014; Poloczanska *et al.*, 2013). El aumento de la temperatura en los mares favorece la eutroficación y el aumento de los eventos de hipoxia moderados ( $\leq 5$  mg O<sub>2</sub> L) y severos ( $\leq 2$  mg O<sub>2</sub> L), así como la formación de zonas de oxígeno mínimo (OMZ, *Oxygen minimum zones*) (Burnett & Stickle, 2001; Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008; Basso *et al.*, 2015). Las predicciones actuales sugieren que la temperatura superficial del océano se incrementará de 1.8 a 4 °C (IPCC, 2019; Götze *et al.*, 2020) mientras que la disponibilidad de oxígeno disminuirá de 1 al 7% al terminar el siglo XXI (Porteus *et al.*, 2011; Bijma *et al.*, 2013). Estos cambios ambientales afectarán principalmente a los ectotermos que habitan ecosistemas costeros (Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008; Rabalais *et al.*, 2014), alterando su comportamiento, metabolismo y respuesta fisiológica durante etapas de una demanda alta de energía para el desarrollo, el crecimiento y la reproducción (Pörtner, 2001; Hochachka & Somero, 2002). Los efectos negativos de estos cambios ambientales sobre el desempeño fisiológico de los organismos han sido relacionados una mayor incidencia de los eventos de mortalidad masiva (Li *et al.*, 2007; Fleury *et al.*, 2010; Bijma *et al.*, 2013).

Los ectotermos marinos exhiben un amplio rango de sensibilidad a la temperatura elevada y a los eventos de hipoxia con respuestas metabólicas específicas en los tejidos, principalmente de aquellos que están involucrados en la respiración, la ventilación y el almacenamiento de la energía como las branquias, el corazón, la hemolinfa y el músculo aductor (Hochachka &

Lutz, 2001) con una gran diversidad de respuestas compensatorias a nivel fisiológico (e. g. respiración), celular (e. g. actividad de enzimas) y molecular (e. g. proteínas) para mantener el flujo de energía (ATP) hacia las células (Sussarellu *et al.*, 2013; Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008). En los pectínidos (Pectinidae), el músculo aductor es la principal reserva de energía para la locomoción (e. g. respuesta de escape) y la reproducción, mientras que el manto participa en la calcificación de las valvas, la dirección del flujo de agua durante el nado y la percepción de estímulos físicos (e. g. depredación) y ambientales (e. g. temperatura, hipoxia) (Seibel *et al.*, 2014; Tripp-Valdez *et al.*, 2017, 2019). Este grupo de moluscos bivalvos (~400 spp.) habita desde mares profundos hasta lagunas costeras de zonas polares, templadas y tropicales alrededor del mundo (-1.9 a 28 °C) (Heilmayer *et al.*, 2004; Brand, 2006), lo que sugiere que presentan una gran diversidad de adaptaciones a las condiciones ambientales de su hábitat. Sin embargo, la capacidad de respuesta de los organismos en etapas de alta demanda de energía como el crecimiento (juveniles) y la reproducción (adultos) ante cambios de temperatura, oxígeno disuelto (OD) y otros factores ambientales se desconoce para la mayoría de las especies (Maguire *et al.*, 1999; Pörtner, 2012).

La mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) se distribuye en mares profundos y zonas costeras desde la laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur, México hasta las costas de Perú (Keen 1972) aunque algunos autores mencionan que la distribución de la especie es más amplia, desde las costas de California a las costas norte de Perú (Minchin, 2003). La especie habita ecosistemas costeros (bahías, lagunas, canales) hasta 110m de profundidad (Fischer *et al.*, 1995) en bancos de baja densidad de organismos (<2 ind m<sup>2</sup>) (Ponce-Díaz *et al.*, 2011). Las poblaciones naturales representaron un recurso pesquero de importancia económica a nivel nacional e internacional (Valdez & Ponce, 1996) hasta la disminución del volumen de captura de 30 mil a 321 ton a partir de 1970 y hasta el año 2008 (DOF, 2012; Velázquez-Abunader *et al.*, 2016), que concluyó con el cierre de las pesquerías en la laguna Ojo de Liebre en el año 2010 (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2016). Los juveniles de *N. subnodosus* tienen tasas de crecimiento altas durante los primeros dos años de vida (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004) que pueden variar de acuerdo con las condiciones de cultivo (e. g. densidad, profundidad) y de variabilidad ambiental (e. g. temperatura, disponibilidad de

alimento, OD) de la zona geográfica (Koch *et al.*, 2005; Osuna-García *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2015).

La disminución de la tasa de crecimiento y supervivencia de las poblaciones cultivadas de *N. subnodosus* en las costas del Pacífico norte han sido relacionadas con cambios ambientales, principalmente con la exposición a temperaturas elevadas de verano (Barrios-Ruiz *et al.*, 2003; Villalejo *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005; Osuna-García *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2015), así como una mayor incidencia del gusano poliqueto *Polypodra spp.* y la almeja *Lythophaga spp.*, que favorecen la infección por herpesvirus en poblaciones de Bahía Tortugas, y la laguna Ojo de Liebre (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans, 2010; González-Ortíz *et al.*, 2017). En etapas adultas, el aumento de eventos de mortalidad se ha observado durante el verano, cuando los organismos se encuentran en períodos de mayor esfuerzo reproductivo. La tolerancia térmica de los organismos adultos durante etapas de alta demanda energética como la reproducción se desconoce mientras que el potencial de crecimiento de los juveniles es mayor a 22 °C, con efectos deletéreos en temperaturas mayores a 28 °C y un límite máximo de tolerancia cercano a 32 °C (González-Estrada, 2003). La exposición a temperaturas elevadas atípicas ( $\geq 28^{\circ}\text{C}$ ) pueden actuar de manera sinérgica con otros cambios ambientales (e. g. hipoxia) limitando la capacidad de los organismos para compensar la demanda de energía para la locomoción, el crecimiento y la reproducción. La capacidad de respuesta de los organismos a estos cambios ambientales requiere de la evaluación integral de las respuestas metabólicas a nivel fisiológico, celular y molecular en diferentes etapas del ciclo de vida, así como del desarrollo de bioensayos en el laboratorio que simulen las condiciones ambientales del hábitat (Rezende *et al.*, 2011; Tomanek *et al.*, 2014).

Este trabajo de investigación evaluó las respuestas metabólicas a nivel fisiológico, celular y molecular de *N. subnodosus* ante eventos de hipertermia aguda en sinergia con la hipoxia y el esfuerzo reproductivo en el laboratorio. Para ello, se evaluó en primera instancia el estado energético de los juveniles y reproductores después de una aclimatación corta (8 días) en el laboratorio con el objetivo de analizar los valores basales en ambas condiciones. Esta información fue esencial para evaluar las respuestas metabólicas de *N. subnodosus* ante eventos de hipertermia en sinergia con la hipoxia y el esfuerzo reproductivo en condiciones de laboratorio, así como para inferir su respuesta a las condiciones del medio natural.

## II. ANTECEDENTES

---

### 2.1 La mano de león *N. subnodosus*

#### 2.1.1 Taxonomía y anatomía

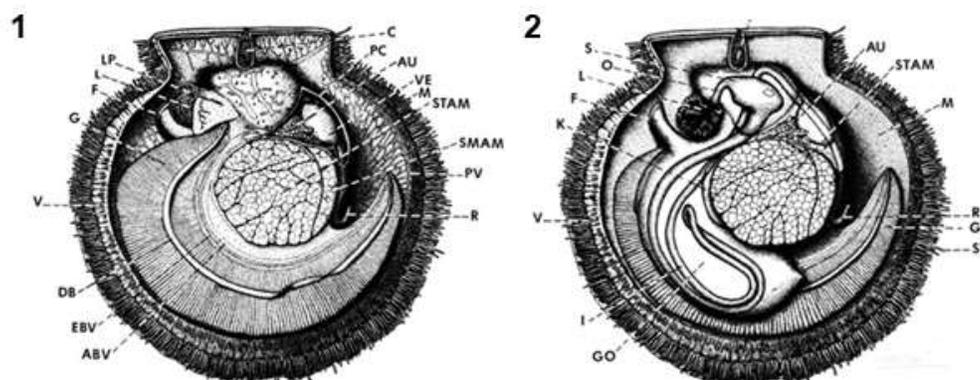
Las características fenotípicas distintivas de *N. subnodosus* (Sowerby, 1835) son valvas grandes, sólidas y gruesas. La valva derecha presenta ocho o nueve costillas rectangulares y redondeadas, sin nodos, mientras que la valva izquierda presenta nueve costillas con una o más generaciones de nodos (Holguin-Quñones & García-Domínguez, 2011) que le confieren el nombre común de *almeja mano de león* (México), con sinonimia de *Lyropecten subnodosus* (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2016). La coloración de la concha puede variar entre tonos amarillos, rojos y violetas, con algunas manchas blancas o púrpuras (Fig. 1).



**FIGURA 1.** Ejemplar adulto de *Nodipecten subnodosus* (altura:149mm, ancho:159mm) colectado a 20 m de profundidad en Baja California, México y clasificación taxonómica de la especie (Sowerby, 1835). Modificado de: pectensite.com.

La principal característica de los pectínidos es un músculo aductor grande colocado en posición central para la respuesta de escape. El corazón contenido en el pericardio irriga hemolinfa desde los riñones hasta las branquias y los palpos labiales a través de un sistema de senos y vasos eferentes. Las gónadas y los riñones están dispuestos en el margen anterior del músculo aductor, mientras que un pie poco desarrollado se localiza cerca de la boca, en el margen antero-dorsal de las gónadas. El sistema digestivo incluye un esófago, el estómago, la glándula digestiva, el condróforo, y el intestino, distribuyéndose entre las vísceras hasta quedar libre, cerca del ano. El ganglio parietovisceral conecta al manto, al músculo aductor

y las branquias, mientras que el ganglio cerebral y pedal fusionado se conecta con el ganglio parietovisceral para unirse al resto del cuerpo (Beninger & Le Penec, 2016) (Fig. 2).



**FIGURA 2.** Anatomía general de *Placopecten magellanicus* (Pectinidae). (1) Sección izquierda de la valva con el manto removido. (2) Sección derecha de la valva con el manto y las branquias removidos. **ABV:** Vaso branquias aferente. **AU:** aurícula. **C:** condróforo **DB:** banda de filamentos branquiales dorsal **EBV:** vaso branquial eferente, **F:** pie, **G:** branquia. **GO:** gónada, **I:** intestino, **K:** riñón, **L:** labios, **LP:** labio paleal, **M:** manto, **O:** esófago, **PC:** pericardio, **PV:** vasos paliales, **R:** recto, **S:** estómago, **ST:** tentáculo sensorial, **SMAM:** músculo aductor liso, **STAM:** músculo aductor estriado, **V:** velo. Tomado y modificado de: Drew 1906. Revisado en: Beninger & Le Penec 2016.

### 2.1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de la especie comprende el desove, la fertilización externa y la eclosión de una larva pelágica (94  $\mu\text{m}$ , 24 horas) que inicia su desarrollo con la aparición de cilios (2-3 días), el velo, la concha y el sistema digestivo (119  $\mu\text{m}$ , 9 días) y termina con la aparición del umbo (200  $\mu\text{m}$ , 11 días). La larva pediveliger (211  $\mu\text{m}$ , 13 días) desarrolla el pie y la mancha ocular al borde de la glándula digestiva, justo antes de la fijación al sustrato (Nava, 2019), con una supervivencia generalmente baja (32%) (Casas-Valdez & Ponce-Díaz, 1996). Los juveniles cultivados al cabo de 2 a 3 meses alcanzan un tamaño de 10 mm de longitud total de las valvas (LT) (Casas-Valdez & Ponce-Díaz, 1996), que continua con un crecimiento alométrico durante los primeros meses de cultivo ( $54.5 \pm 2.1$  mm, LT), aunque la tasa de crecimiento puede variar de acuerdo con la zona geográfica (Villalejo *et al.*, 2004) En las costas del Pacífico, la tasa de crecimiento de los juveniles ( $0.21\text{-}25$  mm  $\text{d}^{-1}$ ) (García-Domínguez *et al.*, 1992; Racotta *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2005) es mayor que en el Golfo de California ( $0.13$  mm  $\text{d}^{-1}$ ) durante los primeros meses de cultivo y después comienza a disminuir particularmente durante el verano conforme los organismos alcanzan el segundo

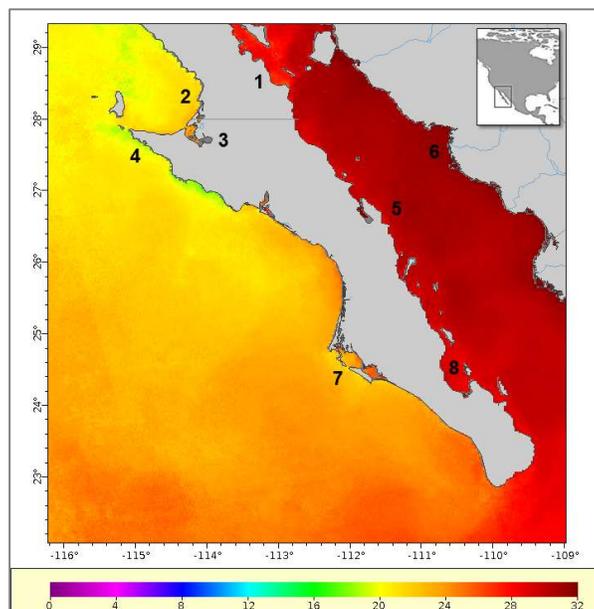
año ( $0.04 \text{ mm d}^{-1}$ ) (Barrios-Ruíz *et al.*, 2003; Villalejo *et al.*, 2004) con algunas excepciones como las poblaciones de Bahía Loreto ( $0.24 \text{ mm d}^{-1}$ ) (Félix-Pico *et al.*, 1999).

Los adultos pueden alcanzar 200 mm de altura de las valvas y alrededor de 1800 g de peso húmedo total (Félix-Pico, 1991). La primera maduración sexual ocurre al inicio de su segundo ciclo anual con el desarrollo simultáneo de gametos masculinos y femeninos en secciones definidas por un cambio de coloración en la gónada (hermafrodita simultáneo) (Barrios-Ruíz *et al.*, 2003). En los organismos maduros, la sección masculina de la gónada es blanquecina, mientras que la sección femenina es naranja intenso. En la temporada de desove, los organismos liberan primero los gametos masculinos y después, los gametos femeninos como una estrategia para reducir la probabilidad de autofecundación (Gosling, 2015). Los primeros estudios sobre la biología reproductiva de la especie confirmaron que la especie presenta un ciclo gonádico continuo con cinco o siete estadios de desarrollo descritos previamente para otros pectínidos: indiferenciado, inmaduro, en desarrollo, gametogénesis, maduro, en desove y desovado (Reinecke-Reyes *et al.*, 1996; Valdez & Ponce-Díaz, 1996; Barber & Blake 2006), y que también están definidas en cuatro fases (reposo, maduración, desove y post-desove) que pueden variar su estacionalidad de acuerdo con las condiciones ambientales de la zona de estudio (Arellano-Martínez *et al.*, 2004). En la laguna Ojo de Liebre, los desoves se registran en verano-otoño (septiembre-noviembre) (Arellano-Martínez *et al.*, 2004), en Guerrero Negro y Bahía Magdalena durante el verano-otoño (agosto-noviembre) (Reinecke-Reyes *et al.*, 1996; Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2011) y en Bahía Tortugas durante dos picos, uno en verano-otoño (julio-septiembre) y otro en invierno-primavera (diciembre-marzo) asociados principalmente a las variaciones estacionales temperatura y disponibilidad de alimento (clorofila-*a*) (Angel-Dapa *et al.*, 2015).

### **2.1.3 Pesquerías y cultivos**

La pesquería de pectínidos como *Pecten vogdesi*, *Argopecten circularis*, *Spondylus princeps* y *N. subnodosus* en la costa del Pacífico norte de Baja California Sur registró una captura máxima histórica de 5,000 toneladas por año (30 mil ton.). Sin embargo, la sobreexplotación contribuyó a una disminución de las poblaciones naturales a partir a partir de 1970 (Chávez-

Villalba & Cáceres-Martínez, 1992). En 1990, la pesquería de *N. subnodosus* se reestableció gracias a la modificación de las estrategias de extracción (cuotas) y permisos de colecta (Barrios-Ruíz et al., 2003) que alcanzó un valor de producción de hasta 350 mil dólares para el mercado nacional (75%) e internacional (25%) (Casas-Valdez & Ponce-Díaz, 1996). Durante el período de 1994-2000, los datos de captura muestran un incremento de la actividad pesquera de este recurso (25 a 321 ton) (Masso-Rojas et al., 2000; Barrios-Ruíz et al., 2003; DOF, 1012; Velázquez-Abunader et al., 2016), con una disminución paulatina que concluyó con el cierre de las pesquerías en el año 2010 (Ruíz-Verdugo et al., 2016). Este declive en las poblaciones naturales, aunado a la tasa de crecimiento alta y su precio en el mercado nacional e internacional fomentó el desarrollo de sistemas de cultivo piloto de *N. subnodosus* en las costas del Pacífico Norte de Baja California Sur, en localidades como Guerrero Negro, laguna Ojo de Liebre, Isla San Roque, Isla Asunción y Rancho Bueno (Petersen et al., 2008), y así como en Bahía de los Ángeles, Loreto y La Paz, en el Golfo de California. Adicionalmente, se han reportado cultivos en Baja California (Ensenada), Sonora (Guaymas) y Ecuador (Barrios-Ruiz et al., 2003; Koch et al., 2015; Revilla et al., 2019).



**FIGURA 3.** Temperatura superficial del mar durante el verano (Julio, 2019) de la costa de la Península de Baja California, resolución 2.5 km obtenida del laboratorio del ambiente marino del Pacífico de la NOAA. Los colores reflejan la temperatura superficial del mar durante el verano (0 a 32°C). Los números indican los principales sitios de cultivo piloto de la mano de león *Nodipecten subnodosus*: (1) Bahía de los Ángeles (2) Guerrero Negro (3) laguna Ojo de Liebre (hacia el oeste) (4) San Roque (hacia el oeste) e Islas Asunción (hacia el sur) (5) Bahía de Loreto (6) Guaymas, Sonora, (7) Bahía Magdalena y (8) Bahía de La Paz.

Entre ellas, destacan las lagunas costeras Ojo de Liebre ( 27° 35'–27° 55' N y 113°58'–114° 20' O) y Bahía Magdalena (25°10'10" N 112°11'24" W y 24°26'24" N 113°33'00" O) que se ubican en la zona templada y la zona de transición templada- tropical (Cruz-Escalona *et al.*, 2013) donde convergen aguas de la Corriente de California y la Corriente Costera de Costa Rica o Corriente Mexicana (Hernández-Trujillo *et al.*, 2010) que promueven el descenso de la temperatura y del oxígeno disuelto (Barber & Smith, 1981) y al mismo tiempo, un mayor contenido de nutrientes que favorece la productividad primaria de noviembre a marzo (Koch *et al.*, 2005). En Bahía Magdalena, la temperatura superficial del mar oscila entre 17.8 °C y 29 °C (Sánchez-Montante *et al.*, 2007) con valores máximos de 30 °C en verano durante el período 2006-2016 (NOAA) aunque algunos autores han reportado temperaturas máximas de 31.9 °C desde los 9.5 a los 17 metros de profundidad durante el verano (Sicard-González *et al.*, 2012). En contraste, la laguna Ojo de Liebre puede llegar a presentar temperaturas máximas de 28°C durante el verano, con efectos deletéreos para el potencial de crecimiento de los juveniles de *N. subnodosus* (González-Estrada, 2003). Las poblaciones cultivadas de *N. subnodosus* presentan tasas de crecimiento mayores a otros pectínidos, con cambios en el desempeño fisiológico (e. g. crecimiento, supervivencia) asociados a los sistemas de cultivos y a la variabilidad ambiental de la zona geográfica, principalmente a la exposición de temperaturas elevadas y su efecto sinérgico con la disponibilidad de alimento y/o el nivel de oxígeno disuelto tanto en la costa del Golfo de California como en la del Pacífico (Koch *et al.*, 2015) (Fig. 3). Actualmente, algunos de los principales retos para el cultivo de la especie son: a) identificar las causas de la reducción aparente en el desempeño fisiológico de los organismos ante cambios ambientales (temperatura, nivel de oxígeno, alimento), b) identificar sitios de cultivos para el mejoramiento del volumen de producción (e. g. masa del músculo aductor) (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ramírez-Arce, 2009) y c) la tasa de supervivencia de los organismos (> 50%) en sistemas de cultivo en suspensión en profundidades bajas o intermedias (Revilla *et al.*, 2019).

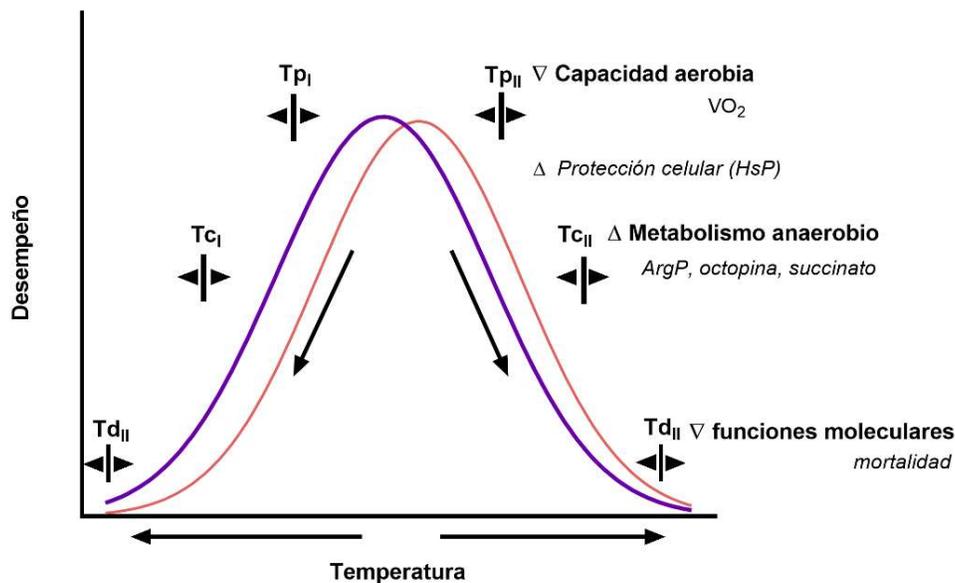
## 2.2 Respuestas metabólicas a hipertermia y baja disponibilidad de oxígeno

### 2.2.1 Tolerancia térmica

La temperatura es el principal modulador del metabolismo energético y virtualmente de todas las actividades del ciclo de vida de los ectotermos (Verdelhos *et al.*, 2015). El metabolismo aerobio inferido a partir del consumo de oxígeno de los organismos ( $VO_2$ ) produce el 80% de la energía que requieren las células para realizar sus funciones vitales (Hochachka & Somero, 2002; Guppy, 2004; Bruning *et al.*, 2013) y, en consecuencia, es el primer factor que determina el límite de tolerancia térmica de los organismos (Pörtner, 2002; 2012). La exposición aguda (horas, días) a una temperatura elevada estimula un aumento significativo del  $VO_2$  de *P. yessoensis* (Jiang *et al.*, 2016), *Pecten maximus* (Artigaud *et al.*, 2014) y *Argopecten purpuratus* (Navarro *et al.*, 2004; Aguirre-Velarde *et al.*, 2016; Lardies *et al.*, 2017) (revisión en: Heilmayer *et al.*, 2004; MacDonald, Bricelj & Shumway, 2016). Sin embargo, la capacidad aerobia de los pectínidos, al igual que otros ectotermos marinos varía de acuerdo con la edad (e. g. larva, juvenil, adulto) y el nivel de actividad de los organismos (e. g. crecimiento, locomoción, reproducción) (Angilleta, 2009; Rohr *et al.*, 2018). Estas variaciones en la respuesta aerobia a medida que avanza su ciclo de vida pueden afectar su capacidad para responder a cambios ambientales en su hábitat (e. g. hipertermia) (Angilleta, 2009; Bruning *et al.*, 2013; Bruno *et al.*, 2015; Rohr *et al.*, 2018).

Los modelos de tolerancia térmica asumen que existe una relación directa entre el incremento de la temperatura y los cambios energéticos de los organismos (Gillooly *et al.*, 2001; Clarke & Fraser, 2004) de manera parcial o completa de acuerdo con la frecuencia, la tasa de cambio y el tiempo de exposición (horas, días, semanas) (Peck *et al.* 2009; Angilleta, 2009; Angilleta *et al.*, 2019). El concepto de OCLTT (*oxygen and capacity limited thermal tolerance*) integra la respuesta multinivel (molécula, célula, tejido, organismo) para desarrollar una perspectiva de la tolerancia térmica de los seres vivos a un medio ambiente cambiante (temperatura, oxígeno disuelto,  $CO_2$ ) (Bozinovic & Pörtner, 2015). La respuesta fisiológica de los ectotermos acuáticos a un cambio de temperatura adquiere la forma de una distribución normal (curva Gaussiana) que relaciona la temperatura óptima con la capacidad máxima de respuesta para adquirir (respiración) y transportar el oxígeno (ventilación) hacia sus tejidos para utilizar la energía química (Pörtner *et al.*, 2001; Bouchard & Guderley, 2003; Payne *et*

*al.*, 2016; Sinclair *et al.*, 2016) a través del uso de diferentes sustratos energéticos (lípidos, carbohidratos y proteínas) de acuerdo con su disponibilidad en la dieta y las reservas somáticas de los organismos (Hochachka & Somero, 2002). A medida que se incrementa la temperatura más allá del rango óptimo de la especie, la capacidad aerobia de los organismos es menos eficiente para suministrar oxígeno a sus tejidos (hipoxia funcional), una condición comúnmente conocida como temperatura *pejus* (**Tp**) (Pörtner, 2001; Pörtner *et al.*, 2017). Esta disminución en la capacidad aerobia y una subsecuente pérdida de energía disponible (ATP) definen los límites de tolerancia a ambos extremos de la curva (**TpI**, **TpII**) (Pörtner, 2001), que se caracterizan por el aumento del requerimiento de glucosa (efecto Pasteur reverso) y la sustitución de procesos aerobios de producción de energía (ATP) por rutas anaerobias que preservan la integridad y el funcionamiento de las células (tolerancia pasiva) (Frederich & Pörtner, 2000; Abele, 2012). Finalmente, la acumulación de metabolitos anaerobios y la disminución de la probabilidad de supervivencia de los organismos define las temperaturas críticas (**Tc**) a medida que se aproximan a las temperaturas de desnaturalización (**Td**) (Pörtner, 2001; 2017) (Fig. 4).

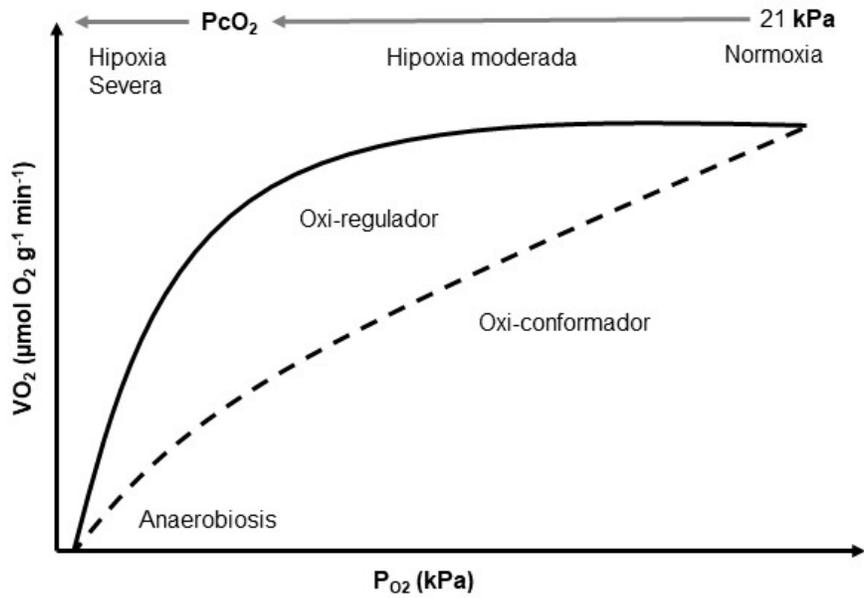


**FIGURA 4** Modelo de tolerancia térmica de organismos marinos que correlaciona los cambios metabólicos y los patrones del metabolismo aerobio ( $VO_2$ , consumo de oxígeno) y anaerobio (octopina, succinato) para la producción de energía (ATP)  $T_{cI}$  y  $T_{cII}$ : temperatura crítica,  $T_{pI}$  y  $T_{pII}$ : temperaturas *pejus*,  $T_{dI}$  y  $T_{dII}$ : temperatura de desnaturalización o pérdida de funciones moleculares. Modificado de: Pörtner 2012, 2017.

### 2.2.2 Respuestas a hipoxia

El oxígeno es esencial para llevar a cabo los procesos metabólicos de los ectotermos marinos, y si su disponibilidad en el ambiente es baja, puede limitar su capacidad para satisfacer el requerimiento de energía (Guderley & Pörtner, 2010). Durante una primera fase de exposición a hipoxia, los organismos aumentan la ventilación y circulación en un esfuerzo por mantener el suministro de oxígeno a sus tejidos (Storey & Storey, 2004). Las especies que regulan su  $\text{VO}_2$  de manera independiente a determinado intervalo de concentración de oxígeno disuelto, se denominan *oxireguladores*, mientras que las especies cuyo  $\text{VO}_2$  depende de la concentración de OD se denominan *oxiconformadores* (Grieshaber *et al.*, 1994; Aguirre-Velarde *et al.*, 2016; Venter *et al.*, 2018).

Grieshaber *et al.* (1994) definió la hipoxia como un estado de baja disponibilidad de oxígeno que se caracteriza por una disminución en la *presión parcial de oxígeno* ( $p\text{O}_2$ ) de los fluidos corporales por debajo de los valores de normoxia (21 kPa, 157.5 torr). El *punto crítico de oxígeno* ( $\text{PcO}_2$ , Prosser, 1973) representa el nivel de oxígeno por debajo del cual un *oxirregulador* ya no puede mantener su  $\text{VO}_2$  independiente del nivel de OD a una temperatura específica (Artigaud *et al.*, 2014). Con base a esta definición, la *hipoxia moderada* es cualquier nivel de oxígeno por debajo de los valores de normoxia, que persiste sobre el  $\text{PcO}_2$ , mientras que una *hipoxia severa* es cualquier nivel de oxígeno por debajo del  $\text{PcO}_2$  de los organismos (Grieshaber *et al.* 1993; Greishaber *et al.*, 1994) (Fig. 5). Sin embargo, la capacidad de respuesta de los organismos ectotermos a una condición de OD limitante presenta una variación muy amplia donde no siempre una transición abrupta entre la regulación y la conformidad ( $\text{PcO}_2$ ) es evidente (revisión en: Herreid, 1980; Cobbs & Alexander, 2018).



**FIGURA 5.** Modelo general del consumo de oxígeno ( $VO_2$ ,  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) a diferentes presiones parciales de oxígeno ( $pO_2$ , kPa). La hipoxia moderada es compensada por mecanismos fisiológicos mientras que la anaerobiosis comienza cuando la condición de hipoxia severa o anoxia van más allá del punto crítico ( $P_{cO_2}$ ). Modificado de: Grieshaber *et al.* 1992; Greishaber *et al.*, 1994.

### 2.3 Metabolismo energético y la respuesta al ambiente

El metabolismo de la energía se define como una serie de reacciones químicas que llevan a cabo los seres vivos para obtener, transformar, almacenar y hacer un uso eficiente de la energía para realizar sus actividades fisiológicas (desarrollo, crecimiento, reproducción). Los ectotermos marinos como los moluscos bivalvos no tienen la capacidad de regular su temperatura corporal ante las fluctuaciones térmicas, pero han desarrollado una serie de respuestas para satisfacer la demanda de energía (ATP) y mantener la homeostasis celular en respuesta a los cambios ambientales que caracterizan su hábitat. Estas respuestas incluyen cambios etológicos (e. g. cierre de valvas, respuesta de escape), fenotípicos (e. g. tamaño y forma de las valvas, cavidad del manto, tamaño del músculo aductor) así como cambios asociados a su capacidad aerobia ( $VO_2$ ), la tasa de ingesta de alimento y el almacenamiento (ArgP) a través de la actividad de proteínas que mantienen el flujo de carbono y energía hacia las células (e. g. enzimas metabólicas, proteoma).

### **2.3.1 Carga energética adenilica**

Las variaciones en el estado energético de las células se relacionan directamente con la proporción de *adenosín trifosfato* (ATP) y su interconversión a *adenosín difosfato* (ADP) y/o *adenosín monofosfato* (AMP) (Galindo & Flores Urbina, 2006). La carga energética adenilica (CEA) (Atkinson, 1968) es un indicador de las variaciones en el estado energético de los organismos durante procesos fisiológicos como la locomoción (Pérez *et al.*, 2008), la gametogénesis y el desove, entre otros (Giesy & Dickson, 1981), así como de la exposición a cambios agudos o crónicos de temperatura y/o disponibilidad de alimento (Moal *et al.*, 1989b). La CEA adquiere valores cercanos a 0 durante estados de energía bajo (o ricos en AMP) y valores cercanos a 1 en estados de energía alto (o ricos en ATP) (Maguire *et al.*, 1999). Una disminución en el estado energético (CEA) indica que las células están usando más energía (ATP) de la que son capaces de producir en un momento dado, una señal química que estimula una serie de respuestas celulares enfocadas a mantener la homeostasis celular a través del uso de sustratos energéticos provenientes de las reservas somáticas y/o cambios en el consumo de oxígeno y/o la tasa de ingesta del alimento, entre otros. En los moluscos bivalvos, los niveles más altos de CEA (> 0.9) se encuentran en el músculo aductor en condiciones de reposo en varias especies de pectínidos silvestres y cultivados con disminuciones asociadas tanto al nivel de actividad y los hábitos de vida de los organismos (e. g. respuesta de escape), como a la exposición de condiciones ambientales (temperatura, salinidad, emersión) y/o de manejo subóptimas (e. g. transporte) en especies como *Chlamys opercularis* (Grieshaber *et al.*, 1978), *Placopecten magellanicus* (de Zwaan *et al.*, 1980; Pérez *et al.*, 2008), *Argopecten irradians concentricus* (Chih & Ellington, 1983), *P. maximus* (Maguire *et al.*, 1999 a, b), entre otros.

### **2.3.2 Fosfo-arginina**

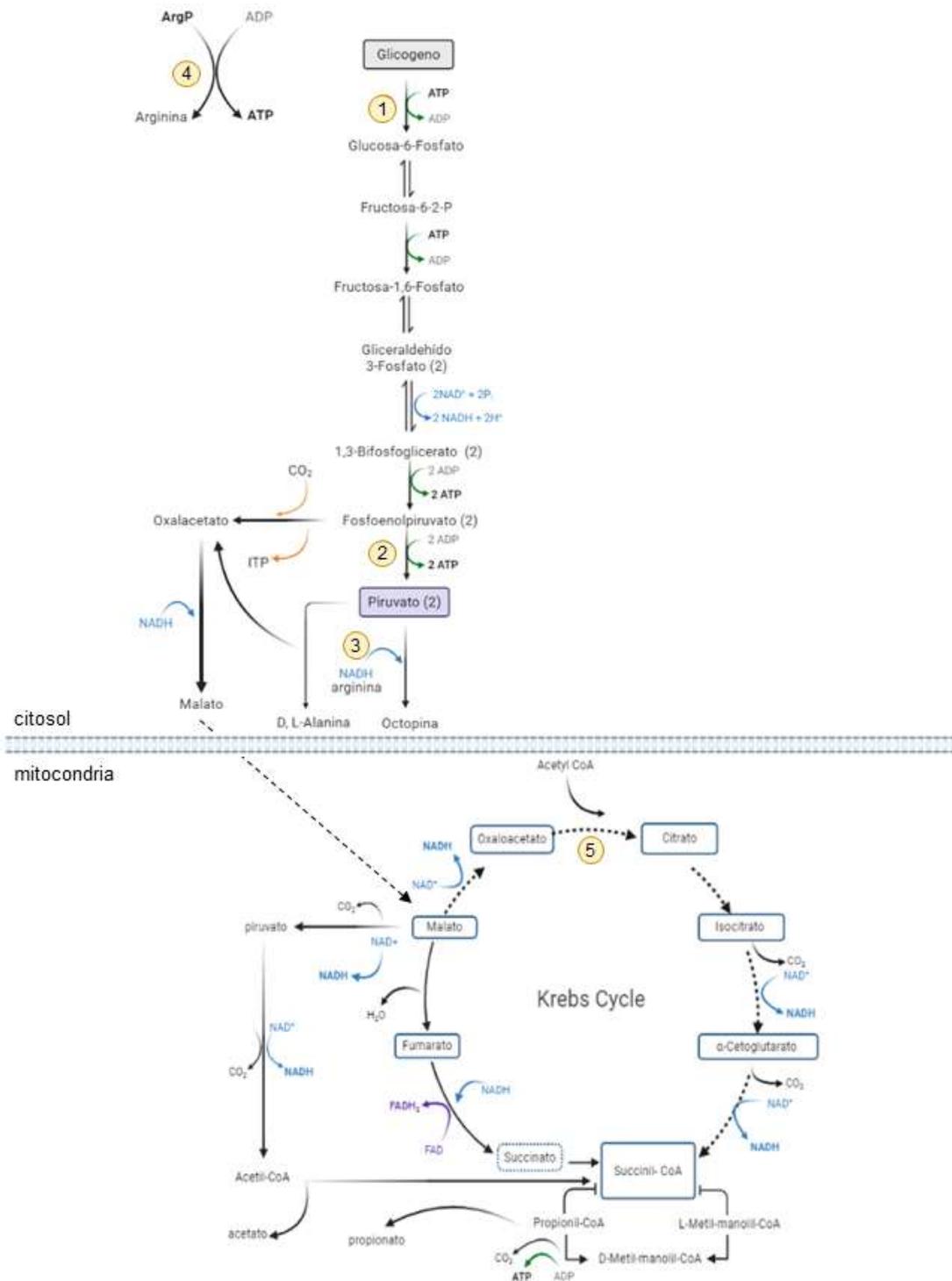
La capacidad de los organismos para responder a retos fisiológicos y ambientales simultáneos o subsecuentes depende tanto de la actividad respiratoria (metabolismo aerobio) como del metabolismo anaerobio de los fosfágenos (55%) y del glucógeno (45%) (Grieshaber *et al.*, 1994; Brokordt *et al.*, 2000; Seibel *et al.*, 2007; Abele, 2012). Los fosfágenos son compuestos fosforilados que sirven como reservas energéticas de fácil acceso. En los invertebrados, la fosfo-arginina (ArgP), sintetizada por la *arginina quinasa* (AK) (Grieshaber *et al.*, 1994)

permite mantener el nivel de ATP en los tejidos durante períodos cortos de alta demanda energética como la respuesta de escape, el desove y/o la exposición inicial a condiciones ambientales subóptimas como los cambios de temperatura (Tremblay & Guderley, 2014) y eventos de hipoxia (Gäde, 1983; Grieshaber *et al.*, 1994; Venter *et al.* 2018). El contenido de ArgP del músculo aductor de los organismos está relacionado con los hábitos de vida de la especie y zona geográfica, con una recuperación de los niveles de ArgP del músculo aductor generalmente más rápido en especies tropicales (minutos) que en especies templadas como *A. opercularis* y *P. magellanicus* (2 a 14h) (Grieshaber, 1978; Livingstone *et al.*, 1981; Brokordt *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2008).

### **2. 3.3 Metabolismo celular**

A nivel celular, las respuestas compensatorias a los cambios ambientales requieren ajustes en la estructura y composición de los organelos (e. g. membranas plasmáticas, mitocondrias, citoesqueleto) así como cambios en la actividad de enzimas metabólicas. En las mitocondrias, las actividades de la citocromo c oxidasa (CCO) y la citrato sintasa (CS) que mantienen el flujo de electrones y protones a través de la cadena respiratoria y el ciclo de Krebs para garantizar el suministro de carbono y energía a las células (Hochachka & Somero, 2002; Belevich *et al.*, 2006; Dunphy *et al.*, 2006; Vosloo & Vosloo, 2013) están estrechamente relacionadas a la capacidad de los ectotermos marinos para aclimatarse a cambios de temperatura y disponibilidad de oxígeno en el ambiente (Heilmayer *et al.*, 2004). Además, los niveles de estas enzimas mitocondriales están directamente relacionadas al nivel de actividad del músculo aductor, mientras que en algunas especies como *Euvola ziczac* y *Chlamys islandica*, *Adamussium colbecki* y *P. magellanicus* una disminución de la capacidad oxidativa de las mitocondrias ha sido relacionada con la maduración de las gónadas y la senescencia de los organismos (Boadas *et al.*, 1997; Brokordt *et al.*, 2000; Kraffe *et al.*, 2008; Phillip *et al.*, 2008; Guderley & Pörtner, 2010). A medida que la demanda energética de las células aumenta, la actividad de las enzimas glicolíticas como la hexoquinasa (HK, *hexokinase*) incrementa para mantener el flujo de energía y carbono a partir del uso de las reservas de glucógeno (Fig. 6). Cuando la demanda de energía es mayor a la capacidad aerobia de los organismos (hipoxia funcional) y/o la disponibilidad de oxígeno disuelto en el agua es limitada (hipoxia ambiental), los organismos utilizan el piruvato (de Zwan *et al.*,

1983; Grieshaber *et al.*, 1994) y aminoácidos libres (e. g. arginina) para la síntesis de opinas (e. g. octopina,) a cargo de piruvato deshidrogenasas (e. g. ODH, *octopina dehydrogenase*). Luego, las células sintetizan alanina y succinato (Greenway & Storey, 1999; Muller *et al.*, 2012) que participan en la regulación del uso del fosfoenolpiruvato (PEP, *phosphoenolpyruvate*) entre otros (Greenway & Storey, 1999; Guppy *et al.*, 2004; Anestis *et al.*, 2007;) para sintetizar succinato, propionato, acetato y fumarato (Livingstone *et al.*, 1981; Gäde, 1983; Pörtner *et al.*, 1984; Grieshaber *et al.*, 1994; Hochachka & Somero, 2002) (Fig. 6). Una vez que la disponibilidad de oxígeno se reestablece (“deuda de oxígeno”) (Herreid, 1980), la síntesis de opinas y la acumulación de arginina (Kreutzer *et al.*, 1989), alanina y succinato ayudan a mantener el equilibrio NADH: NAD, mientras se reduce el efecto de la acumulación de metabolitos anaerobios (e. g. lactato) sobre la acidez de las células (pH 5.5-6.5) (Baldwin *et al.*, 1981; Gäde, 1983; Greenway & Storey, 1999; Ballantyne, 2004; Muller *et al.*, 2012; Venter *et al.*, 2018). Los pectínidos (Pectinidae) habitan una gran diversidad de ambientes marinos que incluyen zonas polares, templadas y tropicales alrededor del mundo. Esta gran diversidad de nichos ecológicos sugiere que existe un amplio espectro de respuestas metabólicas de estas especies a la variabilidad de las condiciones ambientales. Algunas especies como *C. farreri* aumentan la actividad de de la lactato deshidrogenasa (LDH, *lactate dehydrogenase*) en el músculo aductor al ser expuestas a bajas concentraciones de oxígeno (2-3 mg O<sub>2</sub> L), lo que sugiere que su capacidad aerobia fue limitada. Este aumento en su metabolismo anaerobio puede ser una estrategia para prolongar su tiempo de tolerancia a niveles bajos de oxígeno, con un aumento en la tasa de mortalidad después de 16 días (Li *et al.*, 2019). Otras especies, como *A. irradians* son poco tolerantes a eventos agudos de hipoxia severa (< 0.1% SatO<sub>2</sub>, 18h) y una posterior reoxigenación (1h), con daños en la capacidad de oxidación y fosforilación de las mitocondrias de las branquias (e. g. F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATPasa), lo que provoca la pérdida del balance energético de los organismos (Ivanina & Sokolova, 2016). En contraste, las especies más tolerantes a hipoxia como algunos ostiones (*Crassostrea spp.*) y mejillones (*Mytilus spp.*) que están expuestos frecuentemente a hipoxia (emersión), pueden presentar un estado de *depresión metabólica* de corta duración que se caracteriza por la reducción significativa de la tasa metabólica basal (40-80%) y la actividad de la piruvato quinasa (PK, *pyruvate kinase*) (Greenway & Storey, 1999; Guppy *et al.*, 2004; Anestis *et al.*, 2007) (Fig. 6).



**FIGURA 6.** Esquema metabólico de la energía durante la anaerobiosis ambiental y/o funcional en el citoplasma y la mitocondria de un ectotermo marino. Las principales diferencias entre especies son en la síntesis de fosfágenos y los metabolitos de la glucólisis anaerobia. Actividad de algunas de las principales enzimas involucradas en el metabolismo energético: (1) Hexoquinasa. (2) Piruvato quinasa. (3) Octopina deshidrogenasa. (4) Arginina quinasa (5) Citrato sintasa. Modificado de: Kreutzer *et al.*, 1989, Pörtner *et al.*, 1984, Schöttler 1983, 1986, Grieshaber *et al.*, 1994.

#### **2.3.4 Análisis del proteoma**

Las respuestas de los organismos a los cambios ambientales involucran un gasto de energía alto para coordinar la síntesis y reparación de una red compleja de proteínas enzimáticas y estructurales (proteoma) para mantener las funciones y un adecuado nivel de energía para que los organismos realicen sus actividades fisiológicas esenciales como el crecimiento y la reproducción (Hochachka & Somero, 2002; Tomanek, 2014). Las respuestas fisiológicas, celulares y moleculares involucran la actividad de cientos o miles de proteínas, cuya actividad determina el rango de tolerancia de los organismos a los cambios en su ambiente, y, por lo tanto, la distribución y la abundancia de las especies (Pörtner 2010). El estudio comparativo de especies con historias evolutivas diferentes (e. g. ostiones vs. almejas) que comparten el mismo nicho ecológico, y que, por lo tanto, están expuestas a las mismas condiciones ambientales así como congéneres que habitan nichos ecológicos contrastantes (e. g. polar vs. tropical) ha permitido identificar cómo algunas proteínas han evolucionado para reparar y proteger a otras proteínas (e. g. HSP, *heat shock proteins* o proteínas de choque térmico), para mantener la homeostasis celular durante la exposición a temperaturas elevadas (Ulrich & Marsh, 2008; Tomanek, 2012; 2014), y ambientes con bajo nivel de oxígeno disuelto (Guppy & Withers, 1999) o incluso, eventos sinérgicos de hipertemia y bajo nivel de oxígeno disuelto (Artigaud *et al.*, 2015). Esta diversidad en las respuestas interespecíficas del proteoma a la variabilidad ambiental destaca el papel de las proteínas como indicadores de la tolerancia de los organismos a cambios ambientales actuales o futuros (Campos *et al.*, 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN

---

Un análisis del registro histórico de la mortalidad masiva de poblaciones de bivalvos silvestres y cultivados en el mundo sugiere que en el caso de *N. subnodosus* una de las causas principales es el incremento de la temperatura que promueve un costo energético elevado para los organismos, principalmente durante fases de alta demanda de energía para el crecimiento y la maduración de las gónadas. Los eventos de hipertermia frecuentemente están relacionados a una disminución de la disponibilidad de oxígeno disuelto (hipoxia) que pueden tener efectos metabólicos deletéreos sobre el desempeño fisiológico, la respuesta inmunológica y la supervivencia de los organismos. A la fecha no existen estudios que describan el estado energético de *N. subnodosus* en su hábitat y/o sitio de cultivo que permitan identificar su capacidad de respuesta ante cambios ambientales, particularmente en etapas de alto gasto de energía como el crecimiento (juveniles) y la reproducción (adultos). La información generada en este estudio es crucial para conocer la capacidad fisiológica de los organismos para tolerar estos cambios ambientales en su hábitat, así como para identificar marcadores metabólicos potenciales que ayuden a el desarrollo de programas de selección de sitios de cultivo y el manejo de los organismos, así como para identificarsi existe una relación entre la variabilidad ambiental y el colapso de las poblaciones naturales de la especie.

## **IV. HIPÓTESIS**

---

Los organismos presentan variaciones en la demanda energética de acuerdo con su edad y/o su estado fisiológico. En los juveniles, la mayor cantidad de energía es destinada al crecimiento y/o locomoción mientras que, en los reproductores, la demanda de energía es mayor durante etapas de alto esfuerzo reproductivo. El estado fisiológico de los organismos puede limitar su capacidad de respuesta ante una exposición a temperaturas elevadas en sinergia con bajos niveles de oxígeno disuelto o mayor esfuerzo reproductivo.

## V. OBJETIVOS

---

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las respuestas metabólicas a nivel fisiológico y celular de la mano de león *Nodipecten subnodosus* en su hábitat y después de la exposición a diferentes escenarios térmicos en sinergia con eventos simultáneos de baja disponibilidad de oxígeno disuelto y esfuerzo reproductivo.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

#### **CAPÍTULO 1. Efecto de la aclimatación corta en laboratorio sobre el estado energético de juveniles y reproductores de la mano de león *N. subnodosus***

1. Evaluar el estado energético y la actividad de enzimas metabólicas en el músculo aductor y el manto de juveniles y reproductores de mano de león *N. subnodosus* después de una aclimatación corta (ocho días) en condiciones de laboratorio.

#### **CAPÍTULO 2. Metabolismo energético de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* influenciados por el efecto combinado de la hipertermia aguda y la baja disponibilidad de oxígeno**

2. Analizar el estado energético y las respuestas metabólicas a nivel fisiológico y celular en el músculo aductor y el manto de juveniles de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones de hipertermia aguda (30 °C) y baja disponibilidad de oxígeno disuelto (2.7 mg O<sub>2</sub> L).

#### **CAPÍTULO 3. Respuestas metabólicas de adultos de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones de hipertermia aguda y esfuerzo reproductivo**

3. Analizar las respuestas metabólicas a nivel fisiológico y celular en el músculo aductor y el manto de adultos de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones de hipertermia aguda (30 °C) durante dos etapas de esfuerzo reproductivo.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

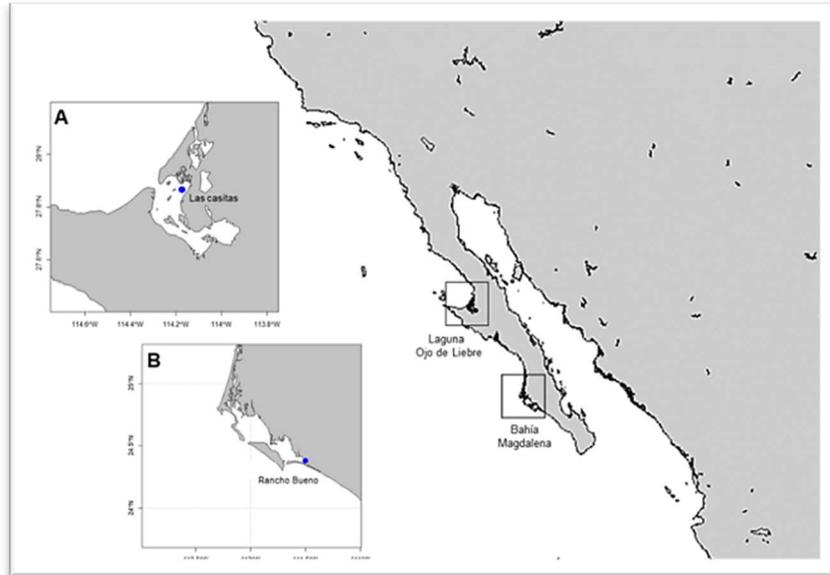
---

Debido a que este trabajo se dividió en capítulos y que cada uno de ellos cuenta con su propia sección de materiales y métodos, en esta sección se presenta la información general que aplica en todos los casos.

### 6.1 Sitio de cultivo y colecta de organismos

Por cuestiones de disponibilidad de organismos, se utilizaron organismos cultivados en dos sitios diferentes: laguna Ojo de Liebre para los juveniles (efecto temperatura-hipoxia) y Bahía Magdalena para los adultos (efecto temperatura-esfuerzo reproductivo) de mano de león *N. subnodosus*. Es importante señalar que existen ciertos antecedentes de que las mortalidades estivales han estado más asociadas a la época de desove en Bahía Magdalena (Koch *et al.*, 2005) que, si bien representa un sitio ideal para su cultivo en términos de crecimiento por su alta disponibilidad de alimento (Racotta *et al.*, 2013; Koch *et al.*, 2015), registra mayores valores de temperatura que la laguna Ojo de Liebre. Para el caso de los juveniles, se decidió trabajar con organismos cultivados en la laguna Ojo de Liebre debido a que, paralelamente al desarrollo de este trabajo, en esas épocas, se inició un cultivo piloto en dicha localidad para compensar la falta de recurso pesquero en la localidad. Por ende, se consideró importante obtener la mayor cantidad de información posible sobre el desempeño en cultivo de los organismos, en este caso acerca de la tolerancia y respuestas a condiciones de hipertermia e hipoxia que pudiesen ocurrir en lagunas costeras en escenarios de cambio climático.

Durante 2014-2017 se realizaron los cultivos de los juveniles y los reproductores de mano de león *N. subnodosus* en Las Casitas, laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur, México (27°51'50" N 114°08'42" W) y en Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B. C. S. (25°10'10" N 112°11'24" W y 24°26'24" N 113°33'00" W), respectivamente (Fig.7, Anexo 1).



**FIGURA 7.** Localización de sitio de cultivo y colecta de los juveniles y reproductores de mano de león *N. subnodosus*. **A.** Cultivo de juveniles en Las Casitas, laguna Ojo de Liebre B.C. S, México. **B.** Cultivo de reproductores en Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B.C.S., México.

## 6.2 Monitoreo de variables ambientales

Para identificar cuáles son las condiciones ambientales de la zona de colecta de los juveniles y los reproductores de *N. subnodosus* (capítulo 1) y su uso potencial para el diseño de retos térmicos en sinergia con la hipoxia en el laboratorio (capítulos 2 y 3) se utilizaron bases de datos públicas de la NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*, Estados Unidos). Adicionalmente, se realizó el monitoreo de la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), la disponibilidad de alimento (clorofila-*a*,  $\text{mg m}^3$ ) y la concentración de oxígeno disuelto ( $\text{mg O}_2 \text{ L}$ ) en cada sitio de cultivo de los organismos.

## 6.3 Monitoreo del crecimiento de los juveniles

Para confirmar que los organismos se encontraran en una fase de crecimiento sin maduración de las gónadas, se estableció la relación de peso seco de los tejidos (g)-longitud total de las valvas (cm) ( $n=134$ ) durante el período de cultivo (diciembre 2016 a junio 2017) con un modelo de regresión lineal, en donde el valor de la pendiente ( $b < 3$ ) fue un indicador de crecimiento alométrico (Velázquez-Abunader *et al.*, 2016). De manera simultánea, se realizó la inspección visual de la coloración de las gónadas, considerando que, los organismos inmaduros presentan gónadas pequeñas y traslúcidas (Arellano-Martínez *et al.* 2004).

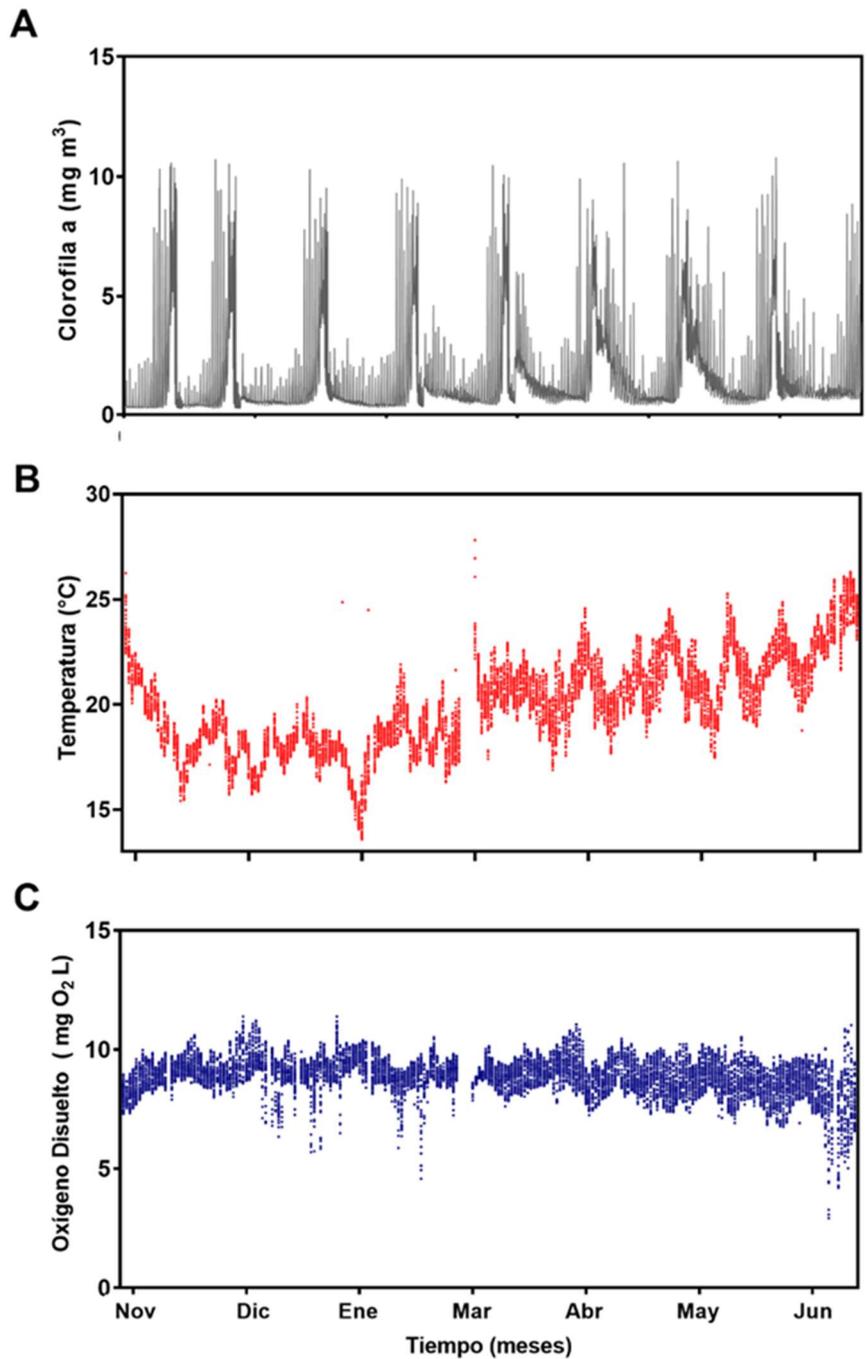
## VII RESULTADOS

---

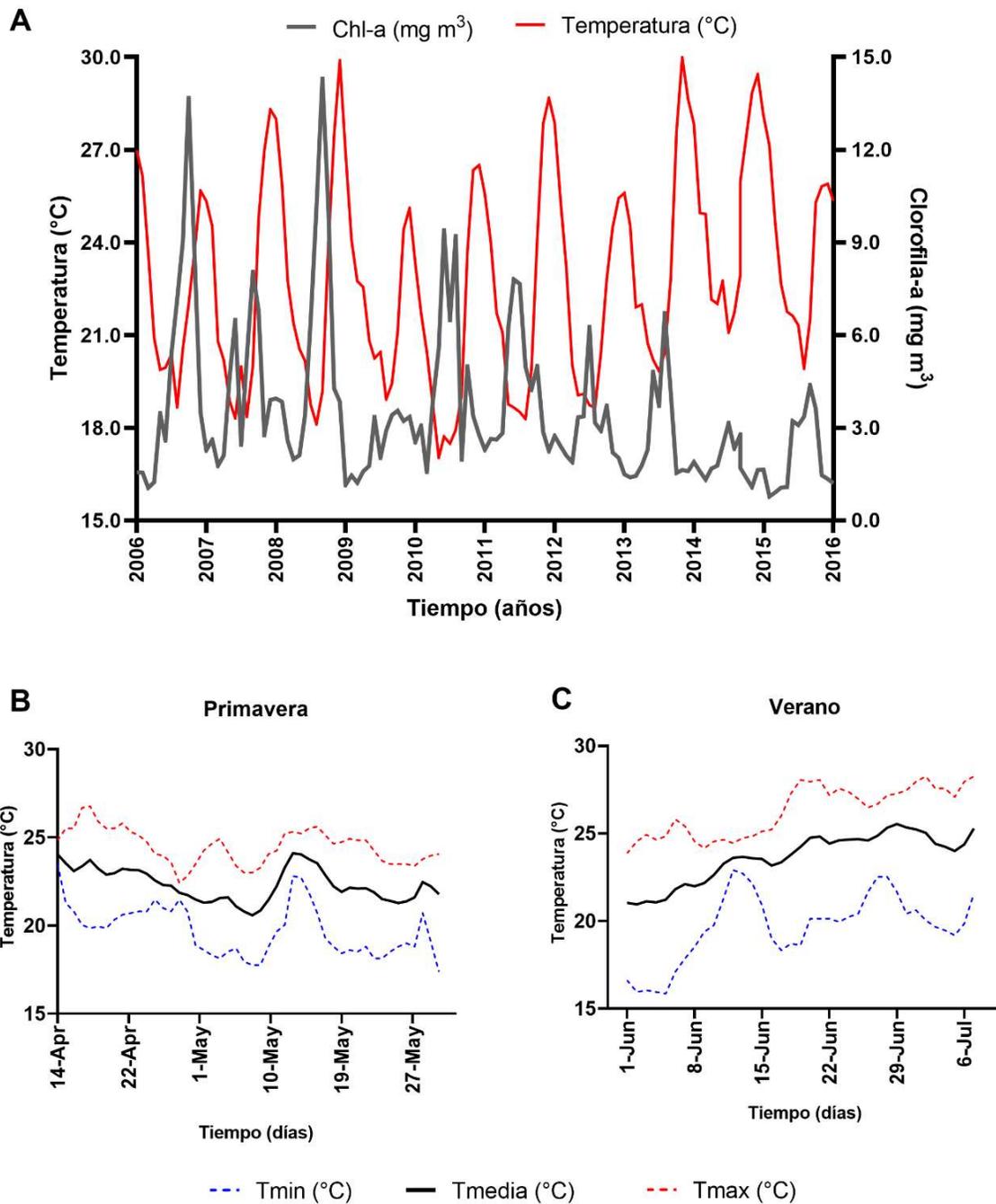
Debido a que este trabajo se dividió en capítulos y que cada uno de ellos cuenta con su propia sección de resultados, en esta sección se presenta la información general que aplica en todos los casos.

### 7.1 Monitoreo de variables ambientales

La temperatura superficial del mar (°C) (SST, Aqua MODIS, NPP, 0.025 *degrees*, Pacific Ocean, *daytime*, 2006-*present*, *monthly composite*) y la concentración de clorofila-*a* (chl-*a*, mg m<sup>3</sup>) (Aqua MODIS, VIIRS, *science quality*, *global*, *level 3*, 2012-*present*, *monthly composite*) de la laguna Ojo de Liebre, mientras que la temperatura media superficial del mar (°C) (SST, Aqua MODIS, NPP, 4 km, *Daytime*, 11 *microns*, 2003-*present*, *monthly composite*) y concentración de clorofila *a* (Aqua MODIS, NPP, L3SMI, *global*, 4km, *science quality*, 2003- *present*, *monthly composite*) de Bahía Magdalena.. La temperatura (°C) y el nivel de oxígeno disuelto (%SatO<sub>2</sub>) del sitio de cultivo de los juveniles y los reproductores de *N. subnodosus* (<2 m profundidad) fue monitoreado cada 30 minutos con sensores digitales en “Las Casitas” en la laguna Ojo de Liebre (miniDOT, Precision, Measurement Engineering Inc., Estados Unidos) y en Rancho Bueno, Bahía Magdalena (Onset UA-002-64, EUA) respectivamente (Figs. 8, 9). Adicionalmente, el contenido de chl-*a* (mg m<sup>3</sup>) de muestras de agua tomada en el sitio de cultivo de los juveniles se analizó cada 15 días con un espectrofotómetro con la fórmula de Strickland and Parsons (1972).



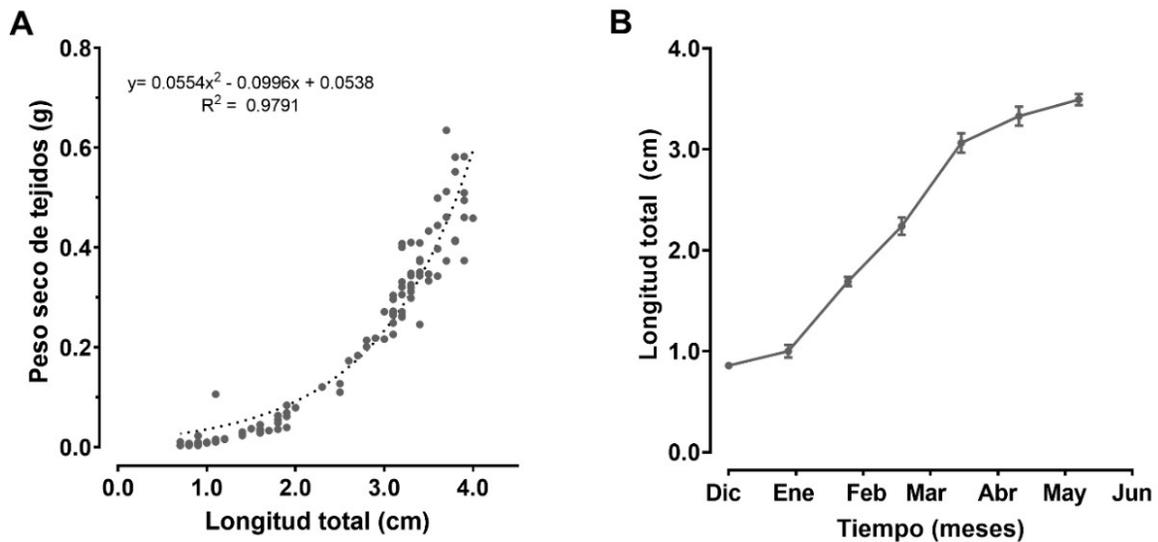
**FIGURA 8.** Concentración de clorofila *a* ( $\text{mg m}^{-3}$ ) (●), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (●) y oxígeno disuelto ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) (●) en el sistema de cultivo de juveniles de mano de león *N. subnodosus* en la laguna de Ojo de Liebre, B.C.S., México del 01 de noviembre, 2016 al 30 de junio 2017. Los datos de clorofila *a* se obtuvieron de la base de datos pública NOAA, mientras que los datos de temperatura y oxígeno disuelto fueron obtenidos de un sensor digital de alta frecuencia (miniDOT, Precision, Measurement Engineering Inc., Estados Unidos) colocado en el sistema de cultivo de los organismos.



**FIGURA 9.** A. Registro térmico (●) y contenido de clorofila *a* (●) en Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B.C.S. A. Temperatura superficial del mar (°C) y concentración de clorofila *a* (mg m<sup>3</sup>) obtenido de base de datos pública NOAA para la década 2006-2016. B. Temperatura registrada diariamente durante la primavera (abril-mayo, 2016) C. el verano (junio-julio, 2016) en el sitio de cultivo de los reproductores de *N. subnodosus*. T<sub>min</sub> (azul), T<sub>media</sub> (negro), T<sub>max</sub> (rojo): temperatura mínima, media y máxima, respectivamente.

## 7.2 Biometría de los juveniles de mano de león

Los juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México presentaron un crecimiento alométrico durante el período de cultivo (noviembre, 2016 –junio, 2017) (Fig. 10A). Asimismo, se observó un aumento de tamaño de las valvas ( $0.85 \pm 0.03$  a  $3.5 \pm 0.05$  cm, LT) como del peso seco de los tejidos ( $0.013 \pm 0.005$  a  $0.41 \pm 0.02$  g) de los organismos durante el primer año de vida (Fig. 10B).



**FIGURA 10.** Crecimiento de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* durante su cultivo en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S. México de noviembre 2016 a junio 2017. **A.** Relación entre las variables morfométricas peso seco de tejidos (g) y longitud total de las valvas (cm). **B.** Crecimiento de los juveniles durante el primer año de vida. N= 134. Media  $\pm$  SE media de la longitud total de los organismos (cm) por mes de muestreo.

## CAPÍTULO 1

---

### **Efecto de la aclimatación corta en laboratorio sobre el estado energético de juveniles y reproductores de la mano de león *N. subnodosus***

#### ***Resumen***

Los ectotermos marinos modifican su metabolismo energético en respuesta a cambios fisiológicos y las condiciones ambientales de su hábitat. El conocimiento del estado energético de las poblaciones naturales y cultivadas permite identificar la capacidad de respuesta de los organismos a cambios ambientales en el laboratorio. Dado que los bioensayos de eco-fisiología para evaluar las respuestas metabólicas a nivel fisiológico y, celular y molecular ante eventos de cambios ambientales o endógenos (e.g. hipertermia, hipoxia, esfuerzo reproductivo, etc) se realizan en condiciones controladas de laboratorio que pueden influir en el estado metabólico y energético de los animales. El objetivo de este estudio fue evaluar el estado energético de *N. subnodosus* (Pectinidae) en el campo (C) y después la aclimatación corta ( $22\pm 1$  °C, 8 días) en el laboratorio (L). Los juveniles ( $35.0 \pm 0.50$  mm, LT) con gónadas incipientes (verano,  $20.0\pm 2.2$  °C) y los reproductores ( $77.5\pm 7.1$  mm, LT) en etapas iniciales (primavera,  $22.3\pm 1.7$  °C) y avanzadas de desarrollo gonádico (verano,  $23.6\pm 2.6$  °C) fueron colectados en la laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena, B. C. S., México. El estado energético de los organismos (C y L) se analizó a través del contenido de energía (CEA, ArgP) y la actividad de siete enzimas metabólicas en el músculo aductor y el manto, mientras que el estado reproductivo se evaluó con el uso de índices morfométricos (IGS, IMG) y técnicas histológicas. En *N. subnodosus* (C), el nivel de energía (CEA) en el músculo aductor fue similar independientemente de la edad, el origen y la temporada de colecta. En los reproductores, existen variaciones estacionales en el metabolismo energético en relación con el desarrollo gonádico. Durante etapas iniciales de desarrollo gonádico (primavera), aumenta el metabolismo de carbohidratos (HK, PK) en el músculo aductor y en el manto. En etapas avanzadas de desarrollo gonádico (verano), la respiración celular aumenta (CCO/CS) así como el metabolismo de fosfágenos (AK) y guaninas (GTP) del músculo aductor, con cambios en la actividad glicolítica (PK/CS) en el manto. Estos resultados muestran que los juveniles y reproductores de *N. subnodosus* presentaron niveles de energía adecuados para su crecimiento y su reproducción en el campo

(C) ante temperaturas máximas de verano de 26.3°C (junio, 2017) y 28.3°C (julio, 2016), respectivamente, y una disponibilidad de alimento (chl-*a*) que osciló de manera similar en ambos sitios de colecta (1.2 a 4.4 mg m<sup>3</sup>).

Después de una aclimatación de 8 días en el laboratorio (L), los juveniles y los reproductores mostraron un mayor nivel de ArgP en el músculo aductor, que coincidió con el aumento de la actividad glicolítica (HK, PK) y una disminución en el metabolismo de fosfágenos (AK) y opinas (ODH) tanto en el músculo aductor como en el manto. Finalmente, la actividad de las mitocondrias (CCO) del músculo aductor mostró las variaciones más significativas entre grupos y condiciones. Estos resultados indican que *N. subnodosus* presenta cambios en el metabolismo de la energía del músculo aductor y el manto que reflejan su capacidad para compensar cambios fisiológicos (e. g. reproducción) así como cambios ambientales en el campo. Para el desarrollo de bioensayos en el laboratorio sobre la tolerancia de la especie a cambios ambientales en su hábitat, se pudo inferir que las condiciones de laboratorio no modificaron la capacidad de respuesta de los organismos en comparación con el medio natural.

**Palabras clave:** tolerancia, ambiente, crecimiento, esfuerzo reproductivo, bioensayos.

## ***Introducción***

Los organismos modulan continuamente su metabolismo para compensar el costo energético de sus actividades fisiológicas y la exposición a variaciones ambientales continuas en su hábitat. Esta respuesta compensatoria se conoce como aclimatación y comprende una serie de respuestas celulares que reflejan la capacidad fisiológica de los organismos para mantener su homeostasis energética frente a los cambios en el medio ambiente (Hochachka & Somero, 2002; Rohr *et al.*, 2018). Algunos estudios han documentado la respuesta de los moluscos bivalvos a la aclimatación en condiciones controladas en el laboratorio con el fin de confirmar que los organismos se encuentran en un estado fisiológico óptimo (Thompson *et al.*, 2012). En los moluscos bivalvos, estas respuestas pueden incluir cambios sensoriales y mecanismos de regulación a nivel fisiológico (tasa respiratoria), celular (actividad mitocondrial) y molecular (metabolitos) que pueden estar sucediendo incluso durante varios días o semanas (Hochachka & Somero, 2002; Angilleta, 2009). Las respuestas compensatorias a los cambios ambientales (e. g. temperatura) dependen de los regímenes a los que estuvieron expuestos los organismos durante su historia de vida. Los organismos que son aclimatados a temperaturas más frías que aquellas de su hábitat natural generalmente disminuyen su actividad metabólica, conservando su capacidad de respuesta interespecífica. Esta capacidad de aclimatación puede ser reversible si ocurre durante alguna etapa del ciclo de vida de un organismo, o transgeneracional, si tiene efectos sobre la línea parental o la prole de los individuos (Bayne, 2017). Aunado a ello, la capacidad de aclimatación puede diferir no solo con la latitud, sino también de acuerdo con la edad y el tamaño corporal de los organismos (Rohr *et al.*, 2018) con efectos sobre la abundancia y la distribución de las especies.

En los cultivos piloto de *N. subnodosus* que se han desarrollado en lagunas costeras como Ojo de Liebre y Bahía Magdalena, los eventos atípicos de temperaturas elevadas han sido asociados a la disminución de las tasas de crecimiento y supervivencia de los juveniles, así como a eventos de mortalidad en los reproductores cultivados (Barrios-Ruiz *et al.*, 2003; Villalejo *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005; Osuna-García *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2015). La evaluación del estado energético de los organismos cultivados permite identificar su tolerancia a nivel fisiológico, celular y molecular ante cambios ambientales (e. g. hipertermia, hipoxia, etc). Los bioensayos de ecofisiología que se realizan en condiciones controladas de

laboratorio pueden aportar información importante sobre la capacidad de los organismos para tolerar estos cambios, siempre y cuando reflejen las condiciones naturales del hábitat (Peck *et al.*, 2009). Sin embargo, las condiciones de laboratorio (alimento, temperatura, fotoperíodo, protocolo de manejo, etc) pueden influir en el estado metabólico y energético de los organismos, y, por lo tanto, incidir en la interpretación de su capacidad de respuesta en su hábitat natural (Dudognon *et al.*, 2015). En ese contexto, el objetivo de este estudio fue analizar el estado energético metabólico de los juveniles y los reproductores de *N. subnodosus* colectados en el campo y evaluar los efectos de una semana de aclimatación en condiciones controladas de laboratorio. Para ello, se determinaron el estado energético (CEA, ArgP) y la actividad de siete enzimas metabólicas en el músculo aductor y el manto de los juveniles cultivados en la laguna Ojo de Liebre y de los reproductores cultivados en Rancho Bueno, Bahía Magdalena durante etapas iniciales (primavera) y avanzadas de maduración gonádica (verano). Esta información es fundamental para inferir la capacidad de respuesta de las poblaciones a cambios ambientales en su hábitat y/o para el desarrollo de futuras investigaciones sobre la tolerancia de la especie a cambios ambientales en el laboratorio.

## ***Materiales y métodos***

### ***Monitoreo de datos ambientales***

Ver Sección 6.2 *Monitoreo de variables ambientales*.

### ***Colecta de organismos***

Los juveniles (n=60) ( $35.0 \pm 0.50$  mm, LT) fueron colectados en Las Casitas, laguna Ojo de Liebre durante el verano (30 junio 2017,  $20.0 \pm 2.2$  °C) mientras que los reproductores (n=80) ( $77.5 \pm 7.1$  mm, LT) fueron colectados en Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B. C. S. durante la primavera (21 mayo 2016,  $22.3 \pm 1.7$  °C ) y el verano (07 julio 2016,  $23.6 \pm 2.6$  °C ), respectivamente (Fig. 7). En cada fecha de colecta, los organismos se colocaron en contenedores de poliuretano con agua de la zona de colecta ( $22 \pm 1$  °C) y aireación constante con una bomba portátil (Promar, AC710, Estados Unidos) protegidos de la luz solar durante su transporte en lancha hasta la línea de costa. La temperatura del agua se mantuvo constante con un flujo continuo de agua marina fresca desde un reservorio donde se regulo con el uso

de hielo en contenedores con tapa hermética que se dejaron flotar sobre la superficie del agua para evitar la mezcla de agua dulce y marina. La temperatura del agua fue monitoreada de manera continua con un termómetro de mercurio. Posteriormente, se realizó la limpieza de las valvas de cada organismo con un cepillo de cerdas suaves, y se colocaron nuevamente en el contenedor con un recambio total de agua.

### ***Muestreo de tejidos en el campo***

Para evaluar el estado energético inicial de los organismos colectados en el campo (grupo C), se realizó el muestreo de tejidos *in situ* dentro de las primeras dos horas posteriores a la colecta de juveniles (n=10) y reproductores (n=10) seleccionados de manera aleatoria en cada fecha de colecta. De cada organismo, se obtuvo la longitud total de las valvas (LT, mm) con un vernier digital (CD-6CS, Mitutoyo, Japón), así como el peso húmedo total de los tejidos, el peso del músculo aductor y las gónadas (g) con una balanza digital (ML602E, Mettler Toledo). Los tejidos fueron almacenados de manera individual en sobres de aluminio y preservados de inmediato en nitrógeno líquido, a excepción de una porción de cada gónada de los organismos adultos, que fueron preservadas en solución de Davidson para el análisis histológico (Arellano-Martínez *et al.* 2004).

### ***Transporte de organismos***

El transporte de los juveniles (n=50) y los reproductores (n=70) para cada fecha de colecta se realizó en contenedores de poliuretano con agua marina del medio ( $22\pm 1$  °C) con aireación constante ( $\geq 70\%$  SatO<sub>2</sub>) suministrada con una bomba portátil (Promar, AC710, Estados Unidos) desde la zona de colecta hasta el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en la Paz, B. C. S. Durante el transporte, la temperatura del agua se mantuvo constante ( $22\pm 1$  °C) de acuerdo con lo descrito previamente. La temperatura del agua fue monitoreada de manera continua con un termómetro de mercurio y un sensor digital (Onset UA-002-64, Estados Unidos).

### ***Aclimatación de organismos en el laboratorio***

Los organismos se mantuvieron en tanques de polietileno con agua marina (150 L, 0.2 L org<sup>-1</sup>) a la temperatura media del sitio de colecta (22± 1°C) con aireación constante y fotoperíodo 12 L:12 O durante un período corto de aclimatación (ocho días). El monitoreo de la salinidad (35-36 ppm, Extech Instruments, Waltham, MA, Estados Unidos), el oxígeno disuelto (≥90% SatO<sub>2</sub>, TX2, Presens, Alemania) y la supervivencia de los organismos (%) se realizó diariamente. A las 12 horas posteriores al ingreso de los organismos en el laboratorio, se proporcionó a los organismos una dieta mixta de microalgas *I. galbana* y *C. calcitrans* (90,000 cel mL<sup>-1</sup>, 1:1) diariamente durante el período de aclimatación. La concentración de la dieta de microalgas en cada tina y el consumo de alimento de los organismos fue monitoreada de manera periódica cada día con un contador de partículas (multisizer 3, Beckman Coulter, Estados Unidos).

### ***Muestreo después de una aclimatación corta al laboratorio***

Para evaluar el estado energético de los organismos al finalizar el período de aclimatación (8 días) (grupo L), se seleccionaron de manera aleatoria un grupo de juveniles (n=10) y reproductores (n=10). Los organismos se mantuvieron en ayuno (12h) en una tina en las mismas condiciones de aclimatación. Al día siguiente, se realizó la disección de los tejidos de los organismos de acuerdo con lo descrito previamente para los organismos colectados en el campo (grupo C).

### ***Índices morfométricos***

El índice de condición (IC) fue calculado como la proporción del peso húmedo de los tejidos (W<sub>t</sub>, g) con relación al peso seco de las valvas (W<sub>v</sub>, g) de acuerdo con la siguiente fórmula (Schmidt *et al.*, 2008):

$$IC(\%) = \left( \frac{W_t}{W_v} \right) \times 100$$

El índice del músculo aductor (IMA) se estimó como la proporción del peso húmedo del músculo aductor (W<sub>m</sub>, g) en relación con el peso húmedo de los tejidos (W<sub>t</sub>, g) con la siguiente fórmula (Schmidt *et al.*, 2008):

$$IMA(\%) = \left( \frac{Wm}{Wt} \right) \times 100$$

El índice gonadosomático (IGS) definido como la proporción del peso de las gónadas (Wg, g) con relación al peso total de los tejidos del organismo (Wt, g) fue calculado sustrayendo el peso de las gónadas del peso húmedo total de los tejidos, usando la siguiente fórmula:

$$IGS(\%) = \left( \frac{Wg}{Wt - Wg} \right) \times 100$$

El índice de masa gonadal (IMG) se calculó como la proporción de la masa de las gónadas en relación con la altura estándar de las valvas de los organismos adultos utilizados en este estudio (77.55 mm). La relación alométrica, para los organismos colectados en cada estación del año, entre el tamaño de la gónada y el tamaño corporal se expresó como  $Y = aH^b$ , en donde Y es la masa de las gónadas (g) y H es la altura de las valvas (mm), *a* representa el intercepto, y *b* es el exponente (coeficiente alométrico). Todos los datos fueron transformados a logaritmo base 10 ( $\log_{10}$ ) para mantener la linealidad y homocedasticidad de las varianzas, aplicando la siguiente ecuación (Bonardelli *et al.*, 1996; Williams & Babcock, 2005):

$$\log Y = \log a + b \log H$$

#### ***Análisis histológico de las gónadas***

El análisis histológico de las gónadas de los reproductores colectados en el campo durante la primavera (n=10) y el verano (n=10), y en los organismos acondicionados durante 8 días en el laboratorio en primavera (n=10) y en el verano (n=10) se realizó en el Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN). La porción masculina y femenina de cada gónada fue deshidratada con alcohol de 70 a 100%, fueron aclaradas con Hemo-D y embebidas en Paraplast-Xtra y se realizaron cortes de 4  $\mu$ m de grosor con un micrótomo. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina y eosina (Humason, 1979) y descritos de acuerdo a las siguientes fases gonádicas: **I**) indiferenciados, caracterizados por la ausencia de células gaméticas; **II**) desarrollo temprano, con folículos expandidos que contiene oogonias o espermatogonias adheridas a la pared del folículo; **III**) desarrollo tardío, caracterizado por el incremento de

gametos maduros; **IV**) maduración, con folículos casi llenos de oocitos post-vitelogénicos libres en el lumen; **V**) desove o desove parcial, con cantidades variables de folículos que están completa o parcialmente vacíos; **VI**) post-desove, los cuales corresponden a una fase de recuperación posterior al desove y, **VII**) reabsorción, que incluye fagocitosis de oocitos residuales (Arellano-Martínez *et al.*, 2004, 2011). Las imágenes del desarrollo gonádico (40X) se obtuvieron con un microscopio (Leica DM4B, Alemania) conectado a una cámara digital (Leica, DMC2900, Alemania) con el software LAS V 4.12.

### ***Composición de nucleótidos***

El análisis de la composición de nucleótidos, CEA y ArgP en el músculo aductor de *N. subnodosus* se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). El músculo aductor de cada organismo fue pulverizado en condiciones criogénicas en un molino mezclador (MM400, Retsch, Alemania). Una alícuota de polvo congelado (100 mg) fue homogenizado en un polytron (PT 6100D, Kinematica AG, Suiza) a 180g durante 30 segundos en 1.5 mL de ácido tricloroacético 0.5M frío y posteriormente centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante fue recuperado para adicionar 1.3 mL de solución de trioctilamina:diclorometano (1:5) para homogenizar en vortex (60s). La muestra fue centrifugada a 2000 rpm a 4 °C por 5 minutos. El extracto acuoso neutralizado (200µL, fase inferior) se filtró a 0.2 µm y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El contenido de nucleótidos en el músculo aductor de *N. subnodosus* se analizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Modelo 1100, Agilent Technologies, Estados Unidos) de fase reversa de intercambio iónico con base al método de Moal *et al.*, (1989a) modificado por Robles *et al.*, (2016) en una columna Hyperclone ODS (C18) de 150 x 4.6 mm y diámetro de partícula de 3 µm (Phenomenex, Estados Unidos) conectada a una pre-columna C18 de 40 x 3 mm (Phenomenex, Estados Unidos). La separación de los nucleótidos se realizó en una fase móvil 0.15M de fosfato de sodio monobásico (H<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>P), 3 mM de tetrabutyl de amonio 40% y 8% de metanol a pH 6.0 con un flujo de 0.8 mL min<sup>-1</sup> durante 22 minutos. La identificación de los nucleótidos se realizó con 25 µL de una mezcla de estándares comerciales de ADP, AMP, GTP, DGP y ATP y 5 µL de estándares comerciales de IMP y HPX a concentración conocida de acuerdo con lo descrito por Robles et al. (2016). Todos los

reactivos fueron de Sigma Aldrich, Merck (St. Louis, CA, Estados Unidos) y Fermont (México). La carga energética (CEA) se estimó de acuerdo con la fórmula propuesta por Atkinson (1968):

$$CEA = \frac{(ATP + 0.5 ADP)}{(ATP + ADP + AMP)}$$

### ***Contenido de Fosfo-arginina***

El contenido de fosfo-arginina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) del músculo aductor de cada organismo se analizó por HPLC (Modelo 1100, Agilent Technologies, Estados Unidos) en una columna SpheroClone  $\text{NH}_2$  250 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de  $5\mu\text{m}$  (Phenomenex, Estados Unidos) conectada a una pre-columna C18 de 40 x 3 mm (Phenomenex, Estados Unidos) con una fase móvil de 0.02M de fosfato de potasio y acetonitrilo (72:28) a pH 2.6 de acuerdo al método descrito por Viant *et al.* (2001) y modificado por Robles *et al.* (2016). Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma Aldrich, Merck, St. Louis, CA, Fermont, México y Santa Cruz Biotechnologies, Estados Unidos. La muestra ( $5\mu\text{L}$ ) se analizó a un flujo de  $1.0\text{ mL}^{-1}\text{ min}^{-1}$  durante 18 minutos, usando  $5\mu\text{L}$  de un estándar comercial de fosfo-arginina a concentración conocida para su identificación en las muestras.

### ***Actividad de las enzimas metabólicas***

El procesamiento de las muestras para la medición de la actividad de las enzimas metabólicas de *N. subnodosus* se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Las actividades de enzimas metabólicas HK (hexoquinasa), PK (piruvato quinasa), CCO (citocromo c oxidasa), CS (citrato sintasa), LDH (lactato deshidrogenasa), ODH (octopina deshidrogenasa) y AK (arginina quinasa) se analizaron en el músculo aductor y manto pulverizado (50 mg) de cada organismo usando buffers de homogenización específicos para la actividad máxima de cada enzima de acuerdo con lo descrito en Salgado-García *et al.* (2020). Las muestras de manto para la actividad de las enzimas mitocondriales (CCO, CS) fueron preparadas con buffer 200 mM Imidazol, 5mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1 M NaF, 0.1% Tritón X100, 0.2 mM PMSF, pH 7.2. Todas las muestras de manto fueron centrifugadas a 900 g,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min. Todos los homogenados fueron procesados en un polytron (PT 6100D, Kinematica AG, Suiza) a 180 g durante 30s a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y

un sonicador (Q125-110, Qsonica, Newtown, CT) por intervalos (30% output, 3x, 10s, 4 °C). La actividad de cada enzima fue determinada en el sobrenadante en un lector de microplacas (VariosKan Lux, ThermoScientific, Finlandia) a temperatura constante (24 °C) durante la primera hora de obtención de los homogenados de cada tejido. Las condiciones óptimas de análisis de cada enzima fueron establecidas en bioensayos preliminares para cada tejido. Todos los reactivos utilizados en los ensayos enzimáticos fueron de Sigma Aldrich, Merck (St. Louis, CA, Estados Unidos). Todas las mediciones de actividades se realizaron por triplicado (o duplicado) para cada muestra y la actividad específica de cada enzima (AE) se expresó como  $\mu\text{mol}$  de sustrato convertido a producto por minuto y por gramo (g) de peso húmedo de tejido usando la siguiente fórmula:

$$AE (U g^{-1}) = \frac{[Ab \times FD \times V_r]}{[S_\epsilon \times Cp \times V_m]}$$

En donde: **Ab** es la absorbancia de la muestra, **FD** es el factor de dilución, **Vr** el volumen de reacción ( $\mu\text{L}$ ), **S $\epsilon$**  es el coeficiente de extinción molar del sustrato de la reacción, **Cp** es el valor de corrección del paso de la luz en la placa de acuerdo con el fabricante y **Vm** es el volumen de la muestra ( $\mu\text{L}$ ).

Las enzimas se analizaron en las siguientes condiciones:

*Hexoquinasa* (HK, EC 2.7.1.1): 75 mM Tris-HCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM EDTA, 3 mM KCl, 2 mM DTT, 2.5 mM ATP, 1 mM glucosa, 0.4 mM NADP, 1 U ml<sup>-1</sup> G6PDH, pH 7.3. A: 340 nm. K: 10 min.  $\epsilon\text{NADH} = 6.22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Piruvato quinasa* (PK, EC 2.7.1.40): 50 mM Imidazol-HCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM ADP, 0.15 mM NADH, 1 U ml<sup>-1</sup> LDH, 2.5 mM PEP, pH 7.2. A: 340nm. Cinética: 14 min.  $\epsilon\text{NADH} = 6.22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Citocromo c oxidasa* (CCO, EC 1.9.3.1): 50 mM fosfato, 50 mM citocromo c, pH 7.0. Abs.: 550 nm. Cinética: 10min.  $\epsilon\text{Cyt c} = 29.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Citrato sintasa* (CS, EC 2.3.3.1): 100 mM Tris-HCl, 0.1 mM Acetil CoA, 0.1 mM DNTB, 1 mM oxaloacetato, pH 8.0. A: 412nm. Cinética: 14 min.  $\epsilon\text{TNB} = 13.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Lactato deshidrogenasa* (LDH, EC 1.1.1.27): 50 mM imidazol-HCl, 2.5 mM piruvato de sodio, 0.1 mM NADH, pH 6.6. A: 340 nm. Cinética: 10 min.  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Octopina deshidrogenase* (ODH, EC 1.5.1.11): 50 mM Imidazol-HCl, 2.5 mM sodium piruvato de sodio, 3 mM L-arginina, 0.1 mM NADH, pH 6.6. A: 340 nm. Cinética: 10 min.  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Arginina quinasa* (AK, EC 2.7.3.3): 50 mM Imidazol-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 1 mM PEP, 0.40 mM NADPH, 1 U ml<sup>-1</sup> PK, 1 U ml<sup>-1</sup> LDH, pH 7.2. A: 340nm. Cinética: 14 min.  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### ***Análisis estadísticos***

Todas las variables fueron analizadas para comprobar su normalidad y homocedasticidad usando pruebas de Bartlett y Levene, respectivamente. Se utilizaron transformaciones arcoseno y logaritmo cuando fue necesario para cumplir con los supuestos. Se aplicó una prueba de student de variables independientes por grupo para evaluar el efecto de la condición (campo vs. laboratorio) sobre las variables metabólicas analizadas en el músculo aductor y el manto de los juveniles. Adicionalmente, se utilizó un análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*) para identificar las asociaciones entre el contenido de energía (CEA, ArgP) y el nivel de actividad de enzimas metabólicas analizadas en el músculo aductor de los juveniles y/o reproductores colectados en campo (C) y aclimatados (L) con los paquetes devtools, ggplot2, FactoMineR y factoextra desarrolladas para R v. 3.6.2 (2019-12-12). Un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías fue utilizado para evaluar el efecto de la estación (primavera, verano) y la condición (campo, laboratorio) sobre las variables metabólicas analizadas en el músculo aductor y el manto de los reproductores. Las diferencias entre las medias se establecieron con análisis post-hoc (Tukey). En todas las pruebas estadísticas realizadas se consideró como un efecto estadístico significativo un valor de  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis de varianza y student se realizaron en el programa *Statistica* 7.0 (StatSoft, Tulsa, Okland, Estados Unidos). Todos los gráficos se editaron con *Graphpad* 8.3.1 para Windows (GraphPad, La Jolla, California) y Biorender.com.

## Resultados

### *Tamaño e índices morfométricos de los juveniles*

Los juveniles de *N. subnodosus* mostraron un aumento en el peso húmedo de los tejidos (g), así como de tamaño de las valvas después de una aclimatación corta (8 días) en el laboratorio, sin mostrar diferencias en el IC entre condiciones. (Tabla I).

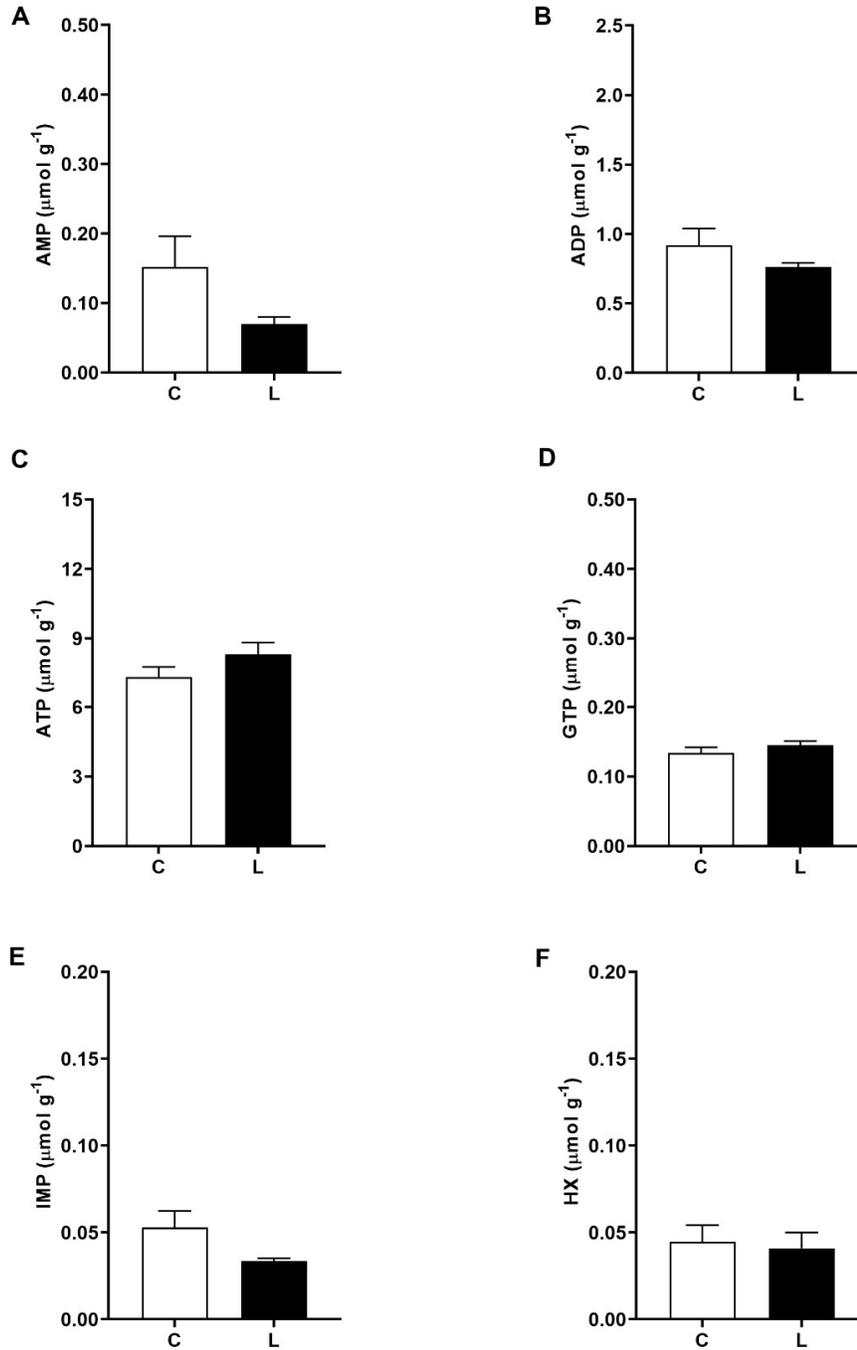
**Tabla I.** Variables biométricas de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta (8 días) en el laboratorio (L).

Variable	C	L	ANOVA $p \leq 0.05$
Peso húmedo de tejidos (g)	3.2±0.1	5.1±0.4	0.01
Longitud de valvas (mm)	34.9±0.6	42.4±1.0	0.01
Altura de valvas (mm)	31.9±1.2	42.2±0.7	0.01
índice de condición (IC, %)	46.1±1.2	47.6±1.2	NS

Los datos expresan el valor de la media  $\pm$  SE media. Los resultados de t-student entre grupos: campo (C) y laboratorio (L). se muestran en las columnas (NS: no significativo).

### *Composición de nucleótidos de los juveniles*

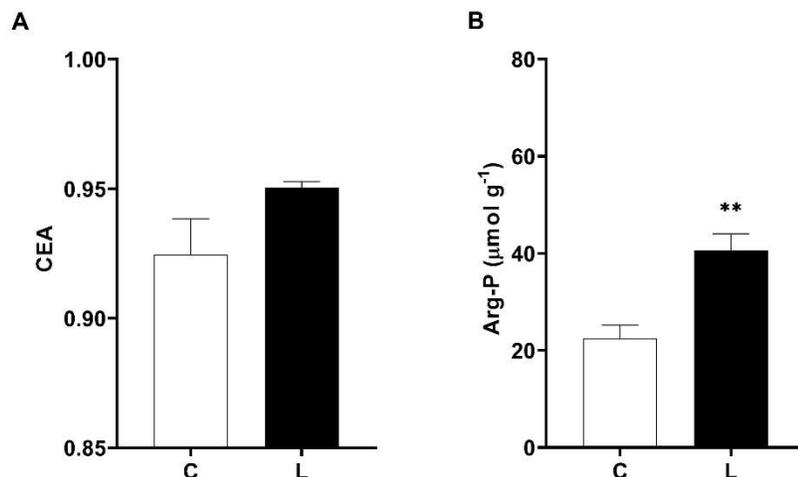
La composición de nucleótidos en el músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* no fue afectada por las condiciones de aclimatación en el laboratorio (grupo L) con relación a los niveles observados en los organismos colectados en el campo (grupo C) (Fig. 11 A-E). El contenido de nucleótidos totales (NAT) en el campo (8.4±0.4) fue similar al de los organismos aclimatados en el laboratorio (9.2±0.5).



**FIGURA 11.** Composición de nucleótidos del músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta (8 días) en el laboratorio (L). **A.** Adenosin monofosfato, AMP. **B.** Adenosin difosfato, ADP. **C.** Adenosin Trifosfato, ATP. **D.** Ionosina monofosfato, IMP. **E.** Hipoxantina, HX. T-student,  $p \leq 0.05$ . N=10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Carga energética y contenido de fosfo-arginina de los juveniles***

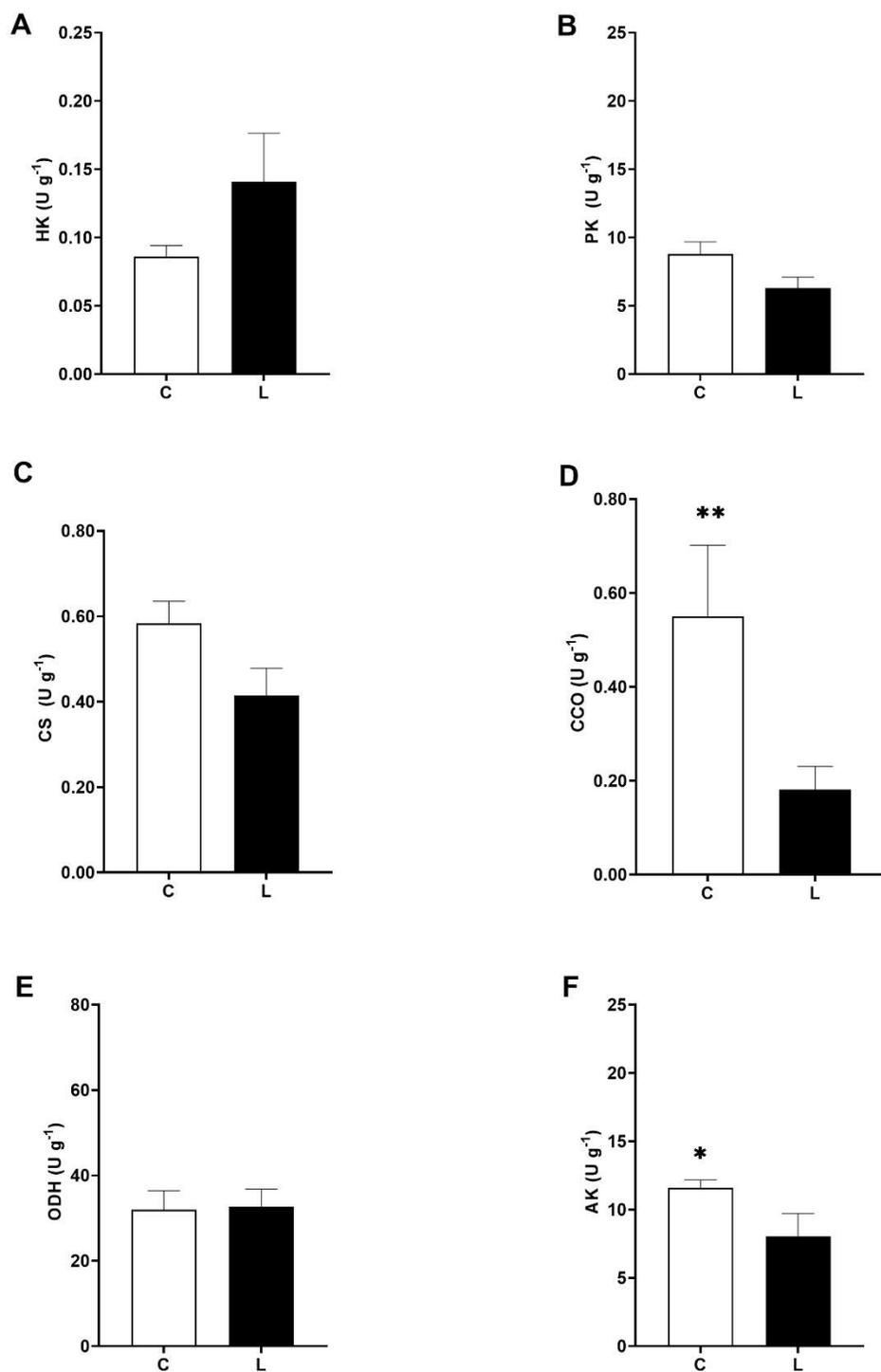
La carga energética adenilica (CEA) del músculo aductor de los juveniles *N. subnodosus* no presentó diferencias significativas entre grupos (C, L) ( $p: 0.22$ ), con valores mayores a 0.90 (Fig. 12A), mientras que el nivel de fosfo-arginina (Arg-P) se incrementó significativamente de 22.4 a 40.6  $\mu\text{mol g}^{-1}$  después de una aclimatación corta en el laboratorio ( $p: \leq 0.01$ ) (Fig. 12B).



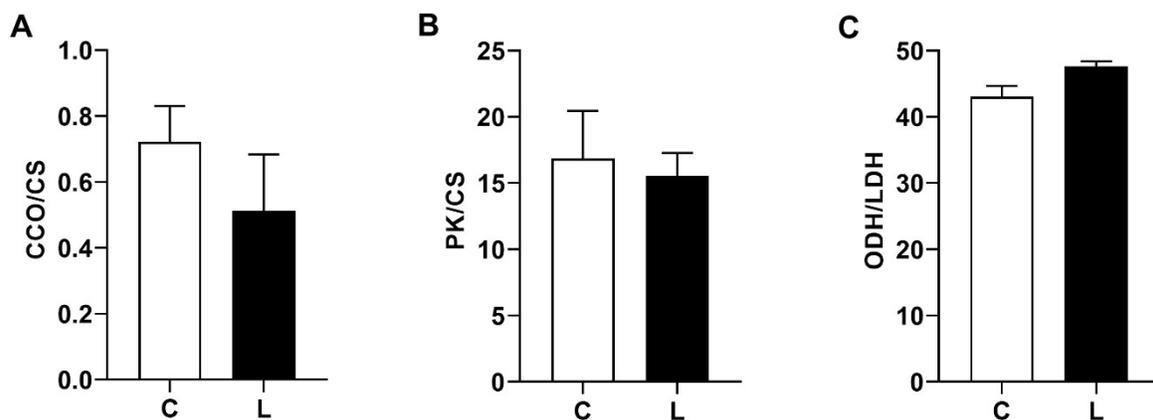
**FIGURA 12.** Carga energética adenilica (CEA) y contenido de fosfo-arginina (ArgP) en el músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*) :  $p \leq 0.001$ . N=10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Enzimas metabólicas del músculo aductor de los juveniles***

La actividad de las enzimas glucolíticas (HK, PK) en el músculo aductor fue similar en los organismos colectados en el campo (C) y aclimatados en el laboratorio (L) (Fig. 13A, B). La actividad de CS fue más alta en el grupo C, pero las diferencias no fueron significativas ( $p: 0.22$ ), Fig. 13C), mientras la actividad de la CCO disminuyó significativamente un 60% (de 0.55 a 0.18  $\text{U g}^{-1}$ ) en los organismos del grupo L (Fig. 13D). La actividad de la ODH se mantuvo estable, mientras que la actividad de la AK disminuyó significativamente ( $p: 0.02$ ) en el grupo L ( $8.1 \pm 1.7 \text{ U g}^{-1}$ ) con relación a los valores en el grupo C ( $11.6 \pm 0.6 \text{ U g}^{-1}$ ) (Fig. 13F). La actividad de la LDH (datos no mostrados en Fig. 13) no presentó cambios entre el grupo C ( $0.8 \pm 0.2 \text{ U g}^{-1}$ ) y el grupo L ( $0.9 \pm 0.2 \text{ U g}^{-1}$ ), con valores hasta 40 veces más bajos que los niveles de actividad de la ODH. Las relaciones entre las actividades enzimáticas CCO/CS, PK/CS y ODH/LDH se mantuvieron constantes (Fig. 14 A-C).



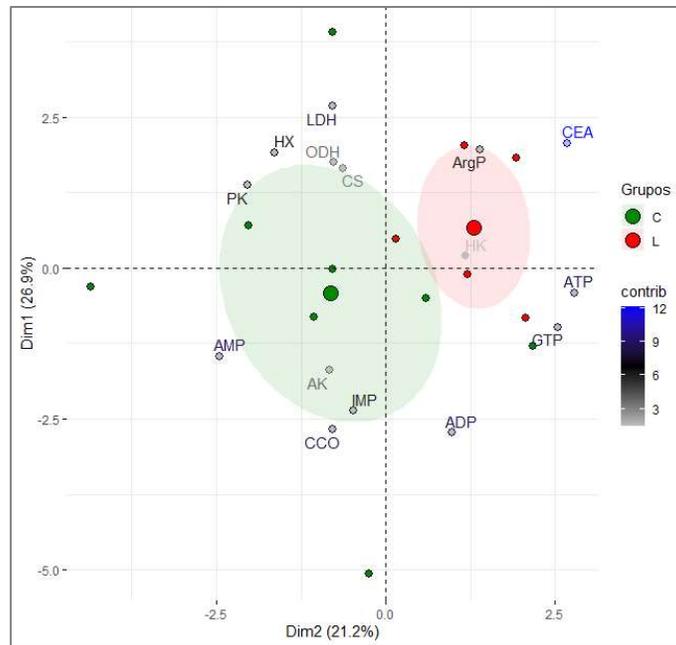
**FIGURA 13.** Actividad de enzimas metabólicas en el músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). **A.** Hexoquinasa, HK. **B.** Piruvato-quinasa, PK. **C.** Citrato sintasa, CS. **D.** Citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Arginina quinasa, AK. T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*) :  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media.



**FIGURA 14.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa / lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*) :  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (A). Media  $\pm$  error estándar de la media.

#### ***Análisis de componentes principales en el estado energético del músculo aductor de los juveniles***

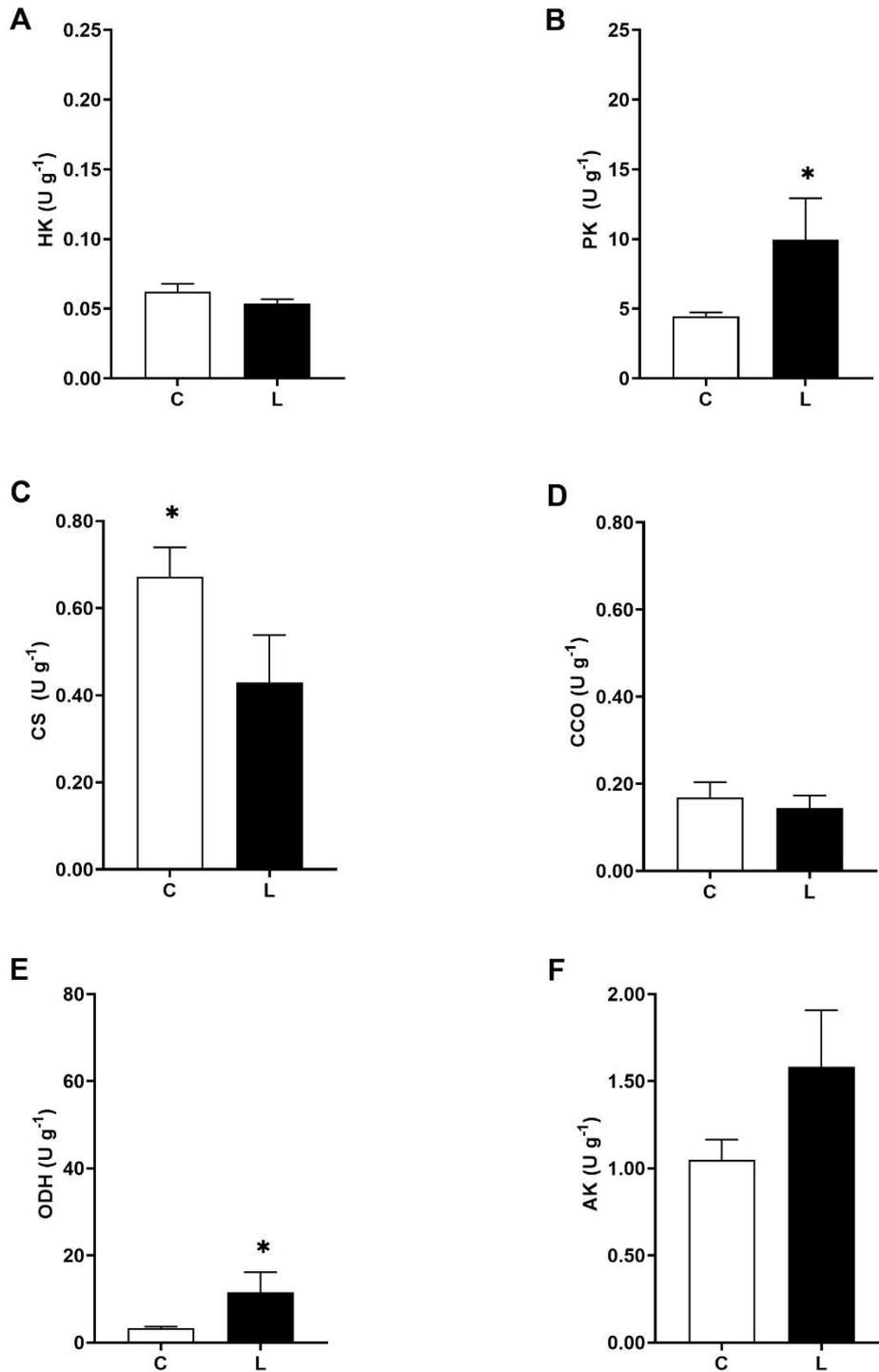
En el músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* se observó que la CEA presentó una asociación positiva con el nivel de ArgP. Sin embargo, tanto la glicólisis (PK) como la actividad de enzimas anaerobias LDH y ODH presentaron también niveles altos de contribución principalmente en los organismos colectados en el campo (C). Asimismo, se observó que entre más alto sea el contenido de energía (CEA, ArgP), la actividad aerobia (CCO), el metabolismo de fosfágenos (AK) y el nivel de AMP presentan niveles más bajos. Finalmente, se observa que nivel de energía (ArgP) aumenta en los organismos después de una aclimatación corta en el laboratorio (Fig. 15).



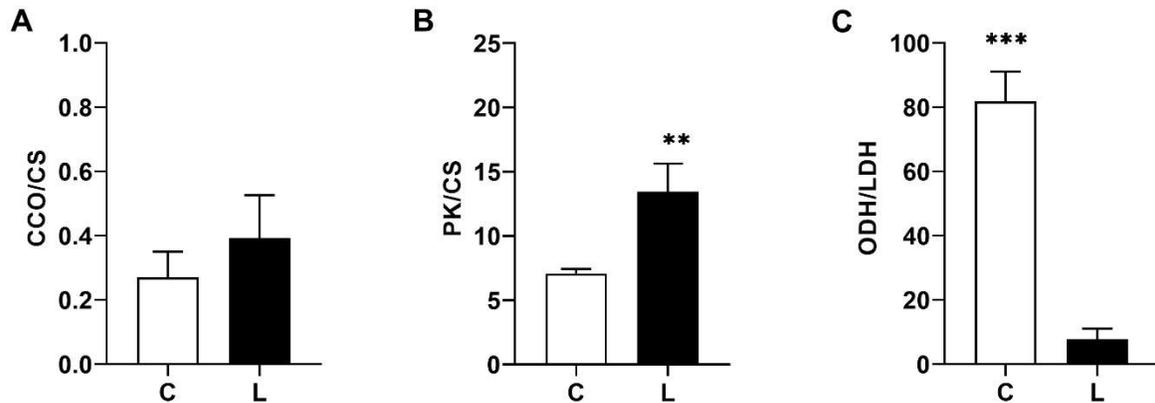
**FIGURA 15.** Análisis de componentes principales de las variables metabólicas del músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de aclimatación en el laboratorio (L). El tamaño de los puntos representa la contribución (contrib) de los individuos al comportamiento de los datos. Las elipses representan los límites de confianza (95%) para cada grupo de organismos.

### ***Enzimas metabólicas en el manto de los juveniles***

La actividad de la HK en el manto de los juveniles de *N. subnodosus* mantuvo niveles similares en ambas condiciones (C, L), mientras que la PK aumentó significativamente después de la aclimatación corta en el laboratorio (Figs. 16A, B). La actividad de la CCO fue similar en ambos grupos, mientras que la actividad de la CS disminuyó significativamente en el grupo L (38%) (Figs. 16 C, D). Sin embargo, la relación de la actividad CCO/CS no se modificó entre condiciones (Fig. 17A). En contraste, la actividad de la ODH fue mayor en el grupo L en relación con sus niveles en el grupo C (Fig. 16E). La actividad de la AK no mostró diferencias entre ambos grupos (Fig. 16F). La LDH (datos no mostrados en Fig. 16) aumentó significativamente en el grupo L ( $1.1 \pm 0.4 \text{ U g}^{-1}$ ) en relación con los niveles del grupo C ( $0.03 \pm 0.001 \text{ U g}^{-1}$ ), con niveles de actividad hasta 80 veces menores que la actividad de ODH. Finalmente, la relación PK/CS fue dos veces mayor en el grupo L que en el grupo C (Fig. 17B), mientras que la relación ODH/LDH mostró una disminución significativa en los organismos aclimatados al laboratorio con relación a los valores observados en el grupo C (Fig. 17C).



**FIGURA 16.** Actividad de enzimas metabólicas en el manto de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C), después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). **A.** Hexoquinasa, HK. **B.** Piruvato-quinasa, PK. **C.** Citrato sintasa, CS. **D.** Citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Arginina quinasa, AK. T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*) :  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media.



**FIGURA 17.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de juveniles de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa / lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. T-student. Un símbolo (\*):  $p \leq 0.05$ , dos símbolos (\*\*):  $p \leq 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*):  $p \leq 0.001$ . N= 10 (C), 5 (A). Media  $\pm$  error estándar de la media.

#### ***Tamaño e índices morfométricos de los reproductores***

El IC de los reproductores de *N. subnodosus* no mostró cambios entre estaciones (primavera, verano) ni condiciones (C, L) mientras que el IMA fue mayor en primavera que en el verano, sin modificarse por la aclimatación al laboratorio. El IGS mostró valores más altos en el verano que en la primavera. De manera similar, el IMG mostró que el tamaño de las gónadas aumentó en verano, con una tendencia no significativa a disminuir como resultado de la aclimatación (Tabla II).

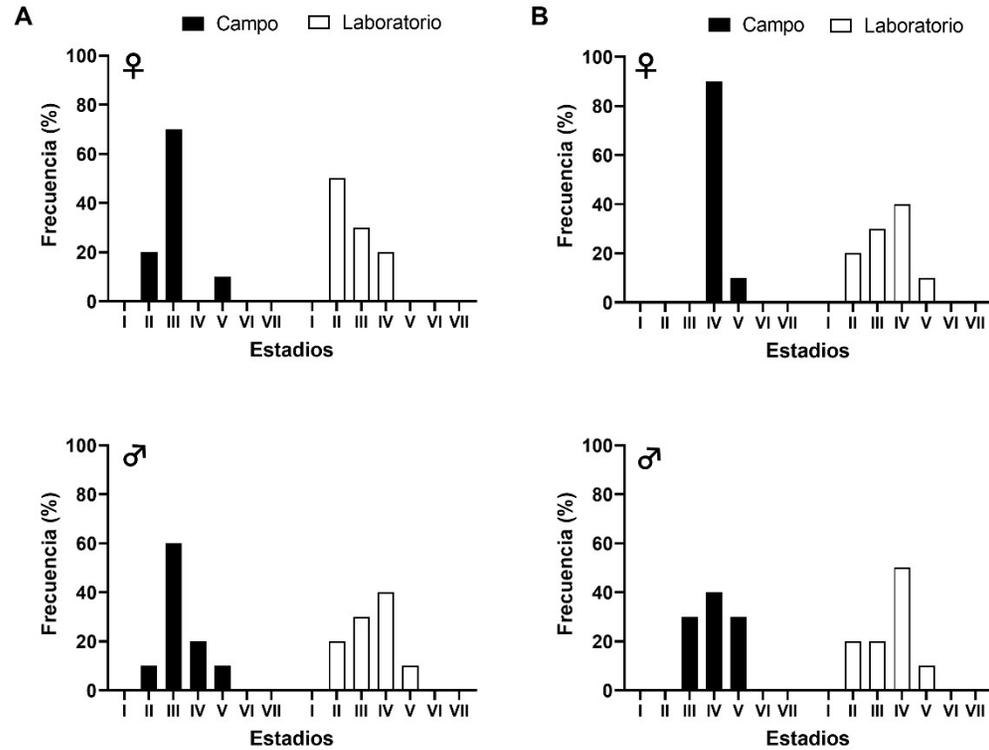
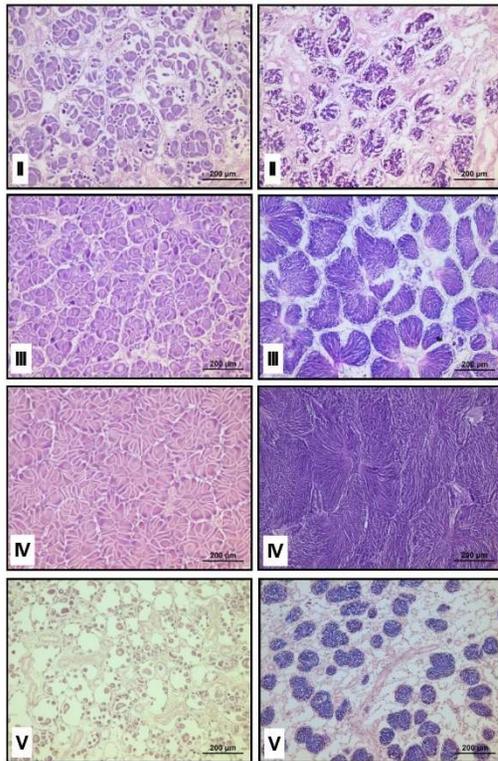
**Tabla II.** Variables biométricas de los reproductores de la mano de león *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante estadios de desarrollo temprano (primavera) y avanzado (verano) de las gónadas.

Variables	Primavera (mayo)		Verano (julio)		E	C	E × C
	C	L	C	L	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$
Peso húmedo de tejidos (g)	46.6 ±3.0	49.9 ±3.8	59.8 ±6.7	41.4 ±4.7	0.64	0.04	0.11
Longitud de valvas (mm)	78.5 ±2.6 <sup>a</sup>	78.8 ±3.4 <sup>ab</sup>	88.9 ±1.2 <sup>b</sup>	74.4 ±2.5 <sup>a</sup>	0.25	0.01	0.01
Altura de valvas (mm)	81.4 ±2.3	78.1 ±3.0	87.5 ±2.3	74.4 ±2.8	0.65	0.01	0.08
índice de condición (IC, %)	65.5 ±4.7	75.8 ±10.0	59.3 ±7.1	65.7 ±3.4	0.25	0.24	0.78
Índice de Músculo Aductor (IMA, %)	57.1 ±3.2	64.9 ±3.5	54.4 ±1.7	55.7 ±2.5	0.05	0.12	0.26
Índice Gonadosomático (IGS, %)	7.2 ±1.2	8.9 ±1.3	9.9 ±1.5	11.7 ±1.6	0.01	0.02	0.12
Índice de Masa Gonadal (IMG)	3.1 ±0.6	2.2 ±0.6	4.9 ±0.7	3.9 ±0.5	0.01	0.15	0.08

Los datos expresan el valor de la media ± SE. Los resultados de ANOVA 2 vías entre estaciones (E) y condiciones (C) se muestran en las columnas.

### ***Desarrollo de las gónadas de los reproductores***

Los reproductores de *N. subnodosus* presentaron una mayor proporción de desarrollo avanzado en la porción femenina (70%) de las gónadas en mayo y mayor proporción de maduración (90%) en julio. Después de la aclimatación, la proporción de desarrollo avanzado en la sección femenina (30-40%) disminuyó en ambas estaciones, mientras el porcentaje de maduración aumentó (20%). El desarrollo avanzado de la porción masculina de la gónada fue mayor en mayo (60%) que en julio (30%). Después de una aclimatación, la proporción de estadio avanzado disminuyó a 30% en mayo y a 20% en julio, mientras que la proporción de gametos maduros aumentó de 20 a 40% en mayo, y de 40 a 50% en julio después de la aclimatación corta en el laboratorio (Figs. 18 A, B).



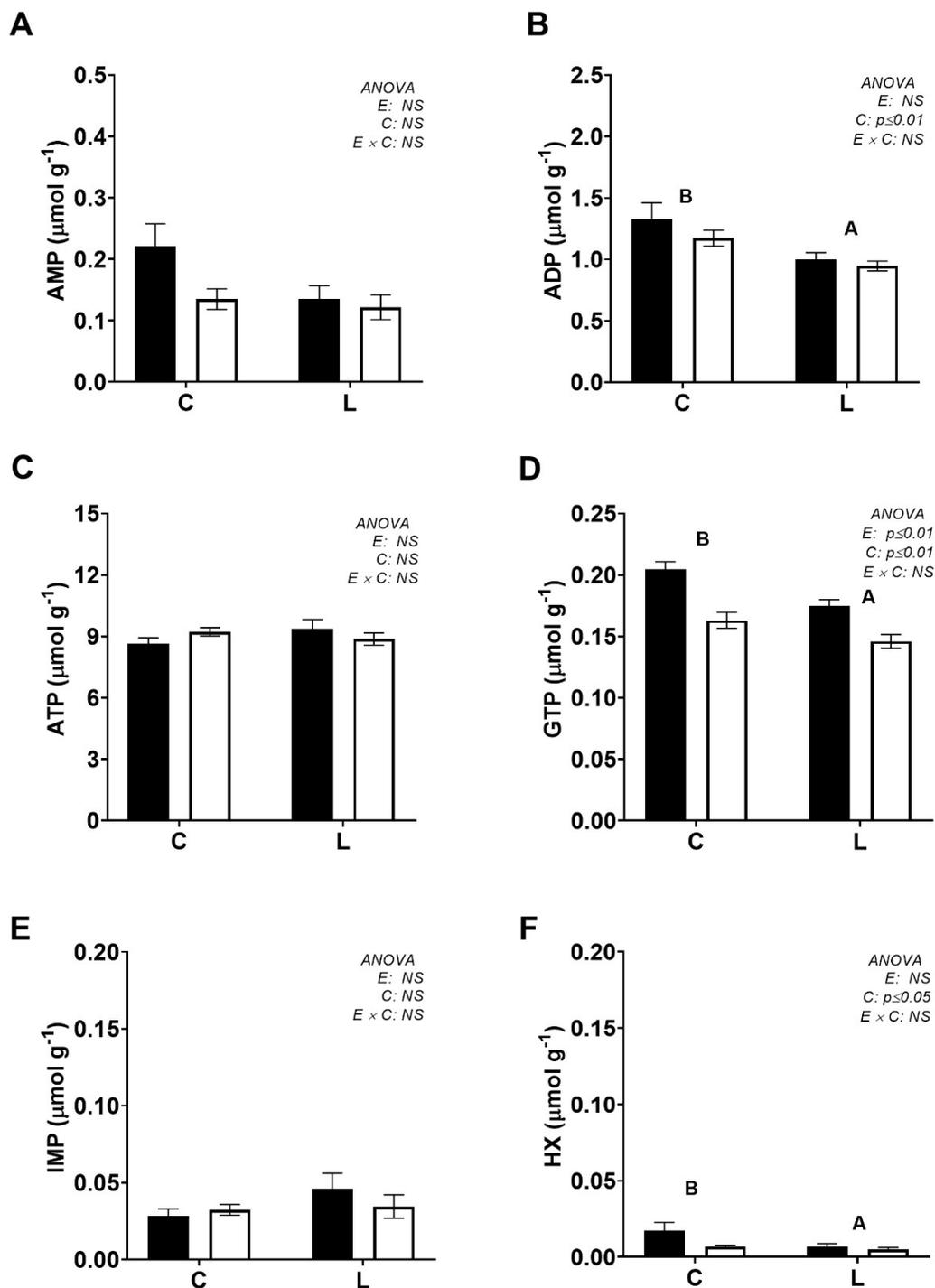
**FIGURA 18.** Desarrollo de las gónadas de la mano de león *N. subnodosus*. A la izquierda, las secciones histológicas de la porción femenina (izquierda) y masculina (derecha) mostrando solo los estadios de desarrollo observados en los organismos colectados durante la primavera y el verano: desarrollo temprano (II), desarrollo tardío o avanzado (III), maduro (IV) y desove (V). A la derecha, la frecuencia (%) de estadios de desarrollo de los gametos en la porción femenina (♀) y masculina (♂) de la gónada de los reproductores colectados durante la primavera (A) y el verano (B) en el campo (negro) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (8 días) (blanco). Los valores de frecuencia están expresados como porcentaje de los animales de cada grupo. N=10 (C), 10 (L) para cada estación (primavera, verano), respectivamente.

### ***Composición de nucleótidos de los reproductores***

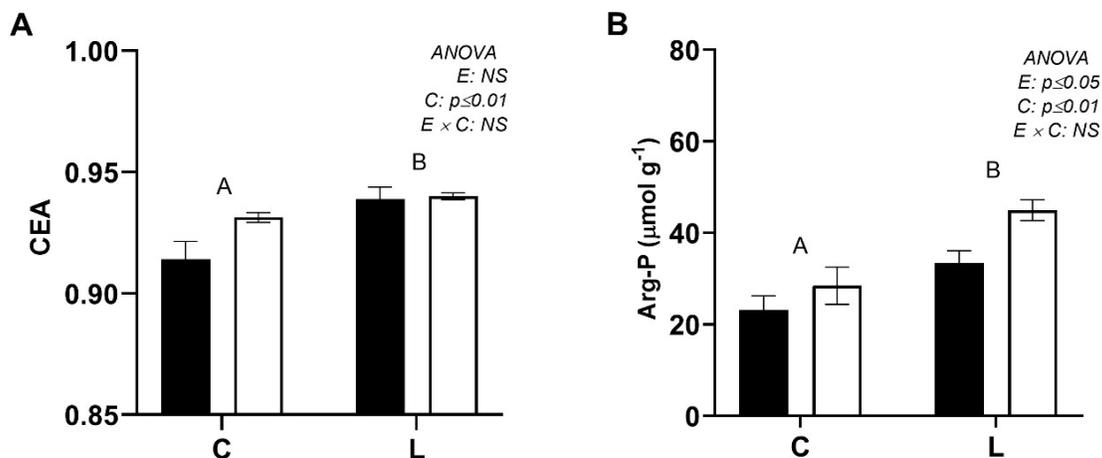
El contenido de AMP y ATP en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* mantuvieron valores constantes entre condiciones (C, L) y estaciones (primavera, verano), mientras que el nivel de ADP disminuyó después de la aclimatación en el laboratorio en ambas estaciones (Figs. 19 A-C). El GTP mostró valores más altos en primavera, disminuyendo después de la aclimatación en el laboratorio (Fig. 19D). El nivel de IMP no cambió entre condiciones y estaciones, mientras que el nivel de HX disminuyó después de la aclimatación en el laboratorio únicamente en primavera (Figs. 19 E, F). Finalmente, el contenido de nucleótidos adenílicos totales (NAT) fue similar para los juveniles colectados en el campo durante primavera ( $10.2 \pm 0.4$ ) y verano ( $10.5 \pm 0.5$ ), sin mostrar cambios significativos en relación con los valores de los organismos aclimatados en laboratorio en primavera ( $10.5 \pm 0.5$ ) y verano ( $9.9 \pm 0.3$ ), respectivamente.

### ***Carga energética adenilica y contenido de ArgP de los reproductores***

El nivel de energía (CEA) en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* fue similar entre estaciones con valores superiores a 0.91, aumentado significativamente después de una aclimatación corta en el laboratorio en ambas estaciones (Fig. 20A). Aunque la interacción no fue significativa, dicho efecto fue más pronunciado en primavera (4%) que en el verano (1%). El contenido ArgP fue mayor en el músculo aductor de los organismos colectados en verano ( $28.5 \pm 4.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) que en la primavera ( $23.1 \pm 3.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ ). Adicionalmente, se observó un aumento significativo en el contenido de ArgP después de la aclimatación de los organismos en el laboratorio en ambas estaciones (Fig. 20B).



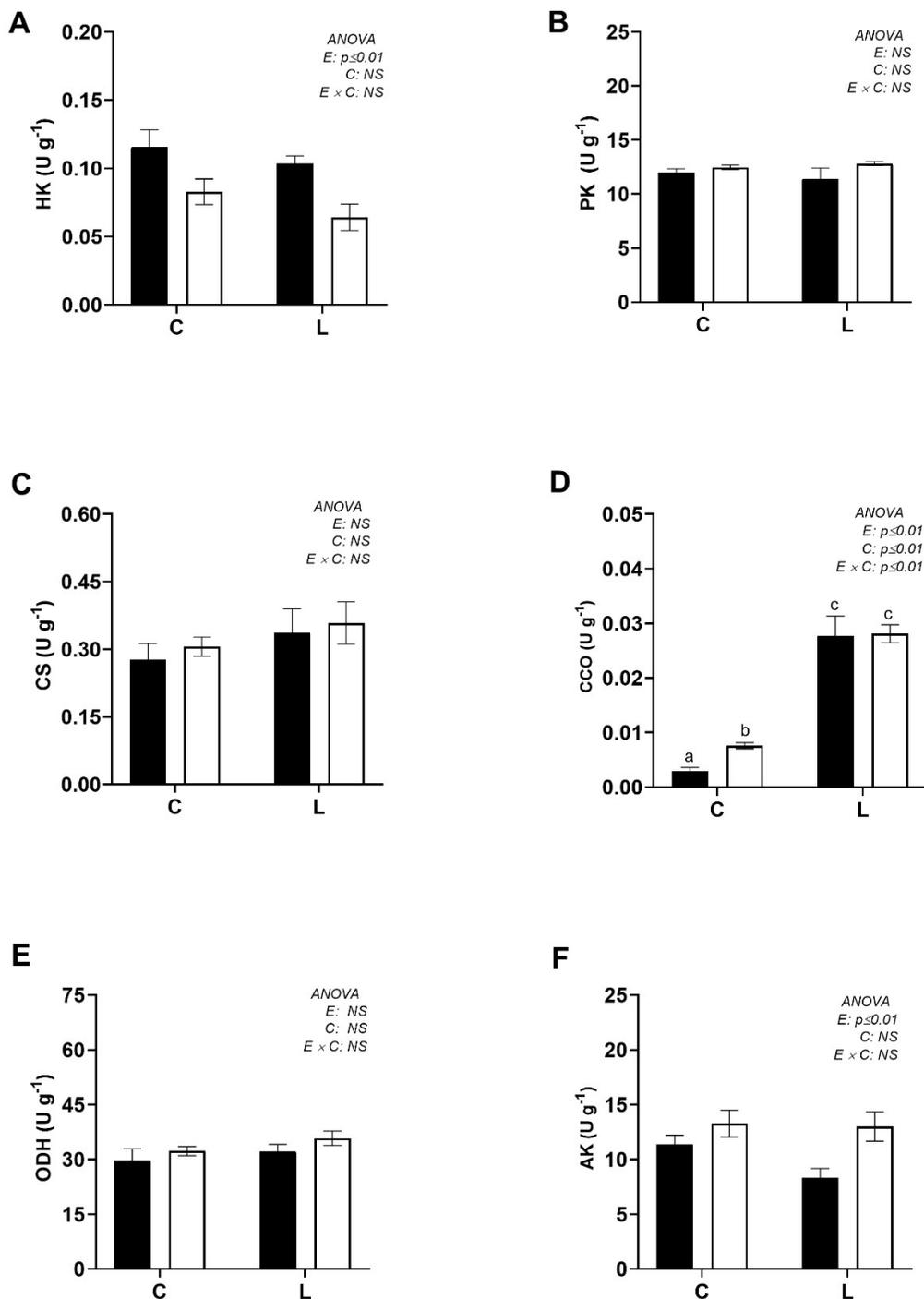
**FIGURA 19.** Composición de nucleótidos del músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). **A.** Adenosín monofosfato, AMP. **B.** Adenosín difosfato, ADP. **C.** Adenosín Trifosfato, ATP. **D.** Guanosín-trifosfato, GTP. **E.** Ionosina monofosfato, IMP. **F.** Hipoxantina, HX. ANOVA 2 vías. Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones. N. =10 (C), 5 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media.



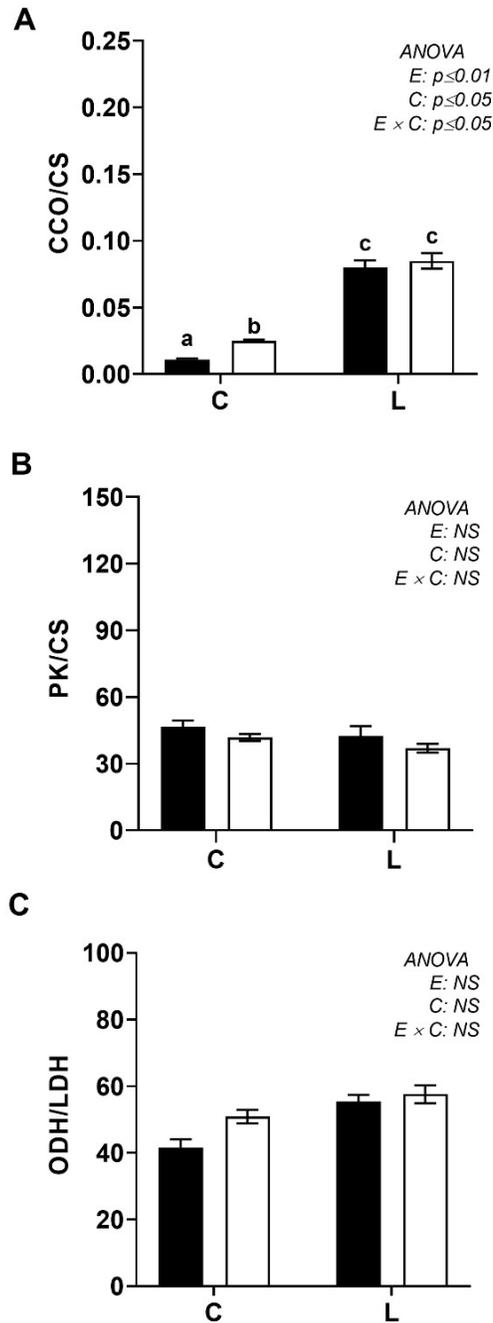
**FIGURA 20.** Carga energética adenínica (CEA) y contenido de fosfo-arginina (ArgP) en el músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). ANOVA 2 vías. Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones. N= 10 (C), 10 (L). Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Enzimas metabólicas en el músculo aductor de los reproductores***

La actividad de la HK fue mayor en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* durante la primavera (Fig. 21A) mientras que la actividad de la CCO y la AK fueron mayores durante el verano (Figs. 21D, E). Después de una aclimatación corta en el laboratorio, la actividad de la CCO, así como la relación CCO/CS aumentaron hasta tres veces en relación con los valores observados en el grupo colectado en el campo. La actividad de la PK, así como la actividad de la ODH y de la CS no mostraron diferencias entre condiciones y estaciones, respectivamente (Figs. 21B, F). El nivel de LDH fue 49 veces menor que los niveles de ODH (datos no mostrados en Fig. 21), sin mostrar cambios entre primavera ( $0.66 \pm 0.04 \text{ U g}^{-1}$ ) y verano ( $0.66 \pm 0.05 \text{ U g}^{-1}$ ) y/o entre organismos colectados en el campo ( $0.70 \pm 0.04 \text{ U g}^{-1}$ ) y aclimatados en el laboratorio ( $0.62 \pm 0.05 \text{ U g}^{-1}$ ), respectivamente. Finalmente, la relación entre la actividad de PK/CS y ODH/LDH no se alteró entre condiciones y estaciones (Figs. 22 A-C).



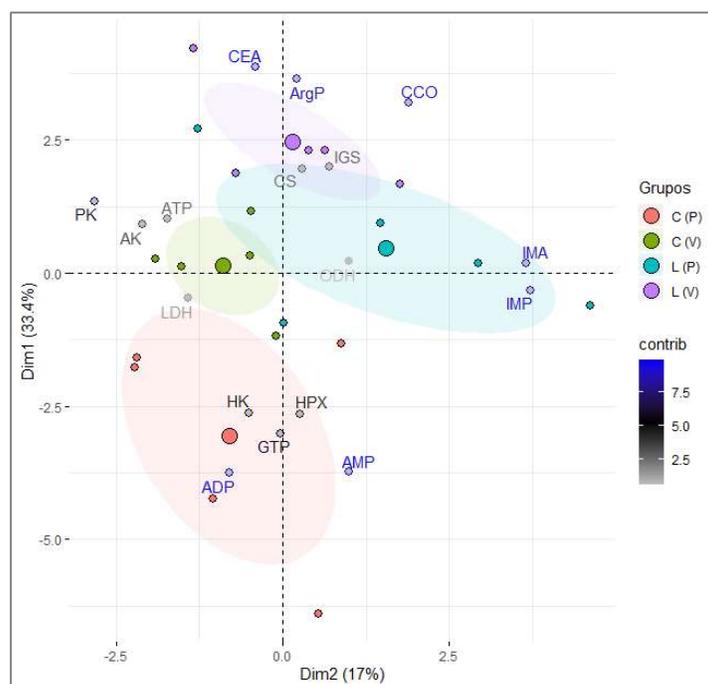
**FIGURA 21.** Actividad de enzimas metabólicas en el músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodulosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). **A.** Hexoquinasa, HK. **B.** Piruvato-quinasa, PK. **C.** Citrato sintasa, CS. **D.** Citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Arginina quinasa, AK. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. N= 6 (C), 6 (L). Las letras minúsculas representan interacciones significativas entre grupos. Media  $\pm$  error estándar de la media.



**FIGURA 22.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. N= 10 (C), 5 (L). Las letras minúsculas representan interacciones significativas entre grupos. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Análisis de componentes principales en el estado energético del músculo aductor de los reproductores***

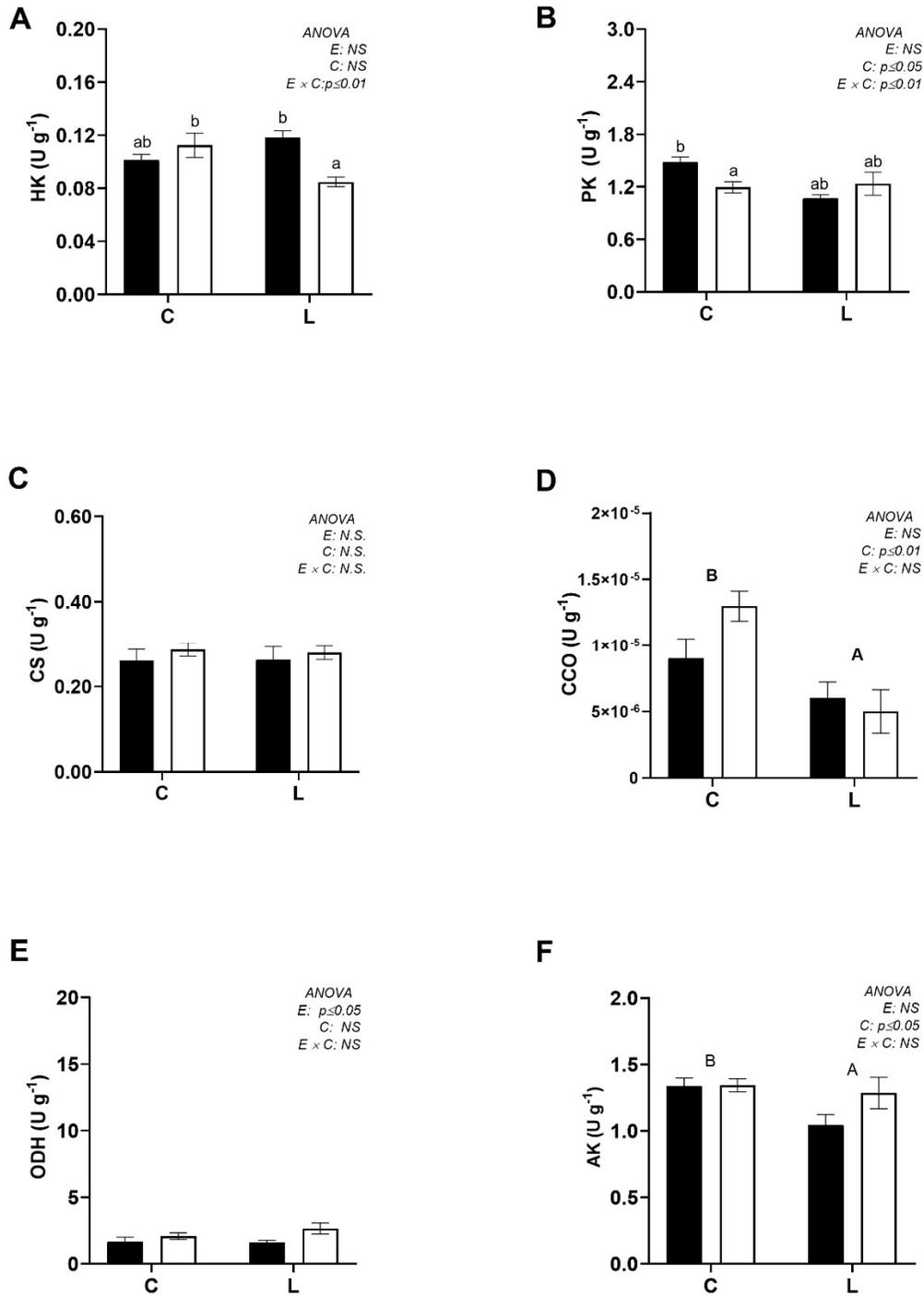
En el músculo aductor de los reproductores de *N. subnodosus* se observó que las variables metabólicas mantuvieron un patrón estacional en el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L), con cuatro grupos bien definidos: organismos colectados en campo durante primavera (C, P) y verano (C, V), así como organismos aclimatados en el laboratorio en primavera (L, P) y en verano (L, V), respectivamente. En el campo, se observó una mayor influencia de la actividad de las enzimas glicolíticas (PK), el metabolismo de fosfágenos (AK) y el contenido de guaninas (GTP) sobre el estado energético (AMP, ADP) de los organismos durante estadios iniciales de desarrollo gonádico. En contraste, el nivel de ATP estuvo más relacionado a estadios avanzados de maduración gonádica (C, V). Después de una semana de aclimatación en el laboratorio, el nivel de IMP y el IMA mostraron una asociación, con efectos principales en primavera, mientras que los valores de energía (CEA, ArgP) se relacionaron más con la actividad de CCO y el IGS en el verano (Fig. 23).



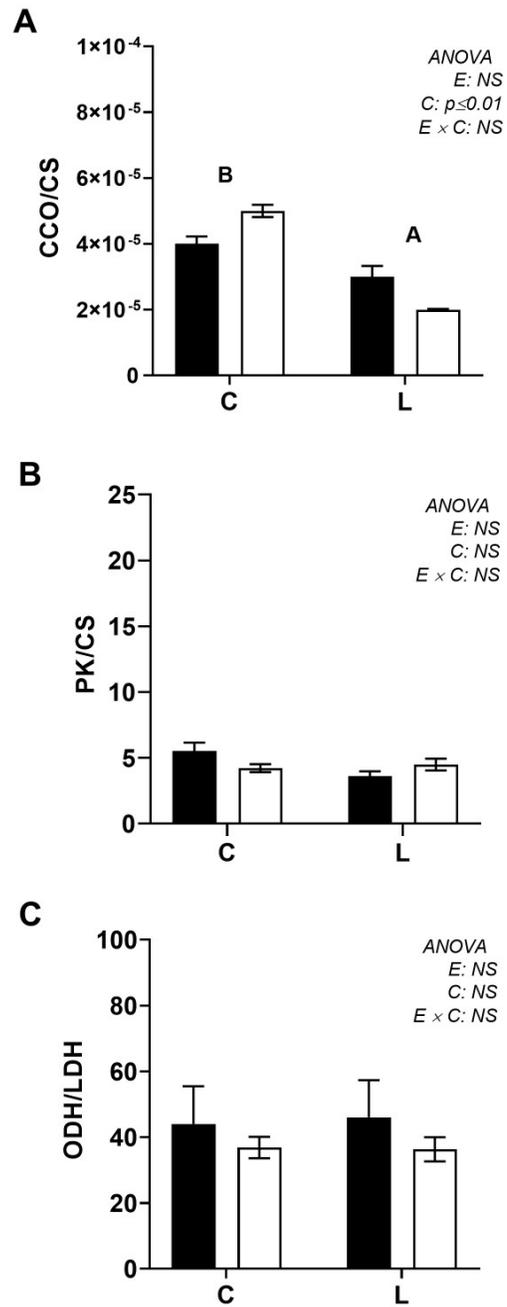
**FIGURA 23.** Análisis de componentes principales de las variables metabólicas del músculo aductor de los reproductores de *N. subnodosus* colectados en el campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (P) y el verano (V), respectivamente. El tamaño de los puntos representa la contribución (contrib) de los individuos al comportamiento de los datos. Las elipses representan los límites de confianza (95%) para cada grupo experimental.

### ***Enzimas metabólicas en el manto de los reproductores***

La actividad de la HK en el manto de los reproductores de la mano de león *N. subnodosus* mostró un patrón estacional, con valores significativamente menores en los organismos aclimatados (L) durante el verano en relación con el campo (C) ( $p: \leq 0.01$ ) (Fig. 24A). En condiciones de campo (C), la actividad de la PK fue mayor en primavera que en verano, mostrando valores similares entre estaciones después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) (Fig. 24B). No se observaron cambios en la actividad de la CS ni en la relación PK/CS entre estaciones y condiciones (Figs. 24C, 25B), mientras que la actividad de la CCO disminuyó significativamente en los organismos aclimatados al laboratorio principalmente durante el verano ( $p= \leq 0.01$ ) (Fig. 24D). En consecuencia, la relación CCO/CS también disminuyó (Fig. 25A). La actividad de la ODH fue significativamente mayor en el verano ( $p: \leq 0.03$ ) (Fig. 24E), mientras que la actividad de la AK disminuyó en el grupo L, sin mostrar cambios entre estaciones (Fig. 24F). La actividad de la LDH fue 37 veces menor a la actividad de ODH (datos no mostrados en Fig. 24), con valores significativamente menores en los organismos colectados en primavera ( $0.04 \pm 0.007 \text{ U g}^{-1}$ ) que en el verano ( $0.06 \pm 0.005 \text{ U g}^{-1}$ ) ( $p: \leq 0.02$ ). Sin embargo, la relación ODH/LDH no mostró cambios entre estaciones y condiciones (Fig. 25C).



**FIGURA 24.** Actividad de enzimas metabólicas en el manto de reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). **A.** Hexoquinasa, HK. **B.** Piruvato-quinasa, PK. **C.** Citrato sintasa, CS. **D.** Citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Arginina quinasa, AK. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . **E:** Estación C: Condición. N= 6 (C), 6 (L). Las letras minúsculas representan interacciones significativas entre grupos. Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones. Media  $\pm$  error estándar de la media.



**FIGURA 25.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* colectados en campo (C) y después de una aclimatación corta en el laboratorio (L) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación C: Condición. N= 6 (C), 6 (L). Las letras mayúsculas representan diferencia significativa entre condiciones Media  $\pm$  error estándar de la media.

### **Discusión**

En este capítulo se evaluó el estado energético de los juveniles y los reproductores de la mano de león *N. subnodosus* en el campo (grupo C), y después de una aclimatación corta (8 días) en el laboratorio (grupo L). El contenido de energía (CEA y ArgP) en el músculo aductor de los juveniles y reproductores de *N. subnodosus* fue similar independientemente del origen y el año de colecta. Los cambios en nivel de algunos nucleótidos, así como en la actividad de las enzimas mitocondriales y glicolíticas en el músculo aductor y el manto sugieren una respuesta compensatoria de los organismos a las condiciones ambientales del hábitat durante períodos de alta demanda de energía como la reproducción. Los cambios estacionales en el metabolismo de los carbohidratos, los fosfágenos y guanina (GTP) del músculo aductor de los reproductores sugieren su relación con el gasto energético y la respuesta compensatoria al ambiente durante el desarrollo de las gónadas. Las variaciones en el metabolismo aerobio (CCO) del músculo aductor sugieren una capacidad de respuesta de este tejido a los cambios en el estado fisiológico de los organismos y la variabilidad ambiental del hábitat. Finalmente, la acumulación de energía (ArgP) en el músculo aductor de los juveniles y los reproductores sugiere que las condiciones de laboratorio (L) fueron adecuadas para la aclimatación corta de los organismos independientemente de su estado fisiológico, origen y/o temporada de colecta con posibles aplicaciones para el estudio de la tolerancia de los organismos a cambios ambientales.

Los juveniles de *N. subnodosus* fueron colectados en la laguna Ojo de Liebre, considerada como el límite norte de distribución natural de la especie (Keen 1972), presenta temperaturas templadas (14.7 y 27.3 °C) (Rodríguez-Padilla & Gutiérrez de Velasco, 2013; Villa-Guerrero, 2019). En este estudio se observó que, durante el período de cultivo de los juveniles existió un aumento paulatino de la temperatura de 13.6 a 27.8 °C, una disponibilidad de alimento de 1.2 a 3.1 mg m<sup>3</sup> y un nivel medio de oxígeno disuelto de 8.9±0.8 mg O<sub>2</sub> L de invierno a verano (diciembre 2016 a junio 2017). La estimulación del crecimiento de los juveniles (≤ 12 meses) por el incremento de temperatura y la alta disponibilidad de alimento ha sido documentada en poblaciones de *N. subnodosus* cultivadas en sistemas en suspensión que facilitan el intercambio de oxígeno y alimento (Racotta *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2005; Revilla *et al.*, 2019). Sin embargo, al igual que en *P. maximus*, es posible que, la estimulación al crecimiento dependa de la intensidad y el tiempo de exposición de los organismos a una

temperatura elevada en su hábitat y en el laboratorio (Kleinman *et al.*, 1996 a,b). Pocos estudios han evaluado los efectos de la hipertermia a nivel ecológico, pero se sabe que la exposición a una temperatura crítica o limitante conlleva que los organismos alcancen su máxima capacidad aerobia y que su capacidad de desplazamiento (e. g. respuesta de escape) se agote más rápido (Hochachka & Somero, 2002). En los pectínidos como *N. subnodosus*, la ArgP del músculo aductor es la principal reserva de energía para la locomoción, por lo que es posible que una temperatura elevada ( $\geq 28$  °C) reduzca la posibilidad de escapar de sus depredadores (e. g. depredación por pulpos, estrellas de mar, otros) (Bailey *et al.*, 2003; Guderley & Pörtner, 2010). Aunado a ello, una exposición crónica a temperaturas de verano (28 °C) ha sido relacionada a una disminución de la tasa de absorción del alimento de los juveniles de *N. subnodosus* en condiciones de laboratorio (González-Estrada, 2003), así como a efectos negativos sobre la tasa de crecimiento y supervivencia de los juveniles cultivados en diferentes zonas de la Península de Baja California (Barrios-Ruiz *et al.*, 2003; Villalejo *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005; Osuna-García *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2015).

El estado energético del músculo aductor de los organismos refleja su capacidad para llevar a cabo sus actividades fisiológicas y responder a los cambios ambientales en su hábitat. En los juveniles, la mayor parte de la energía está destinada a la locomoción y al crecimiento. En este estudio se observó que los juveniles de mano de león *N. subnodosus* mostraron niveles de CEA ( $> 0.90$ ) en el músculo aductor superiores al límite mínimo (0.80) para el crecimiento y la reproducción (Chapman *et al.*, 1971; Ivanovici 1980), con niveles similares a especies que también se distribuyen en zonas templadas como *Argopecten irradians concentricus* (Chih & Ellington, 1983), *Chlamys opercularis* (Grieshaber *et al.*, 1978), *Aequipecten opercularis* (Phillip *et al.*, 2008) y *P. magellanicus* (de Zwan *et al.*, 1980). Aunado a ello, el nivel de ArgP en el músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* fue similar al nivel reportado en músculo aductor de *P. maximus* ( $52 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) (Beis & Newsholme, 1975), mostrando un menor contenido de ArgP en el campo (C,  $22.4 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) en relación a los niveles observados después de una aclimatación corta en el laboratorio (L,  $40.6 \mu\text{mol g}^{-1}$ ). Este cambio en el nivel de ArgP en el músculo aductor de los organismos puede estar asociado con un aumento de las contracciones musculares (e. g. respuesta de escape) (Bailey *et al.*, 2003; Guderley & Pörtner, 2010) que tienden a recuperarse

rápidamente (minutos a horas) (Chih & Ellington, 1983; Brokordt *et al.*, 2000; Guderley & Pörtner, 2010) aún a partir de niveles muy bajos ( $1.5$  a  $5 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) (Grieshaber *et al.*, 1978; Pérez *et al.*, 2008).

Una mayor actividad de las enzimas mitocondriales (CCO, CS) en el músculo aductor de los juveniles en el campo (C) en relación con los niveles de los animales del grupo L podría estar relacionado con un aumento de temperatura en el campo antes del muestreo (junio 2017). Esta respuesta subraya la plasticidad fisiológica de la especie para modificar la composición, tamaño y/o volumen de las mitocondrias en respuesta a las variaciones de temperatura de su hábitat ( $\leq 28 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Johnston *et al.*, 1998). Aunado a ello, se observó un aumento en el metabolismo del glicógeno (PK) y los fosfágenos (AK), así como una tendencia al aumento de los niveles de AMP y HX en el músculo aductor de los juveniles (C) con relación a sus niveles de actividad en los organismos aclimatados en el laboratorio (L). Este aumento en los niveles de AMP y HX reflejan una disminución en el contenido de energía ( $\text{ATP} < \text{AMP}$ ) que estimula el metabolismo de carbohidratos, fosfágenos y aminoácidos libres (Beis & Newsholme, 1975; Enomoto *et al.* 2000; Greenway & Storey, 2000; Storey & Storey 2004; Dong & Zhang, 2016). Estos cambios en el metabolismo celular han sido relacionados con los cambios ambientales del hábitat (temperatura, alimento, oxígeno) (Livingstone & Bayne, 1974; Anestis *et al.*, 2008), lo que sugiere que la actividad metabólica del músculo aductor (CCO, AK, PK) de los juveniles de *N. subnodosus* en el campo (C) podría estar relacionado al aumento paulatino de la temperatura y la disponibilidad de alimento en la laguna ( $\geq 10 \text{ mg m}^{-3}$ ) por efecto de las surgencias de primavera (abril-junio) (NOAA, Álvarez & Granados, 1992). Esta respuesta coincide una tendencia al aumento del tamaño corporal de los juveniles a inicios de verano, posiblemente en preparación a la primera maduración de las gónadas ( $\sim 8$  meses) (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004; Kraffe *et al.*, 2008).

Después de una aclimatación corta de los juveniles de *N. subnodosus* en el laboratorio (L) a una temperatura óptima ( $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para el crecimiento (González-Estrada, 2003), los cambios del metabolismo de carbohidratos en el músculo aductor (HK) y el manto (PK) de los organismos sugieren un efecto de la cantidad y la calidad del alimento (*Chaetoceros spp.*, *Isochrysis spp.*) durante la aclimatación en el laboratorio. Otros estudios han reportado efectos benéficos de dietas similares durante la aclimatación (12 días) de *N. subnodosus*

(González-Estrada, 2003) y en el desempeño fisiológico de otros pectínidos como *A. purpuratus* (Martínez *et al.*, 2000; Martínez & Pérez, 2003; MacDonald, Bricelj & Shumway, 2016). El aumento de la actividad glicolítica en los tejidos, principalmente en el manto (PK) coincidió con una disminución de la actividad de AK en el músculo aductor, logrando mantener un nivel de ArgP más alto que el observado en el músculo aductor de los juveniles colectados en el campo (C). Esta respuesta indica que los juveniles de *N. subnodosus* compensaron completamente el cambio de condiciones ambientales del campo al laboratorio. Es interesante que el manto presentó un aumento en su actividad metabólica (CCO/CS, PK/CS, ODH/LDH) en el grupo (L), lo que indica que al igual que el músculo aductor, este tejido presenta una alta sensibilidad a estímulos endógenos (energía), físicos (e. g. manejo) y/o ambientales (e. g. temperatura, alimento, otros). En particular, la actividad aerobia (CCO y CS) de músculo aductor disminuyó en respuesta a una aclimatación corta en el laboratorio (L) mientras que, en el manto solo disminuyó la actividad de CS. Este cambio sugiere una tasa metabólica específica de los tejidos, así como una respuesta compensatoria específica a las variaciones ambientales (C vs. L) que involucran cambios en la estructura y composición de las mitocondrias, una respuesta que puede llevar días o semanas (Pernet *et al.*, 2006, 2007; Bouchard & Guderley, 2003). Estos cambios en la actividad metabólica de los tejidos (e. g. respiración celular) confieren diferencias en el gasto de energía para llevar a cabo actividades fisiológicas (e. g. locomoción) que pueden contribuir a establecer diferencias entre el desempeño fisiológico de las poblaciones que enfrentan condiciones ambientales contrastantes (Clarke & Fraser, 2004). En *N. subnodosus* se han reportado diferencias en el desempeño fisiológico de los organismos cultivados en las costas este y oeste de la Península de Baja California Sur (Koch *et al.*, 2015), que podrían estar relacionadas con diferencias metabólicas a nivel celular y molecular. Finalmente, aunque la alta variabilidad ambiental en los ecosistemas marinos no permite discernir los efectos de un factor abiótico en particular (e. g. temperatura, alimento, nivel de oxígeno) sobre el energético (CEA) de los organismos silvestres o en condiciones de cultivo (Barthel, 1984), el contenido de energía (CEA, ArgP) del músculo aductor, así como el patrón de actividad metabólica en los tejidos de los juveniles de *N. subnodosus* (grupo L) indican un estado metabólico adecuado para el mantenimiento de los organismos en el laboraotio antes de evaluar su capacidad de respuesta a cambios en el ambiente.

Para los reproductores, se confirmó que existe un aumento en el tamaño de las gónadas (IGS, IMG) así como una mayor frecuencia de organismos maduros durante el verano, confirmando que *N. subnodosus* mantiene una alta actividad reproductiva durante primavera y verano en Bahía Magdalena (Arellano-Martínez *et al.*, 2011). El nivel de energía del músculo aductor en los reproductores (grupo C) presentó niveles óptimos para la reproducción ( $\geq 0.90$ ) (Ivanovici, 1980), sin cambios entre los estadios iniciales (primavera) o avanzados (verano) de maduración de las gónadas, lo que sugiere que los organismos compensaron el gasto energético asociado a la reproducción y a la variabilidad ambiental de su hábitat. Durante el período de colecta de los organismos (primavera-verano, 2016) se observaron valores relativamente altos de clorofila *a* ( $5.2 \text{ mg m}^{-3}$ ) en relación con los valores de otoño-invierno ( $2.3 \text{ mg m}^{-3}$ ) (NOAA) así como una temperatura máxima de  $28.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (junio-julio, 2016) que no superó la temperatura máxima ( $31.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de verano (jun-ago) (Sicard-González *et al.*, 2012), considerada como el límite máximo de tolerancia térmica de la especie (González-Estrada, 2003). Una exposición a una temperatura elevada puede tener un efecto benéfico en la calidad de los desoves de primavera cuando la cantidad de alimento es alto, y deletérea en la calidad de los desoves de verano, cuando la cantidad de alimento disminuye (Grubert & Ritar, 2005; Barber & Blake, 2006; Fearman & Moltschaniwskyj, 2010), aunque el efecto sinérgico de la exposición a una temperatura elevada y la variación estacional en la disponibilidad de alimento pueden tener efectos sobre la estacionalidad y la calidad del desove, así como en la disponibilidad de energía para la defensa fisiológica (Petes *et al.*, 2008; Guderley & Pörtner, 2010; Petes *et al.*, 2008; Barrento *et al.*, 2013). Sin embargo, el estado reproductivo y los niveles de energía en el músculo aductor de los organismos parecen confirmar que las condiciones de temperatura y alimento en la laguna fueron estímulos suficientes para la gametogénesis y maduración (Barber & Blake, 2006; Arellano-Martínez *et al.*, 2011).

A nivel fisiológico, la gametogénesis en un hermafrodita simultáneo como *N. subnodosus* puede representar un requerimiento de energía alto, incluso mayor que en especies con sexos separados (Barber & Blake 1985; Brokordt & Gurdeley, 2004). Esta mayor demanda de energía para la reproducción puede aumentar la susceptibilidad de los organismos a cambios en el medio ambiente (Harshman & Zera, 2007). En *N. subnodosus*, la actividad de HK en el

músculo aductor fue el principal indicador de los cambios en el metabolismo de carbohidratos, en contraste con especies de sexos separados (diocos) como *C. islandica*, *Mytilus galloprovincialis* y *Crassostrea virginica* que presentan cambios en la actividad de PK en relación con el desarrollo de los gametos (Greenway & Storey 2000; Brokordt *et al.*, 2000; Brokordt & Guderley 2004). Estos cambios en el metabolismo de carbohidratos podrían estar relacionados con el uso de la energía de las reservas somáticas y/o cambios en la tasa de ingesta del alimento de *N. subnodosus* durante el desarrollo de los gametos de acuerdo con los cambios en la temperatura y la disponibilidad de alimento del hábitat (Arellano-Martínez, *et al.*, 2011). Racotta *et al.* (2003) observaron que *N. subnodosus* acumula carbohidratos en el músculo aductor y el manto a medida que avanza el desarrollo de los gametos, al igual que otras especies como *C. septemradiata* (Ansell, 1974) y *N. nodosus* (Lodeiros *et al.*, 2001). En primavera, un menor contenido ArgP y un aumento de la actividad de HK en el músculo aductor y de PK en el manto de los reproductores de *N. subnodosus* sugiere que los fosfágenos y los carbohidratos, así como fuentes alternativas de energía como las guaninas (GTP) ayudan a mantener el balance energético durante etapas iniciales del desarrollo gonádico (Mustafa & Hochachka, 1973; Berthelin *et al.*, 2000; Storey & Storey, 2004; Lv *et al.*, 2017). En verano, aunado al uso de carbohidratos, existe una acumulación de ArgP y un aumento en la actividad de AK en el músculo aductor, así como de ODH en el manto cuando aumentan el tamaño (IGS, IMG) y la frecuencia de estadios más avanzados de maduración de las gónadas de los organismos.

En el presente estudio, la disminución de los niveles de ATP y GTP en el músculo aductor de los reproductores que habían alcanzado la maduración gonadal avanzada en el verano ayuda a satisfacer la demanda de energía relativamente alta de la reproducción. A su vez, una actividad de HK en el músculo aductor y en el manto relativamente baja podría indicar una absorción reducida de glucosa y fosforilación concomitante con la movilización de glucógeno y lípidos hacia las gónadas (Barber & Blake, 2006). Por otro lado, altos niveles de ArgP en el músculo aductor de los reproductores colectados durante el verano parece estar relacionado con otros factores que influyen en la disponibilidad de esta reserva de alta energía a corto plazo. Aunado a ello, se observó que los reproductores colectados en el verano y expuestos a 22 y 26 °C tienen niveles superiores a 45  $\mu\text{mol g}^{-1}$  que representan cinco veces

el nivel de ATP ( $9 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) observado en estos organismos. Además, tales niveles fueron más altos que los observados para esta especie en el campo ( $27 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) en la misma localidad y estación (ver: Capítulo 3), así como en otras especies de hábitats antárticos y templados ( $20$  a  $30 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) (Bailey *et al.*, 2003). Por lo tanto, la mano de león tiene aparentemente una mayor capacidad para almacenar ArgP en el verano que en la primavera cuando se exponen a condiciones de laboratorio y se alimentan a saciedad, lo cual podría reflejar diferencias estacionales en la eficiencia metabólica de los organismos. Se requieren realizar estudios para confirmar o identificar las causas de los patrones estacionales en las capacidades metabólicas de los organismos y la influencia de factores exógenos (ambiente) y/o factores endógenos (estado reproductivo).

Esta respuesta sugiere que la capacidad metabólica del músculo aductor y el manto, particularmente el metabolismo de piruvato es afectado durante los períodos de máximo esfuerzo reproductivo (Martínez *et al.*, 2000) posiblemente como una estrategia de preparación a una mayor actividad metabólica (anaerobia) durante el desove de verano (Salgado-García *et al.*, 2020). Esta variación estacional en el uso de fosfágenos, carbohidratos, aminoácidos libres (e.g. arginina) y guaninas (GTP) en el músculo aductor de los reproductores de *N. subnodosus* refleja su capacidad de respuesta a los cambios ambientales de su hábitat (Greenway & Storey, 2000; Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2011). Después de una semana en condiciones controladas de laboratorio, los reproductores de *N. subnodosus* mostraron una acumulación de energía (ArgP) en el músculo aductor similar en estadios iniciales (primavera) y avanzados del ciclo gonádico (verano) lo que indica una respuesta compensatoria completa de los reproductores a las condiciones de laboratorio. La acumulación de ArgP coincidió con un menor contenido de ADP y HX en el músculo aductor de los organismos (grupo L), lo que refleja que las condiciones de aclimatación (e. g. temperatura, dieta) fueron adecuadas para el balance energético (CEA) durante la maduración de las gónadas (Beis & Newsholme, 1975; Venter *et al.*, 2018). En contraste, se observó un aumento de la actividad aerobia de las células (CCO) del músculo aductor y una disminución en el manto de los organismos aclimatados en el laboratorio (grupo L), lo que probablemente conlleva cambios en la estructura y composición de las membranas de las mitocondrias como se observó en los juveniles previamente (Pörtner, 2002,

Lesser & Kruse, 2004). La actividad de CS del músculo aductor no mostró cambios estacionales antes (C) o después de la aclimatación en el laboratorio (L) posiblemente debido a que, la actividad de esta enzima requiere cambios en la tasa de transcripción específica de los tejidos (semanas) (Sukhotin *et al.*, 2006) como se ha reportado en los reproductores de *P. magellanicus* (Pichaud *et al.*, 2009) y *A. purpuratus* (Brokordt *et al.*, 2015). Es interesante que, la actividad metabólica del manto parece cambiar entre juveniles y reproductores expuestos a condiciones similares de la aclimatación en el laboratorio, lo que sugiere que también existen cambios en el metabolismo (e. g. actividad de las mitocondrias) asociados a la edad o al estado fisiológico de los organismos (Blier *et al.*, 2017). El nivel de enzimas mitocondriales (CCO) en el músculo aductor de *N. subnodosus* mostró niveles contrastantes entre juveniles y reproductores (10:1) que deben ser revisados a más detalle por sus implicaciones en la tolerancia ambiental de los organismos. Estos cambios en la actividad de las mitocondrias (CCO) y en el metabolismo de los carbohidratos (HK) en el músculo aductor de los reproductores de *N. subnodosus* frecuentemente conllevan cambios en la tolerancia térmica de los organismos a lo largo de su ciclo de vida (Anestis *et al.*, 2007). Los resultados de este estudio muestran que existen variaciones estacionales en el metabolismo energético de los reproductores de *N. subnodosus* que se asocian al desarrollo de los gametos, así como a unas respuestas compensatorias (ArgP, ADP, HX) a los cambios ambientales en el laboratorio.

### **Conclusión**

El estado energético de *N. subnodosus* presentó niveles óptimos para el crecimiento y la reproducción (CEA) en el campo (C), así como un incremento de las reservas de energía (ArgP) después de aclimatación corta en el laboratorio (L) independientemente de su estado fisiológico, origen y/o temporada de colecta. Las diferencias en las respuestas metabólicas en músculo aductor y el manto indican la alta capacidad de respuesta de los organismos para compensar la demanda de energía de su actividad fisiológica (e. g. reproducción) y la variabilidad ambiental de su hábitat. Los efectos de una aclimatación corta en el laboratorio indican que *N. subnodosus* mantuvo buena condición fisiológica y metabólica para evaluar su respuesta a cambios ambientales en el laboratorio. Esta información es crucial para interpretación de las respuestas de los organismos en su medio natural.

## CAPÍTULO 2

---

### **Metabolismo energético de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* influenciados por el efecto combinado de la hipertermia aguda y la baja disponibilidad de oxígeno**

#### ***Resumen***

Las temperaturas elevadas inducen una gran demanda de energía en los ectotermos, lo que limita su capacidad fisiológica para hacer frente a la baja disponibilidad de oxígeno disuelto. En el presente estudio, nuestro objetivo fue evaluar la tolerancia metabólica de los juveniles de *Nodipecten subnodosus* a la hipertermia sola o combinada con hipoxia moderada. Un estudio anterior mostró que los juveniles exhibían un límite térmico superior alto (32 °C), pero se desconoce el rendimiento de los organismos bajo hipertermia combinada y bajos niveles de oxígeno disuelto. La hipótesis de este estudio es que *N. subnodosus* juvenil puede enfrentar hipertermia y ambientes de oxígeno disuelto limitados durante la alta demanda de energía para el crecimiento. Los juveniles fueron expuestos a una temperatura de control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L), hipertermia aguda bajo normoxia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) o hipertermia aguda bajo hipoxia moderada (TH, 30 °C, 40% SatO<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) durante 18 h. Evaluamos la respuesta respiratoria (VO<sub>2</sub>), la carga de energía adelénica (CEA), la fosfo-arginina (ArgP) y la actividad de siete enzimas metabólicas en el músculo aductor y el manto de los juveniles. Bajo condición T, los juveniles mantuvieron un VO<sub>2</sub> alto y niveles de CEA y ArgP ligeramente disminuidos con actividad de hexoquinasa (HK) moderadamente reducida y arginina quinasa (AK) alta en el músculo aductor. Bajo la condición TH, los juveniles redujeron su VO<sub>2</sub> en un 50% y mantuvieron una CEA y ArgP similares al grupo T, acompañadas por la acumulación de monofosfato de inosina (IMP) e hipoxantina (HX) en el músculo aductor. Además, la actividad reducida de la citrato sintasa (CS), la glucólisis (PK) y el metabolismo de la octopina (ODH) en el manto indicaron la aparición de anaerobiosis en TH. Estas respuestas sugieren que los juveniles exhibieron respuestas compensatorias específicas de tejido con respecto a su equilibrio de energía bajo hipoxia moderada a temperatura elevada.

**Palabras clave:** bivalvos, crecimiento, hipoxia, tolerancia, temperatura.

### ***Introducción***

La temperatura modula virtualmente todos los procesos fisiológicos de los ectotermos marinos (Abele, 2012; Burnett & Stickle, 2001) de acuerdo a variaciones asociadas a los patrones de mareas, pero también a cambios estacionales, entre otros. Asimismo, los organismos están expuestos a cambios térmicos abruptos o atípicos ocasionados por las actividades antropogénicas del último siglo (IPCC, 2014). El calentamiento de las aguas marinas frecuentemente está acompañado por la disminución de la disponibilidad de oxígeno disuelto, que produce eventos de hipoxia moderada ( $\leq 5$  mg O<sub>2</sub> L) y severa ( $\leq 2$  mg O<sub>2</sub> L) o hasta la anoxia. Estos cambios ambientales limitan la capacidad fisiológica de los organismos, así como la distribución y la abundancia de las especies (Basso *et al.*, 2015; Burnett & Stickle, 2001; Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008). Algunas especies pueden evadir estos cambios en el ambiente (e. g. peces) o tolerar (e. g. mejillones y ostiones) (Dudognon *et al.*, 2014; Gurr *et al.*, 2018) mientras que otras especies como los pectinidos son descritos como poco tolerantes a los cambios repentinos de temperatura y disponibilidad de oxígeno disuelto debido a su nivel de actividad muscular, la ausencia de pigmentos en su hemolinfa y su limitada capacidad para cerrar las valvas durante períodos prologados (Thompson *et al.*, 1980; Donovan *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2006) comparados con especies que habitan zonas intermareales como los ostiones y los mejillones (Livingstone & Bayne 1977; de Zwan *et al.*, 1991).

La capacidad de respuesta de los organismos a estos cambios en el ambiente frecuentemente involucra respuestas específicas en los tejidos (Hochachka & Lutz, 2001), afectando principalmente a las branquias, el corazón y el músculo aductor de acuerdo a su rol en la respiración, la ventilación y el almacenamiento de la energía para la locomoción, el crecimiento y la reproducción (Brokordt *et al.*, 2013; Chih & Ellington, 1983; Gurr *et al.*, 2018). Sin embargo, otros tejidos como el manto incluyen estructuras sofisticadas que están involucradas no solo con la calcificación de las valvas y el flujo de agua a través del cuerpo durante la locomoción, sino además, con la percepción de los estímulos físicos y ambientales, cubriendo más del 40% de la masa corporal de algunas especies de moluscos, lo que sugiere su participación en la respuesta de los organismos a la exposición de escenarios de cambio climático (Seibel *et al.*, 2014; Tripp-Valdez *et al.*, 2017, 2019).

La mano de león *N. subnodosus* (Sowerby, 1835) se distribuye en las aguas profundas y costeras del Pacífico, desde la laguna Ojo de Liebre hasta las costas del Perú (Keen, 1972). Las poblaciones silvestres de la laguna Ojo de Liebre colapsaron a partir del 2010 debido a la sobreexplotación (Ruíz-Verdugo *et al.*, 2016; Velázquez-Abunader *et al.*, 2016) así como a la posible exposición a temperaturas elevadas durante el verano, cuando se han reportado disminuciones del crecimiento y la supervivencia de los juveniles cultivados en la costa oeste de la Península de Baja California (Osuna-García *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2015). En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar los cambios metabólicos de los juveniles de *N. subnodosus* asociados a la exposición a hipertermia aguda (30 °C) y su efecto sinérgico con la baja disponibilidad de oxígeno disuelto (2.7 mg O<sub>2</sub> L). El consumo de oxígeno se midió como un indicador de la capacidad aerobia de los organismos. Se analizaron las respuestas metabólicas del músculo aductor y del manto, en términos del estado de energía celular, así como las actividades enzimáticas descritas en el Capítulo 1. Para investigar más a fondo la respuesta de *N. subnodosus* a hipertermia y su efecto sinérgico con la baja disponibilidad de oxígeno, utilizamos un enfoque proteómico para caracterizar los cambios inducidos a nivel molecular, a través del análisis del proteoma del manto por espectrofotometría de masas.

## ***Materiales y métodos***

### ***Datos ambientales de la zona de cultivo***

De acuerdo con el monitoreo de las variables ambientales que se llevó a cabo (ver sección 6.2), una semana antes de la recolección de los juveniles en el campo, el promedio, el mínimo y el máximo las temperaturas fueron 20 °C, 13.6 °C y 27.8 °C, respectivamente (Fig. 8B). El nivel medio de oxígeno disuelto fue de 8.8, que osciló entre 2.9 y 11 mg de O<sub>2</sub> L (Fig. 8C). La concentración de clorofila-*a* (mg m<sup>3</sup>) (NOAA, Aqua MODIS, VIIRS, *science quality, global, level 3, present 2012, month composite*) mostró con variaciones diarias entre 0.3 y 10.8 mg m<sup>3</sup> (Fig. 8A).

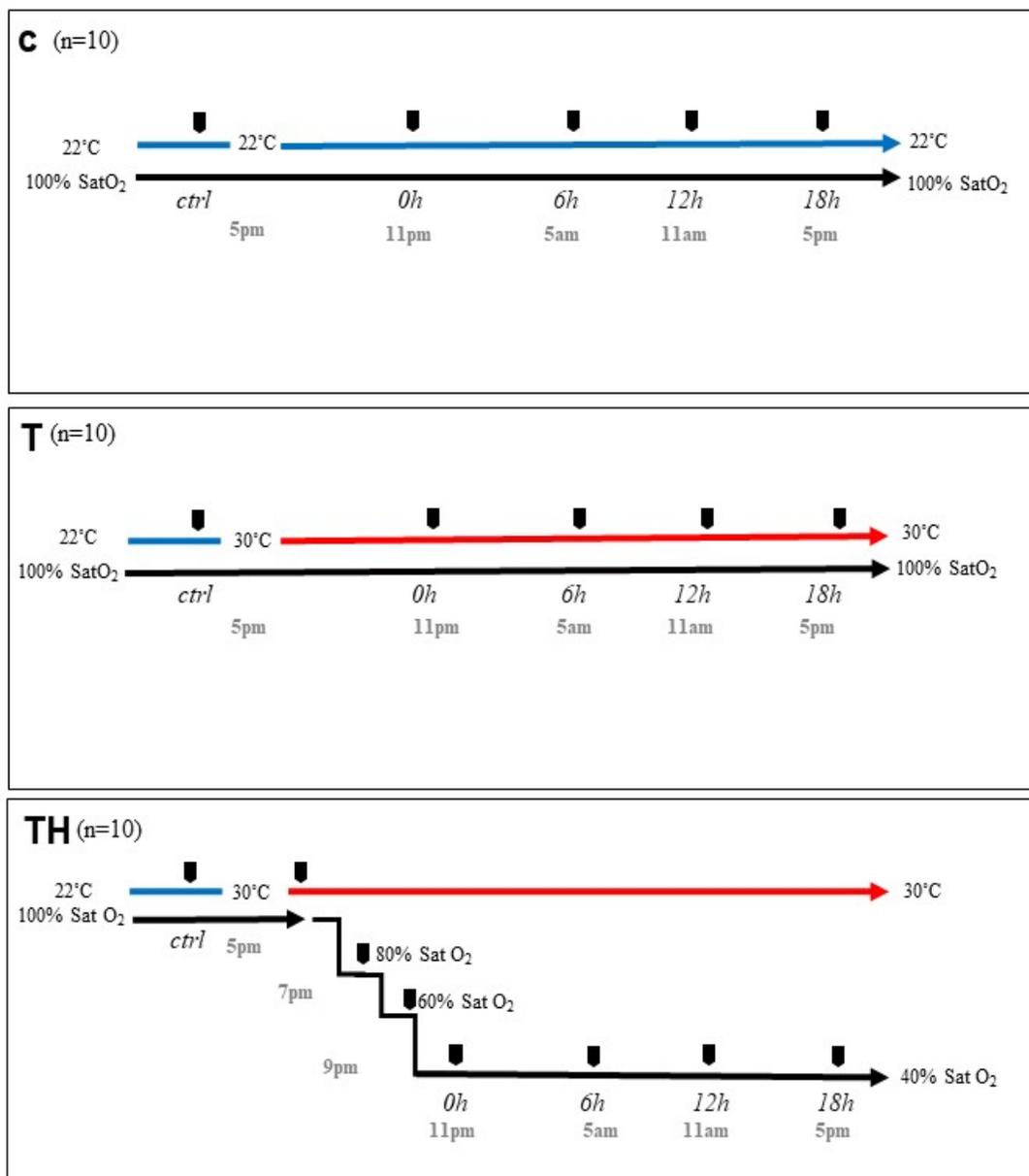
### ***Diseño experimental y medición del consumo de oxígeno***

Los escenarios se diseñaron con base en la temperatura óptima de crecimiento (22 °C) y el límite superior de tolerancia térmica reportado para juveniles de la especie (32 °C) (González-Estrada, 2003) así como en el registro de temperaturas y el nivel mínimo de oxígeno disuelto registrados en el sitio de cultivo de los organismos (2.9 mg O<sub>2</sub> L, junio 2017) (Fig 8C). El tiempo máximo de exposición de los organismos a un escenario de hipoxia (1 mg O<sub>2</sub> L) bajo condiciones de hipertermia (30 °C) fue establecido de manera preliminar de acuerdo con lo descrito en el anexo 2.

Se diseñaron dos escenarios térmicos:

- 1) control (C):** temperatura control (22 °C) + normoxia ( $\geq 90\%$  SatO<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L),
- 2) hipertermia (T):** hipertermia aguda (30 °C) + normoxia ( $\geq 90\%$  SatO<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L),
- 3) hipertermia + hipoxia (TH):** hipertermia aguda (30 °C) + hipoxia (40% SatO<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L)

Se seleccionaron de manera aleatoria tres grupos (n=10) de organismos para ser ayunados (12h) previo al inicio de la fase experimental. Cada organismo fue colocado en una cámara de respiración individual (350mL) de flujo abierto (60 mL min<sup>-1</sup>) durante dos horas a la temperatura de aclimatación (22±1 °C) previo al inicio de los experimentos. El primer grupo experimental (C, n=10) se mantuvo en condiciones constantes de temperatura y oxígeno disuelto (22 °C, 100% SatO<sub>2</sub>), mientras que el segundo grupo (T, n=10) se expuso a un aumento gradual (1 °C h<sup>-1</sup>) de la temperatura de 22 a 30 °C en normoxia (100% SatO<sub>2</sub>). El tercer grupo de organismos (TH, n=10) fue expuesto a un aumento gradual (1 °C h<sup>-1</sup>) de temperatura de 22 a 30 °C en condiciones de normoxia (100% SatO<sub>2</sub>). Dos horas después de llegar a 30 °C, la disponibilidad de oxígeno disuelto disminuyó de manera progresiva (100, 80, 60 y 40% SatO<sub>2</sub>) y se mantuvo a 40% SatO<sub>2</sub> hasta el final del período experimental (24h) (Fig. 26).



**FIGURA 26.** Diseño experimental de la exposición de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* a C: una temperatura control (22°C) en normoxia (100% SatO<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L), T: hipertermia (30 °C) en normoxia (100% SatO<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) y TH: hipertermia (30 °C) e hipoxia (40% SatO<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L). Los símbolos negros (■) representan las mediciones del consumo de oxígeno de los organismos (VO<sub>2</sub>) a las 0, 6, 12 y 18 horas en cada condición experimental. El tiempo *ctrl* se refiere al consumo de oxígeno de organismos antes de iniciar el experimento (22 °C). n=10 por grupo.

El consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) de los juveniles se midió antes de iniciar cada experimento a la temperatura de aclimatación (22°C) como una condición control (*ctrl*). El VO<sub>2</sub> de los juveniles se midió a las 0, 6, 12, y 18 horas en cada grupo experimental (C, T, TH) (Fig. 8)

Los niveles de oxígeno disuelto (% SatO<sub>2</sub>) se midieron con sensores ópticos (Microx TX2, Presens, Alemania) conectados a la válvula de salida de cada cámara de respiración (60 mL min<sup>-1</sup>). Una cámara de respiración con valvas vacías de la talla promedio de los organismos experimentales fue utilizada como control para corregir los valores observados en relación con el desplazamiento de agua por el volumen ocupado por un organismo y la respiración de microorganismos en cada bioensayo (Rosewarne *et al.*, 2016). Cada sensor de oxígeno fue calibrado con una solución saturada de sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, Fermont, México) para un nivel de 0% de saturación, así como agua marina aireada para un 100% de saturación de oxígeno a la temperatura experimental. El nivel de saturación de oxígeno (% SatO<sub>2</sub>) en cada medición fue corregido de acuerdo con lo descrito por Tripp *et al.* (2017). El VO<sub>2</sub> de los organismos se calculó con la siguiente fórmula:

$$VO_2 = \Delta VO_2 \times V_{fl}/M$$

Donde  $\Delta VO_2$  es el consumo de oxígeno de un organismo ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) corregido de acuerdo con el nivel de oxígeno de la cámara control ( $\Delta VO_2 = VO_{2\text{control}} - VO_{2\text{animal}}$ ),  $V_{fl}$  es el flujo de la cámara (L h<sup>-1</sup>) y M es el peso húmedo de los tejidos del organismo (g).

#### ***Muestreo de tejidos y tasa de mortalidad***

Al final de cada experimento, los organismos fueron retirados de inmediato del sistema experimental para obtener el peso húmedo total de los tejidos (g), el peso del músculo aductor (g) y las gónadas (g) en una balanza digital (ML602E, Mettler Toledo). Los tejidos se colocaron en sobres de papel aluminio y fueron preservados en nitrógeno líquido y posteriormente a -80 °C hasta su análisis. Las valvas de los organismos fueron lavadas y secadas para obtener el peso seco (g), la longitud total (mm) y altura máxima de valvas (mm) con un vernier digital (CD-6CS, Mitutoyo, Japón).

#### ***Extracción y cuantificación de metabolitos***

Ver sección de *Materiales y Métodos* del Capítulo 1 de este trabajo de investigación.

#### ***Actividad enzimática***

Ver sección de *Materiales y Métodos* del Capítulo 1 de este trabajo de investigación.

## ***Análisis de proteoma del manto de los juveniles***

### *Precipitación y determinación de la concentración de proteínas*

El manto de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* de cada grupo experimental (C, T y TH) fue pulverizado en un molino criogénico (M4400, Retsch, Alemania) a 25 rpm durante 30s. El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de acuerdo con el método descrito por Artigaud *et al.* (2013) con algunas modificaciones que se describen a continuación. Las muestras de tejido pulverizado (100mg) se hidrataron en 500  $\mu$ L 100mM Tris-HCl pH 6.8 con 1% mix de inhibidor de proteasas. Cada muestra se homogenizó en un polytron (PT 6100D, Kinematica AG, Suiza) a 180 g por 30s en baño con hielo para ser centrifugada a 5000g, 5 min a 4 °C. Cada sobrenadante se incubó en 500  $\mu$ L 20% TCA (v/v) toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 15,000g, 30 min a 4 °C para retirar el sobrenadante y realizar cuatro lavados con 50 mM Tris HCl pH 8.0. El lavado final se realizó con acetona fría, y luego, las muestras se evaporaron a 30 °C por 30 min (Speed Vac, Eppendorf, Alemania). Todos los reactivos fueron de Sigma Aldrich Merck (St. Louis, CA, Estados Unidos) y Fermont (México). Las muestras se transportaron por vía aérea a temperatura ambiente al Laboratorio de ciencias del ambiente marino (LEMAR) de la Universidad de la Bretaña Occidental (UBO) en Brest, Francia. Posteriormente, las muestras se conservaron a 4 °C durante un período máximo de dos semanas antes de su análisis.

La concentración de proteínas del manto de los juveniles de *N. subnodosus* de cada grupo experimental (C, T, TH) fue analizada por la técnica de Bradford modificado por Ramagli (1999) en muestras diluidas en 100  $\mu$ L de buffer 2 M Tiourea, 7 M urea, 4% CHAPS, 1% DTT, (1:40) por triplicado. Se adicionaron 10  $\mu$ L de ácido clorhídrico 0.1 N y 200  $\mu$ L de solución de Bradford (1:5, BioRad, Estados Unidos) a cada muestra para su lectura a 595 nm en un lector de microplacas (Omega, TermoScientific, Finlandia) a temperatura ambiente. La absorbancia de cada muestra se corrigió con el valor promedio de triplicado de muestras blanco sin muestra biológica. La curva estándar se construyó de 0.06 a 1.0 mg mL<sup>-1</sup> de proteína albumina sérica bovina comercial (BSA, *Bovine Serum Albumin*, Sigma Aldrich-Merck, St. Louis, CA, Estados Unidos). La concentración de proteína en las muestras ( $\mu$ g g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>) se estimó con el cálculo del valor de  $x$  en la ecuación de regresión lineal donde  $y$  representa la absorbancia media de una muestra corregida con el valor promedio de las muestras blanco. Todas las muestras se ajustaron a una concentración de  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  en  $250 \mu\text{L}$  para los análisis posteriores.

#### *Digestión y preparación de proteínas para el análisis por espectrometría de masas*

Las muestras de proteínas del manto de los juveniles de *N. subnodosus* se diluyeron con  $50 \mu\text{L}$  de  $100 \text{ mM}$  de bicarbonato de amonio (BiCAM) y  $10 \text{ mM}$  DTT para incubarse a  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 40 minutos y adicionar  $10 \mu\text{L}$  de  $130 \text{ mM}$  IAA (GE Healthcare, Reino Unido). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad total. Al finalizar, se adicionaron  $10 \mu\text{L}$  de tripsina (Promega, Estados Unidos) para incubarse toda la noche a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Al día siguiente, se adicionaron  $75 \mu\text{L}$  de ácido fórmico ( $5\% \text{ v/v}$ , NORMAPUR, VWR, Reino Unido). Las muestras se evaporaron a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante tres horas (Speed Vac Eppendorf, Alemania) y se almacenaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

La fragmentación de los péptidos se realizó por cromatografía de líquidos (nano-LC) en una columna  $\mu\text{C18 Omix}$  (Agilent Technologies, Alemania). Luego, la separación de los péptidos se realizó a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  en un sistema de nano flujo de ultra alta presión NanoElute (Bruker Daltonics, Alemania) equipado con una columna Reprosil C18 de fase reversa de  $25 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  con tamaño de partícula de  $1,6 \mu\text{m}$  (Ionopticks) conectada a una pre-columna C18 Pepmap 100 de  $5 \text{ mm} \times 300 \mu\text{m}$  (Thermo Scientific, Finlandia). Las fases móviles consistieron en  $0.1\%$  de ácido fórmico,  $99.9\%$  de agua ( $\text{v} / \text{v}$ ) (A) y  $0.1\%$  de ácido fórmico en  $99.9\%$  de ACN ( $\text{v} / \text{v}$ ) (B) a un flujo de  $400 \text{ nl min}^{-1}$  con el siguiente gradiente: del 2 al  $15\%$  de B ( $60 \text{ min.}$ ),  $25\%$  de B ( $30 \text{ min.}$ ),  $37\%$  de B ( $10 \text{ min.}$ ) y un lavado final de  $95\%$  de B.

#### *Análisis de espectrometría de Masas*

El análisis de espectrometría de masas de los péptidos del manto de los juveniles de *N. subnodosus* se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas pro TIMS-TOF (Bruker Daltonics, Alemania) con una fuente de iones de nano-electropulverización modificada (CaptiveSpray, Bruker Daltonics, Alemania). El sistema se calibró cada semana y la precisión

de la masa fue mejor que 1 ppm. Para la ionización se empleó un voltaje de pulverización de 1400 a 180 ° C. Los espectros de MS se adquirieron en el modo positivo en el rango de masa de 100 a 1700 m / z. En el análisis descrito en este trabajo, el espectrómetro de masas funcionó en modo PASEF con exclusión de péptidos con una sola carga. Se realizó un número de 10 exploraciones PASEF MS / MS durante 1.25 segundos desde el rango de carga 2-5. El patrón de fragmentación se usó para determinar la secuencia del péptido. La búsqueda en la base de datos se realizó utilizando el software *Peaks X* utilizando una base de datos de 22, 409 proteínas de *Mizuhopecten yessoensis* descargadas de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Estados Unidos). Las modificaciones de las variables permitidas fueron las siguientes: C-carbamidometilo, K-acetilación, oxidación de metionina y desamidación (NQ). "Trypsin" fue seleccionado como inespecífico. La precisión de la masa se ajustó a 40 ppm y 0,05 Da para el modo MS y MS/MS, respectivamente. Los datos se filtraron de acuerdo con una tasa de falsos descubrimientos (FDR, *False Discovery Rate*) del 4,8% para el grupo de proteínas y la eliminación de la redundancia de proteínas sobre el conjunto o un subconjunto de los péptidos.

### ***Análisis estadístico***

Todas las variables fueron analizadas para su normalidad y homocedasticidad usando pruebas de Bartlett y Levene, respectivamente. Se utilizaron transformaciones arcoseno y logaritmo cuando fue necesario para cumplir con los supuestos. Un análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas se utilizó para evaluar el efecto de las condiciones experimentales (entre sujetos) a lo largo del tiempo (en los sujetos) sobre el consumo de oxígeno de los organismos para cada estación. Una prueba de Bonferroni fue aplicada para la comparación de las medias de cada grupo usando los valores de consumo de oxígeno antes de iniciar cada experimento (control). Un análisis unifactorial (ANOVA) fue utilizado para evaluar el efecto de la estación (primavera, verano) y la temperatura (22, 26 y 30 °C) sobre las variables metabólicas analizadas en el músculo aductor y el manto de los reproductores. Los cambios significativos entre los valores medios de cada grupo experimental se establecieron con análisis post-hoc (Tukey) considerando como un efecto estadístico significativo un valor de  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis de varianza y student se realizaron en el programa *Statistica 7.0* (StatSoft, Tulsa, Okland, Estados Unidos). Todos los gráficos se

editaron con *Graphpad* 8.3.1 para Windows (GraphPad, La Jolla, California) y Biorender.com.

El análisis estadístico de los cambios en la intensidad de las proteínas del manto de los juveniles se analizó con el programa *Perseus* v 1.6.12.0 (Tyanova *et al.*, 2016) seleccionando cuatro replicas para cada grupo experimental (C, T, TH). Los datos fueron transformados a  $\log_2$  para su normalización, aplicando la filtración de valores válidos en las filas (75%, al menos en un grupo) y columnas (#Unique). Se construyeron representaciones gráficas para probar la calidad de los datos por inspección visual entre todas las réplicas de cada grupo experimental, considerando como válidos valores de correlación de Pearson mayores al 0.70. Posteriormente, los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías considerando como factores las condiciones experimentales (C, T, TH). Las proteínas cuya abundancia se modificó de manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las condiciones experimentales fueron identificadas en NCBI. La tasa de cambio (FC, *Fold change*) en la abundancia de cada proteína entre la condición 1 (“control”) y la condición 2 (“hyperthermia” o “hipoxia”) se calculó con el valor medio de la intensidad de cada proteína ( $\log_2$ ). Finalmente, la clasificación de las proteínas de acuerdo con los procesos biológicos se generó a partir de la identificación de las proteínas utilizando UniProt y NCBI y GeneOntology.

## Resultados

### Tamaño e índices morfométricos

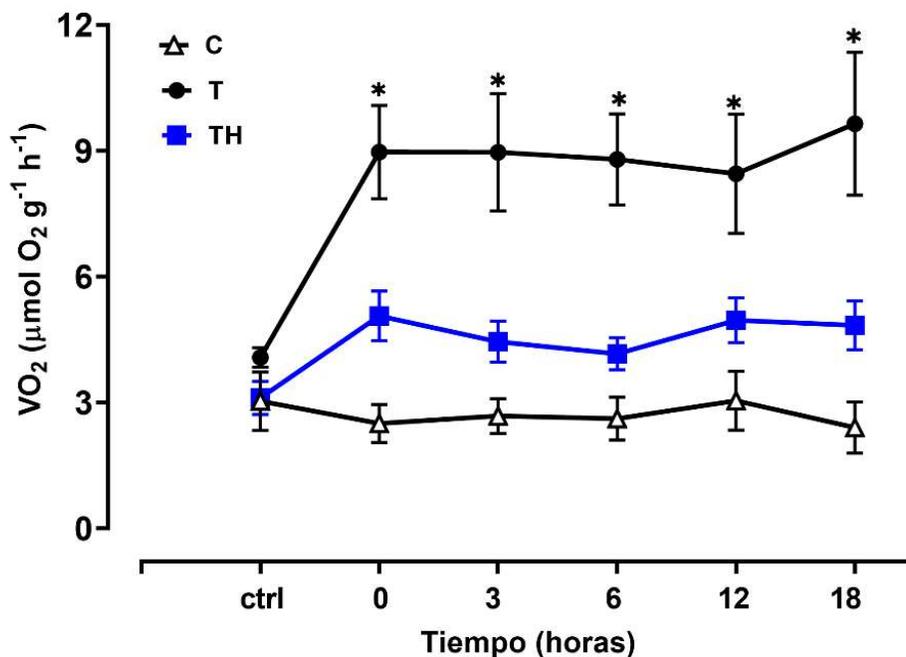
Los juveniles de mano de león *N. subnodosus* expuestos a hipertermia e hipoxia (TH) durante 24h (Fig. 26) presentaron una disminución significativa del tamaño de la gónada (IGS) en relación con el grupo control (C), con niveles intermedios observados en el grupo expuesto a hipertermia en condiciones de normoxia (T). No hubo diferencias en el IC y el IMA entre grupos experimentales (Tabla III).

**Tabla III.** Datos biométricos de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L), hipertermia aguda en normoxia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) y a hipertermia combinada con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L).

Variable	C	T	TH	ANOVA $p \leq 0.05$
Altura de las valvas (mm)	18.2±0.4	17.1±0.4	17.1±0.3	0.22
Indice de Musculo Aductor (IMA, %)	23.7±1.1	25.3±1.1	25.8±0.6	0.36
Indice de Condición (IC, %)	47.6±1.2	49.5±1.4	52.7±1.4	0.09
Indice gonadosomático (IGS %)	2.6±0.4 <sup>b</sup>	2.0±0.2 <sup>ab</sup>	1.3±0.3 <sup>a</sup>	0.02

### Consumo de oxígeno y mortalidad

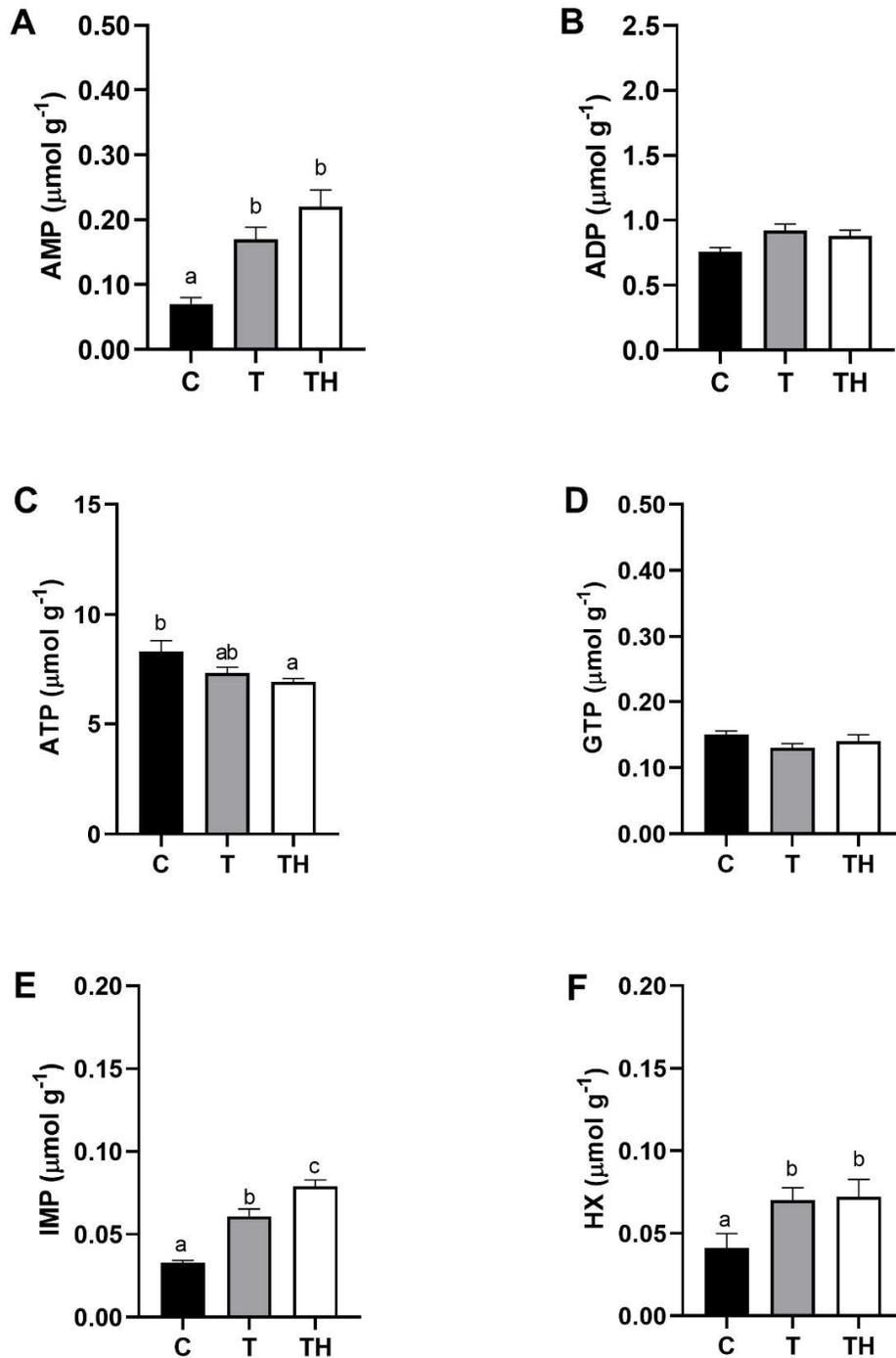
El consumo de oxígeno de los organismos (VO<sub>2</sub>) permaneció similar para todos los grupos experimentales (C, T, TH) antes de iniciar los experimentos a 22 °C (3.2±0.3 μmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, mean ±SE,  $p=0.19$ ). En el grupo control, el VO<sub>2</sub> permaneció constante hasta el final del experimento, mientras que en los organismos expuestos a hipertermia (T), el VO<sub>2</sub> se incrementó significativamente inmediatamente después de alcanzar la temperatura experimental (30 °C) de 4.1±0.2 a 9.0±1.2 μmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ( $p = \leq 0.05$ ). Los organismos expuestos a una condición de hipertermia combinada con hipoxia (TH), mostraron una disminución significativa de su VO<sub>2</sub> en relación con el grupo T (Fig. 27). No se registro mortalidad durante el desarrollo de los experimentos (C, T, TH).



**FIGURA 27.** Consumo de oxígeno de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* ( $VO_2$ ,  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mantenidos en una temperatura control ( $22^\circ\text{C}$ ,  $100\%$  Sat  $O_2$ ,  $7.4 \text{ mg O}_2 \text{ L}$ ). ( $\Delta$ ), hipertermia aguda (T,  $30^\circ\text{C}$ ,  $100\%$  Sat  $O_2$ ,  $6.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}$ ) ( $\bullet$ ) o hipertermia combinada con hipoxia (TH,  $30^\circ\text{C}$ ,  $40\%$  Sat  $O_2$ ,  $2.7 \text{ mg O}_2 \text{ L}$ ) ( $\blacksquare$ ). Las letras (a, b, c) representan efecto significativo entre las condiciones de temperatura y el tiempo de exposición (0, 6, 3, 12 y 18 horas). ANOVA de mediciones repetidas, prueba de Bonferroni  $p \leq 0.05$ . El tiempo *ctrl* se refiere al  $VO_2$  de organismos antes de iniciar el experimento ( $22^\circ\text{C}$ ).  $N=8$  organismos por grupo experimental. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### **Composición de nucleótidos**

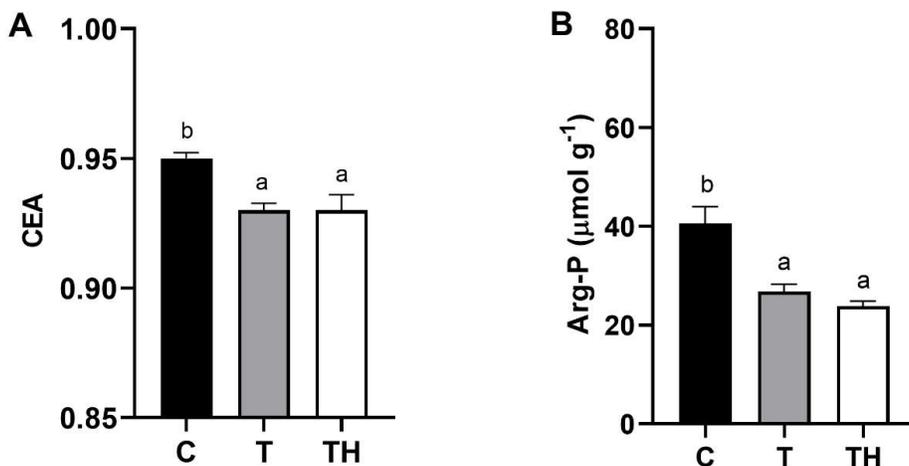
A las 18h de exposición, los niveles de AMP en el músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* expuestos a hipertermia en condiciones de normoxia (T) o hipoxia (TH) se incrementaron con relación a los niveles observados en el grupo control (C) (Fig. 28A). El ATP disminuyó significativamente en el grupo TH en relación con los valores observados en T y C (Fig. 28C), mostrando valores intermedios en el grupo T. El contenido de otros nucleótidos como el ADP y el GTP permanecieron constantes en todas las condiciones (Figs. 28B, D). Los productos de degradación IMP e HX fueron más elevados en los tratamientos T y TH, con mayores niveles de IMP en el grupo TH en relación con el resto de los grupos experimentales. Finalmente, el nivel de HX no mostró diferencias significativas entre T y TH (Figs. 28E, F).



**FIGURA 28.** Composición de nucleótidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) del músculo aductor de juveniles de mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia aguda en condiciones de normoxia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco) durante 18h. **A.** adenosin monofosfato, AMP. **B.** adenosin difosfato, ADP. **C.** adenosin trifosfato, ATP. **D.** Guanosina trifosfato, GTP. **E.** Inosina monofosfato, IMP. **F.** Hipoxantina, HX. ANOVA de una vía, Tukey ( $p \leq 0.05$ ). N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos experimentales. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Carga energética adenilica y contenido de ArgP***

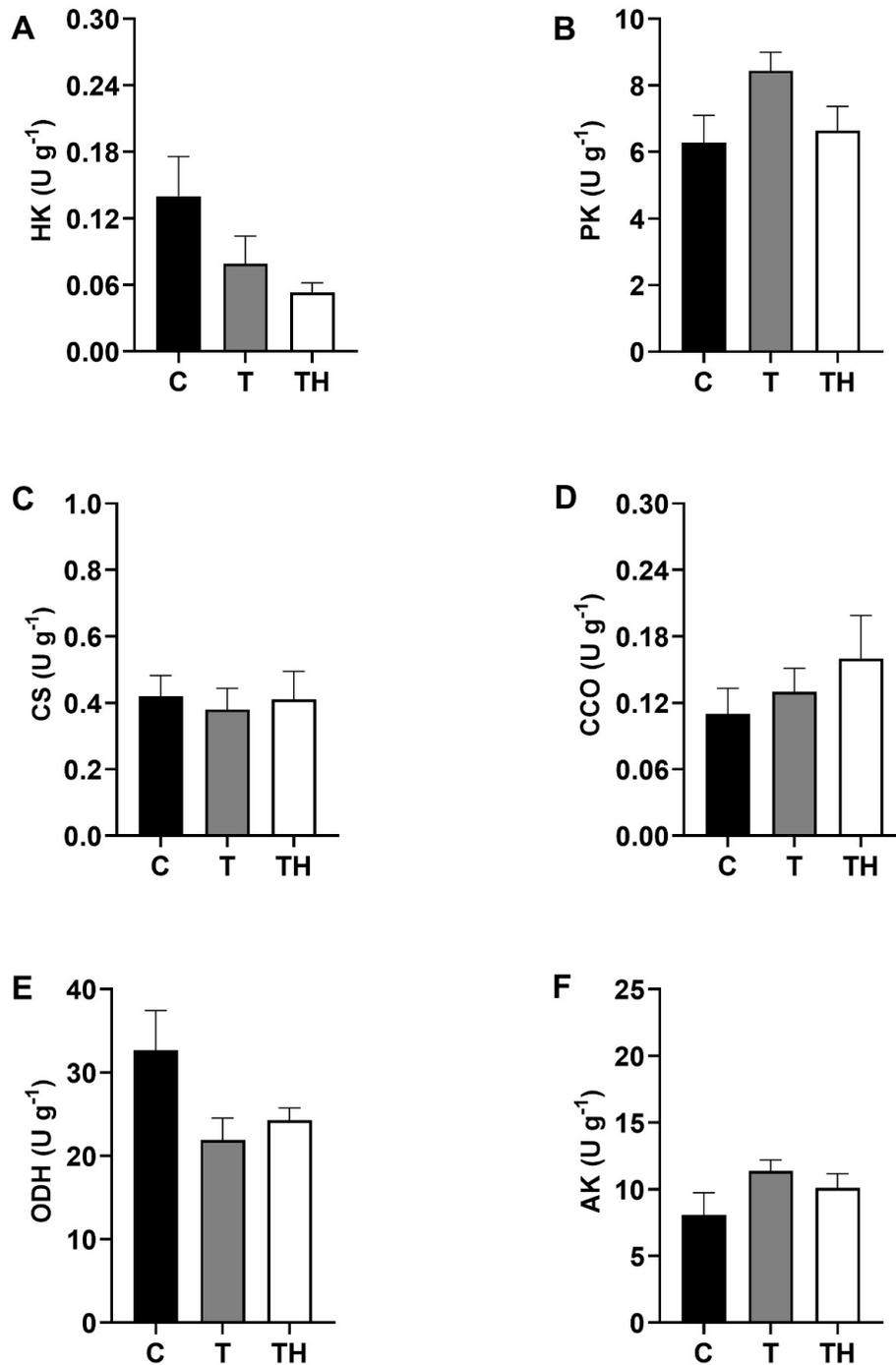
El nivel de CEA y el contenido de ArgP en el músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* disminuyeron después de la exposición a hipertermia en condiciones de normoxia (T) o hipoxia (TH) en relación con el valor observado en el grupo control (C) (Figs. 29A, B).



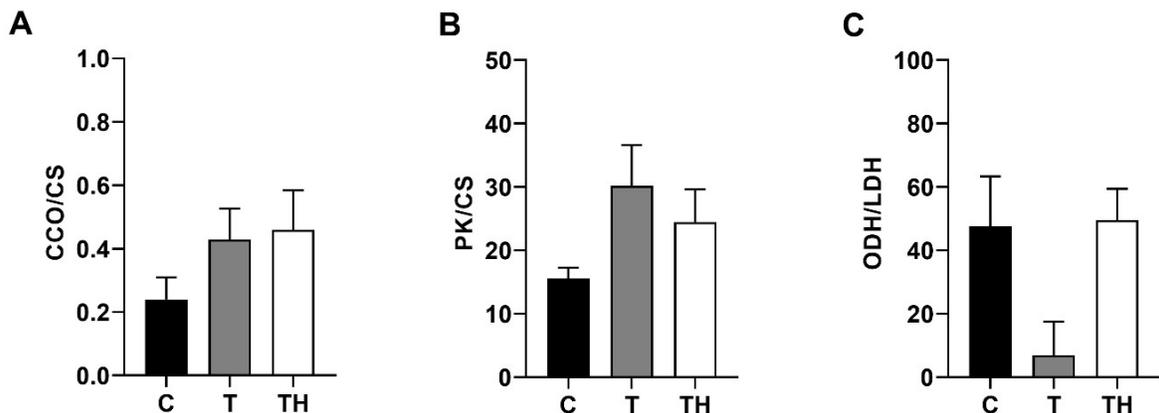
**FIGURA 29.** Carga energética adenilica (CEA) y fosfo-arginina (ArgP,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en el músculo aductor de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C; 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia combinada con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). ANOVA de una vía, Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos experimentales. N=9 organismos por grupo. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Enzimas metabólicas en el músculo aductor***

La actividad de la HK en el músculo aductor de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* mostró una tendencia a disminuir en los grupos T y TH en relación con su nivel en el grupo control (C) (Fig. 30A) mientras que PK mostró niveles similares en todos los grupos experimentales (Fig. 30B). Las enzimas mitocondriales CCO y CS así como las enzimas glucolíticas no mostraron diferencias significativas entre condiciones experimentales (Figs. 30 C, D). mientras que ODH mostró una disminución del 30% en T y TH en relación con los valores del grupo C (Fig. 30E). El nivel de LDH (datos no mostrados en Fig. 30) fue 50 veces menor que los niveles de ODH, sin mostrar cambios entre el grupo C ( $0.92 \pm 0.24 \text{ U g}^{-1}$ ), T ( $0.50 \pm 0.08 \text{ U g}^{-1}$ ) y TH ( $0.50 \pm 0.15 \text{ U g}^{-1}$ ). La relación entre las actividades enzimáticas CCO/CS, PK/CS y ODH/LDH no fueron afectados por las condiciones experimentales (Figs. 31 A-C).



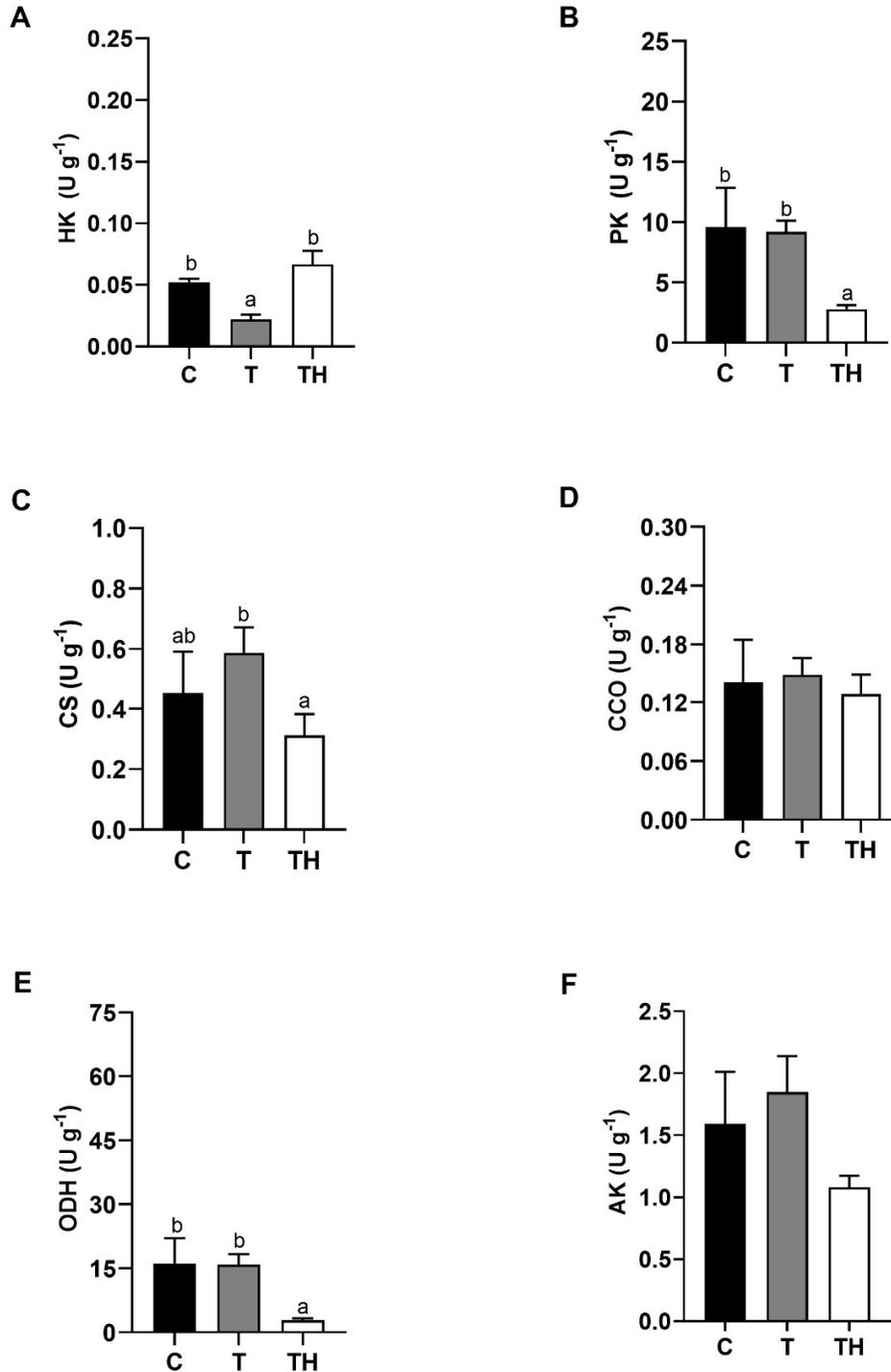
**FIGURA 30.** Actividad de las enzimas aerobias y anaerobias ( $\text{U g}^{-1}$ ) en el músculo aductor de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). **A.** Hexoquinasa, HK. **B.** Piruvato quinasa, PK. **C.** Citrato sintasa, CS. **D.** Citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Arginin quinasa, AK. ANOVA de una vía, Tukey ( $p \leq 0.05$ ). N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos experimentales. Media  $\pm$  error estándar de la media.



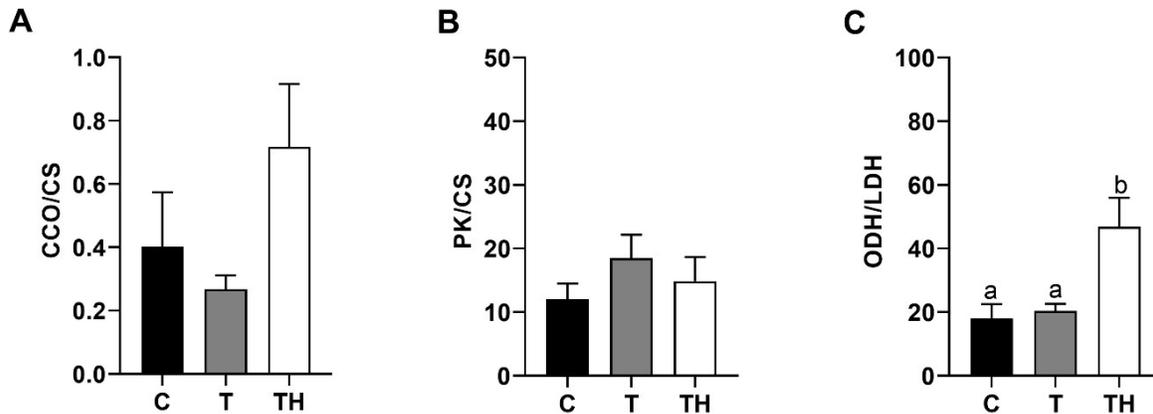
**FIGURA 31.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de los juveniles de la mano de león *N subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA de una vía, Tukey ( $p \leq 0.05$ ). N=9 organismos por grupo. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Enzimas metabólicas en el manto***

La actividad de la HK disminuyó significativamente solo en condiciones de hipertermia (T), mientras que, la actividad de la PK disminuyó en el grupo TH (Figs. 32A, B). La actividad de las enzimas mitocondriales como la CS presentó sus niveles más altos en el grupo T y los más bajos en el grupo TH, mientras que la CCO presentó valores similares en todas las condiciones (Figs. 32C, D). El nivel de LDH (dato no mostrado en Fig. 32) fue 17 veces menor que los niveles de ODH, alcanzando los valores más bajos en el grupo TH ( $0.05 \pm 0.01$  U g<sup>-1</sup>) con relación a los valores en T ( $0.91 \pm 0.15$  U g<sup>-1</sup>) y C ( $1.1 \pm 0.4$  U g<sup>-1</sup>) ( $p \leq 0.01$ ). La actividad de la ODH también disminuyó en el grupo TH, al igual que la actividad de la AK, aunque ésta última no fue significativa (Figs. 32 E, F). La relación de la actividad de CCO/CS y PK/CS no se modificaron en ninguna de las condiciones experimentales, mientras que la relación ODH/LDH aumentó significativamente en TH en relación con los valores observados en el C y T, respectivamente (Figs. 33 A-C).



**FIGURA 32.** Actividad de las enzimas aerobias y anaerobias ( $U\ g^{-1}$ ) en el manto de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat  $O_2$ , 7.4 mg  $O_2\ L$ ) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat  $O_2$ , 6.5 mg  $O_2\ L$ ) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 40% Sat  $O_2$ , 2.7 mg  $O_2\ L$ ) (blanco). **A.** Hexoquinasa, HK. **B.** Piruvato quinasa, PK. **C.** Citrato sintasa, CS. **D.** Citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Arginin quinasa, AK. ANOVA de una vía, Tukey ( $p \leq 0.05$ ). N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos. Media  $\pm$  error estándar de la media.

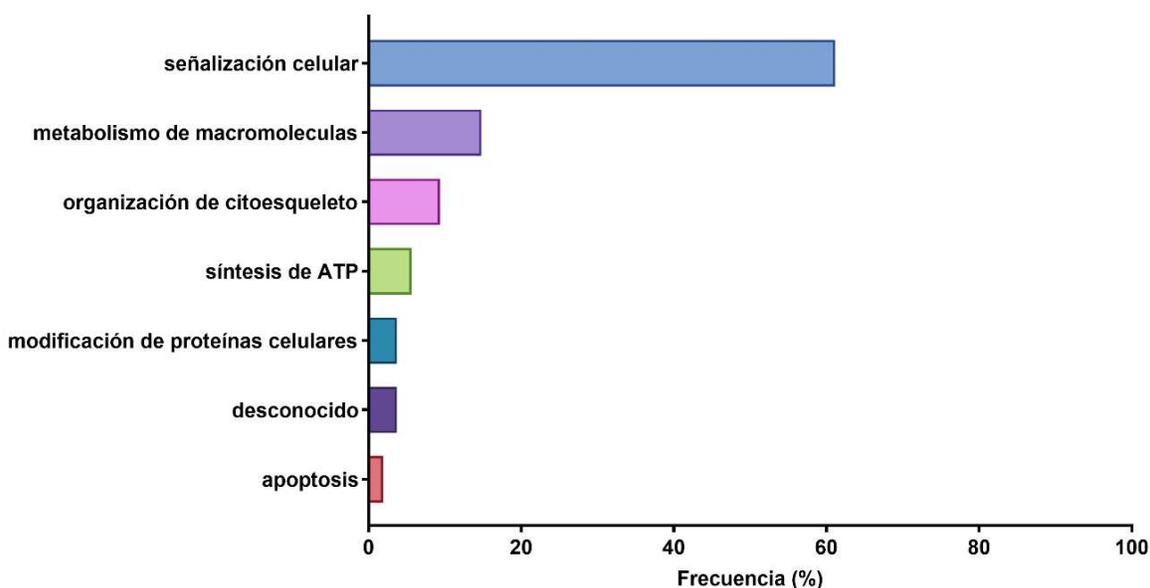


**FIGURA 33.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de los juveniles de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a una temperatura control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L) (negro), hipertermia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) (gris) o hipertermia con hipoxia (TH, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) (blanco). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA de una vía, Tukey  $p \leq 0.05$ . N=9 organismos por grupo. Las letras minúsculas representan efectos significativos entre grupos. Media  $\pm$  error estándar de la media.

#### ***Efecto de la temperatura elevada y la hipoxia sobre el proteoma del manto***

El objetivo de este análisis fue identificar diferencias en los patrones de expresión funcional de las proteínas en el manto de los juveniles de *N. subnodosus* expuestos a las diferentes condiciones experimentales (C, T, TH). Se identificaron un total de 638 proteínas anotadas en el manto de los juveniles de *N. subnodosus*, de las cuales 54 proteínas mostraron un patrón diferencial para la condición T, seis proteínas fueron afectadas por la hipoxia moderada combinada con hipertermia (TH), y dos proteínas presentaron una interacción positiva en ambos grupos (T x H) (ANOVA 2 vías  $p < 0.05$ ). Las 54 proteínas que se expresaron diferencialmente se clasificaron en siete categorías principales de acuerdo con su función en los procesos biológicos: *señalización celular* (61.1%), *metabolismo de macromoléculas* (14.8%) *organización del citoesqueleto* (9.3%), *síntesis de ATP* (5.6%), *modificación de proteínas* (3.7%) y *apoptosis* (1.9%). Adicionalmente, se encontraron dos proteínas desconocidas (XP\_021374826.1, XP\_021368527.1) que fueron clasificadas como *unknown* (3.7%) (Fig. 34).

La Categoría 1 (señalización celular) fue el grupo de proteínas más abundante (61.1%) en la respuesta a hipertermia (T), que incluye 33 proteínas con varias isoformas de las troponinas involucradas en la señalización celular mediada por la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) en las células, la regulación negativa y positiva de la actividad de las ATPasas, la organización de los sarcómeros, entre otras funciones. Otras proteínas como las *flotillin* han sido descritas como mediadoras de la adhesión entre las células, la producción de citoquina, la unión entre proteínas, la fosforilación de las proteínas, la localización y estabilización de proteínas en la membrana plasmática, la respuesta del retículo endoplásmico al estrés, etc. En este grupo también se encuentra la *protein phosphatase 1 regulatory 12A* que participa en la desfosforilación de las proteínas, la regulación de la adhesión de las células, la actividad de la fosfatasa de cadena ligera, la regulación del transporte núcleo citoplasmática y la señal de transducción, entre otros procesos.



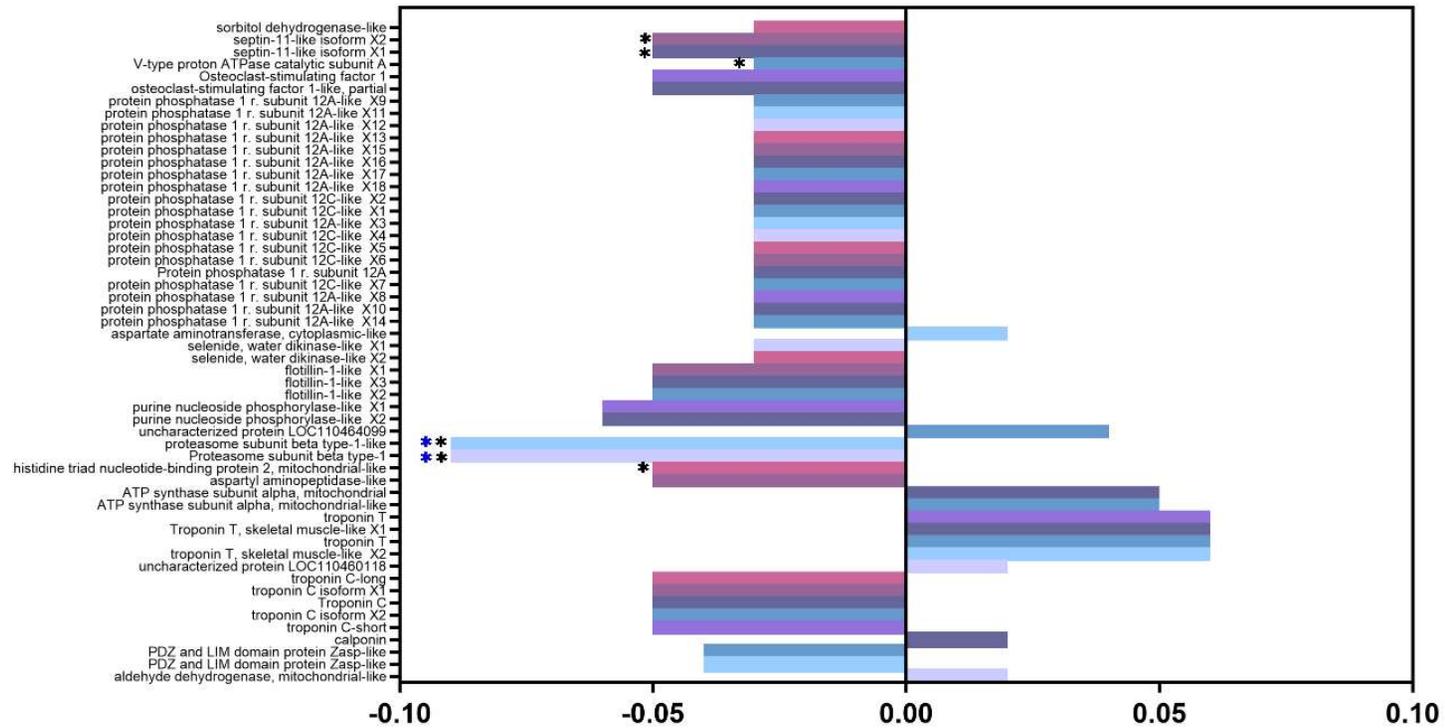
**FIGURA 34.** Proporción (%) de las funciones biológicas (GenOntology) de las 54 proteínas del manto de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* que fueron afectadas por temperatura elevada en condiciones de normoxia (T, 30 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L) y una condición de hipoxia moderada combinada con hipertermia (TH, 30 °C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) en relación a una condición control (C, 22 °C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L).

Entre las proteínas clasificadas en la Categoría 2 (metabolismo de macromoléculas) se encuentran proteínas como la enzima *aldehído deshidrogenasa* mitocondrial y la enzima *deshidrogenasa de sorbitol* que participan en el metabolismo de carbohidratos como la fructosa y la glucosa, la *aspartil-aminopeptidasa* que regula procesos asociados al metabolismo de péptidos, algunas *isoformas de la fosforilasa de nucleósidos de purina* involucradas en el catabolismo de guanosina y xantina, así como en el metabolismo de nucleósidos de purina. En la Categoría 3 (organización del citoesqueleto) se agruparon las proteínas involucradas como la *calponina* con funciones similares a las *tropininas*, así como dos *proteínas tipo PDZ* y dos *septinas*.

En la categoría 4 (síntesis de ATP) se encuentran la *subunidad A catalítica de la ATPasa tipo V* que está involucrada con el metabolismo de energía (ATP), la respuesta celular a las concentraciones de oxígeno entre otras funciones celulares, así como la *subunidad alfa de la ATP sintasa mitocondrial*, que participa en la biosíntesis de ATP, el metabolismo de lípidos, etc. En la categoría 5 (modificación de proteínas, homeostasis) se agruparon dos isoformas de la proteína *selenide (wáter dikinase-like)* involucradas en los procesos de modificación de las proteínas, destruyendo las proteínas dañadas para que la célula pueda seguir desarrollando sus funciones y mantener la homeostasis celular. Finalmente, la Categoría 6 (desconocida) está compuestas por proteínas que no fueron identificadas y la Categoría 7 (apoptosis) solo incluye a la proteína *histidine triad nucleotide-binding portein-2 mitochondrial* que ha sido descrita por su participación en procesos de apoptosis y catabolismo de lípidos y biosíntesis de esteroides.

El 20.4% de las proteínas (n=11) descritas fueron estimuladas positivamente, entre ellas, se pueden destacar la *troponina T* y la *subunidad alfa de la ATP sintasa mitocondrial*, involucradas en la regulación positiva de la actividad de ATPasas, la síntesis de ATP y el metabolismo de lípidos. Adicionalmente, la tasa de cambio de intensidad de una proteína desconocida (LOC110464099) fue estimulada por la temperatura elevada (T). En contraste, el 79.6% de las proteínas (43 proteínas) del manto de los juveniles fue inhibido por la hipertermia (T), entre ellas se pueden destacar proteínas involucradas en la señalización celular, la apoptosis celular y el metabolismo de carbohidratos, proteínas y nucleósidos de purina (Fig. 34).

En el manto de los juveniles de *N. subnodosus* se identificaron seis proteínas afectadas por hipoxia moderada combinada con hipertermia (TH). Algunos procesos como la apoptosis y el catabolismo de lípidos (*histidine triad nucleotide-binding protein 2 mitochondrial-like partial*), así como el metabolismo de guanosin (GTP, GDP), procesos de localización de proteínas, citoquinesis y la regulación de la sinapsis fueron inhibidas (*septin-11-like isoform X1* y *septin-11 like isoform X2*). Además, la tasa de cambio en la intensidad de proteínas asociadas con el metabolismo de energía (ATP) en respuesta a los niveles de oxígeno en las mitocondrias (*V-type proton ATPase catalytic subunit A*), así como la reparación de proteínas dependientes de ATP y ubiquitina dañadas y el mantenimiento de la homeostasis celular (*proteasome subunit beta type-1* y *proteasome subunit beta type-1-like*) mostraron valores negativos de FC. Además, estas proteínas fueron las únicas que presentaron una interacción significativa para T y TH (Fig. 34).



**FIGURA 35.** Tasa de cambio (FC, *fold change*) de la intensidad de las proteínas del manto de juveniles de mano de león *N. subnodosus*. Se identificaron un total de 638 proteínas con 54 proteínas afectadas por la temperatura elevada (T, 30°C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 6.5 mg O<sub>2</sub> L), y solo seis proteínas afectadas por la hipoxia moderada combinada con hipertermia (TH, 30°C, 40% Sat O<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) con relación a un grupo control a una temperatura óptima y normoxia (C, 22°C, 100% Sat O<sub>2</sub>, 7.4 mg O<sub>2</sub> L). La tasa de cambio (FC) mostró valores negativos para 43 proteínas (79.6%) y valores positivos para once proteínas (20.4%). (\*) proteínas afectadas por una condición H. (\*\*) proteínas con interacción positiva para T y H. ANOVA 2 vías. *Perseus* v 1.6.12.0 (Tyanova *et al.*, 2016). El valor de FC se calculó contrastando la media de la intensidad de las proteínas (log<sub>2</sub>) de cada grupo experimental (C, T, TH).

### **Discusión**

En este estudio evaluamos la capacidad fisiológica de los juveniles de *N. subnodosus* para responder a una condición de hipertermia aguda combinada con una disponibilidad baja de oxígeno disuelto a nivel de estado energético celular. Para ello, realizamos un reto térmico basado en el perfil térmico del hábitat (entre 13.6 y 27.8 °C en el sitio de cultivo en la laguna Ojo de Liebre), pero también consideramos la temperatura deletérea para el potencial de crecimiento (26 °C) y para la supervivencia de los organismos (32 °C) (González-Estrada, 2003). El nivel de oxígeno disuelto fue seleccionado como una condición de hipoxia moderada basado en el nivel mínimo de oxígeno disuelto observado en el sitio de cultivo de los organismos (2.9 mg O<sub>2</sub> L, junio, 2017). Se confirmó que los juveniles de *N. subnodosus* estuvieron expuestos solo a eventos agudos de hipoxia moderada en el campo. Aunado a ello, el nivel de hipoxia seleccionado en este estudio es comúnmente utilizado en estudios que evalúan las respuestas fisiológicas de moluscos bivalvos de ecosistemas costeros bajo condiciones de hipoxia moderada (~3 mg O<sub>2</sub> L) (Long & Seitz 2008; Neff *et al.*, 2020).

Los moluscos bivalvos exhiben una gran diversidad de tolerancia a la hipoxia (Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008); sin embargo, no existen datos previos de tolerancia en términos de supervivencia y ajustes metabólicos a niveles bajos de OD para *N. subnodosus*. En un experimento preliminar, evaluamos la tolerancia y el VO<sub>2</sub> de los juveniles de *N. subnodosus* bajo condiciones hipóxicas severas (10% Sat O<sub>2</sub>, 1.0 mg O<sub>2</sub> L a 30 °C), registrando un 50% de mortalidad después de 16 h (anexo 2). Un parámetro descriptivo de la tolerancia de los organismos acuáticos a la hipoxia es el punto crítico de oxígeno (PcO<sub>2</sub>), definido como un cambio de una respuesta reguladora a una respuesta de oxiconformador en una condición térmica dada o específica (Grieshaber *et al.*, 1994; Gurr *et al.*, 2018). Los pectínidos incluyen especies tolerantes a la hipoxia como *A. purpuratus* con PcO<sub>2</sub> relativamente bajo (24.4% Sat O<sub>2</sub>) a 25 °C (Aguirre-Velarde *et al.*, 2016, 2018) y especies sensibles a la hipoxia como *P. maximus* con mayor PcO<sub>2</sub> (36.1% Sat O<sub>2</sub>) a 25 °C (Artigaud *et al.*, 2014). Con base en estos estudios, y considerando nuestros resultados preliminares en juveniles de *N. subnodosus* al 10% de Sat O<sub>2</sub>, planteamos la hipótesis de que la PcO<sub>2</sub> de esta especie de pectínidos submareales probablemente esté cerca del 40% de Sat O<sub>2</sub> a 30 °C (~ 2.7 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>).

Cuando se expuso a hipertermia aguda (T) en condiciones de normoxia, los juveniles de *N. subnodosus* exhibieron un aumento triple en el  $VO_2$ , una respuesta que refleja un requerimiento alto de energía (Schmidt Nielsen, 1997). El incremento en la respuesta respiratoria de los juveniles contrasta con los valores constantes de  $VO_2$  de los reproductores expuestos a un reto térmico agudo similar (Salgado-García *et al.*, 2020). Estas diferencias en la tasa respiratoria de los organismos pueden estar relacionadas con cambios en el metabolismo energético asociados con la edad o el estado fisiológico de los individuos (locomoción, crecimiento, reproducción), así como con respuestas compensatorias a las condiciones ambientales del hábitat (Pörtner *et al.*, 2017; Verberk *et al.*, 2018). En los reproductores de *N. subnodosus* colectados en Bahía Magdalena se observó un patrón estacional en las respuestas metabólicas del músculo aductor que coinciden con el desarrollo de los gametos (Salgado-García *et al.* 2020). En los juveniles, se observó que la capacidad aerobia se reduce bajo condiciones de TH, confirmando que existe un efecto sinérgico entre la hipertermia y la baja disponibilidad de oxígeno sobre el desempeño fisiológico de los organismos de manera similar a la respuesta de otros pectínidos como *P. maximus* (Artigaud *et al.*, 2014) y *A. purpuratus* (Aguirre-Velarde *et al.*, 2016). En este estudio, la exposición a una condición TH (30 °C, 40% SatO<sub>2</sub>, 2.7 mg O<sub>2</sub> L) estimuló una disminución del  $VO_2$  de los juveniles de *N. subnodosus* en relación con los valores observados en T, pero ligeramente mayor que en el grupo control (C). Esta respuesta a una condición de hipoxia ambiental contrasta con la respuesta de moluscos bivalvos que habitan zonas intermareales como *Mytilus spp.*, la cual fue más sensible a condiciones de bajo OD en términos de disminución del  $VO_2$  (oxirregulador "pobre") que *P. maximus*, incluso a temperaturas altas (Artigaud *et al.*, 2014). Otros estudios no pudieron observar ningún efecto combinado de ambos factores estresantes sobre la respuesta de otros moluscos bivalvos como *Pinna nobilis*, tal vez debido a la tolerancia de la especie a los niveles de OD (3.1 mg O<sub>2</sub> L) utilizados en el estudio (Basso *et al.*, 2015).

Para los ectotermos acuáticos, los cambios en la temperatura y los niveles de OD de su hábitat involucran respuestas celulares y moleculares que requieren mucho tiempo para mantener la homeostasis celular (Pörtner *et al.*, 2017). En este estudio se investigaron los indicadores del metabolismo energético celular que sustentan las respuestas de los organismos a la

hipertermia aguda y los bajos niveles de OD. Entre ellos, CEA y ArgP representan señales reguladoras potentes para la activación de las respuestas metabólicas del músculo aductor durante desafíos fisiológicos (p. Ej., locomoción) o ambientales (p. Ej., temperatura elevada) (Atkinson & Walton, 1967; Sokolova, 2003; De La Fuente *et al.*, 2014). La disminución ligera en los niveles de CEA y ATP en el músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus* coincidió con el aumento de AMP, lo que indicaría una disminución moderada en la capacidad de los organismos para mantener el equilibrio energético a nivel celular bajo hipertermia aguda, especialmente cuando se combina con niveles bajos de OD. Este mayor uso de ATP fue compensado parcialmente por una disminución de ArgP, como se observó previamente en reproductores de *N. subnodosus* expuestos a condiciones similares de hipertermia (Salgado-García *et al.*, 2020). De hecho, la disminución de ATP en *N. subnodosus* entre los grupos C y T fue de alrededor de  $1.0 \mu\text{mol g}^{-1}$ , mientras que la disminución de ArgP alcanza hasta  $\geq 14 \mu\text{mol g}^{-1}$ , lo que indica que el suministro fosfo-arginina compensó en más de diez veces la disminución de ATP (Bailey *et al.*, 2003). Por lo tanto, después de 18 h a  $30^\circ\text{C}$ , el suministro de energía a través del uso de ArgP probablemente fue lo suficientemente eficiente para satisfacer la demanda de energía del músculo aductor, ya que el contenido de ArgP aún no se había agotado. Aunado a ello, una disminución insignificante de CEA (0.95 a 0.92) confirma esta hipótesis como se observó anteriormente para los reproductores (ver: Salgado-García *et al.*, 2020).

Aunado a ello, el contenido de energía (CEA y Arg-P) no fue significativamente diferente entre los juveniles expuestos a una condición T o TH. Una hipótesis preliminar sería que la exposición a una menor disponibilidad de OD bajo condiciones de hipertermia supondría una mayor demanda de energía y, por lo tanto, podríamos esperar una disminución inicial en ArgP y luego en los niveles de ATP y CEA en los tratamientos T y TH. Sin embargo, ante un ambiente limitante de oxígeno, los organismos disminuyen la síntesis y el uso de energía (ATP), disminuyendo la actividad de procesos celulares que les confieren un mayor gasto de energía (e. g. síntesis de proteínas) como una estrategia para prolongar su tiempo de tolerancia y evitar la pérdida de la homeostasis celular (Hochachka & Somero, 2002) En este sentido, aunque en este estudio solo se evaluó el contenido energético del músculo aductor de los juveniles de *N. subnodosus*, la abundancia de la subunidad A catalítica de la

ATP asa tipo V así como de la ATP sintasa mitocondrial en el manto se mostró afectada por la exposición a una temperatura elevada (T). Estas proteínas están involucradas en la respuesta celular a la fluctuación en las concentraciones de oxígeno y en la biosíntesis de ATP. Aunado a ello, otras proteínas relacionadas a la regulación positiva de las ATPasas (e. g. *Troponina T*) fueron afectadas, lo que sugiere que el estado energético de otros tejidos también es alterado por T. Este resultado, además, coincide con el inicio de la anaerobiosis (PK, ODH) y los cambios en la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo de las guaninas (GTP) observado en el manto de los organismos expuestos a TH (*ver más adelante*). Estas respuestas indican que la respuesta aerobia del manto de *N. subnodosus* es muy sensible a los cambios de temperatura y disponibilidad de oxígeno en el hábitat, y coincide con los efectos negativos de la hipoxia observados sobre la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo energético en otros moluscos como mejillones (*Mytillus spp.*) y abulones (*Haliotis spp.*) (Tomanek *et al.*, 2014; Venter *et al.*, 2018). Estudios previos sobre moluscos bivalvos expuestos a hipoxia a una temperatura específica mostraron que el metabolismo de la energía en el músculo aductor puede presentar resultados contrastantes. Una disminución en la CEA en *M. galloprovincialis* bajo anoxia (Isani *et al.* 1997), una disminución de ATP en línea con un aumento de AMP en *Patinopecten yessoensis* a bajo OD ( $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) (Enomoto *et al.*, 2000), o sin diferencia en CEA pero una disminución en ArgP en *A. irradians* con bajo OD ( $< 20 \text{ mmHg}$ , 12% Sat  $\text{O}_2$ ) (Chih & Ellington, 1983).

También se observó una acumulación triple de IMP y aumento de HX en el músculo aductor de juveniles de *N. subnodosus* expuestos a TH. Además, IMP fue el único afectado por el tratamiento con TH en comparación con los niveles en los juveniles del grupo T. También se encontraron cambios en la dinámica del metabolismo energético afectado por temperaturas elevadas caracterizadas por una acumulación de IMP y HX en el músculo aductor de los reproductores expuestos a retos de hipertermia similares (Salgado-García *et al.*, 2020). En contraste, los ostiones expuestos al aire a  $15^\circ \text{C}$  durante dos días no mostraron cambios en los niveles de IMP y HX en el músculo aductor (Kawabe *et al.*, 2010). Es interesante, que al igual que en el músculo aductor, en el manto de los juveniles de *N. subnodosus*, el catabolismo de guanosina y xantina, así como de purinas también resultaran afectadas por la exposición a temperaturas elevadas. Aunque se requieren más estudios para evaluar la

dinámica y la implicación del metabolismo y la degradación de los nucleótidos en especies intermareales y submareales que enfrentan limitaciones ambientales similares, los resultados actuales y los encontrados en reproductores (Salgado-García *et al.*, 2020) van de la mano con una señal de condiciones de estrés bajo hipertermia aguda y bajos niveles de oxígeno. Si bien se necesitan más estudios para evaluar la  $PcO_2$  de *N. subnodosus* y sus respuestas metabólicas particulares alrededor de dicho  $PcO_2$  a temperatura elevada cercana al límite superior crítico ( $LT_{50}$ ), parece que el OCLTT no se aplicó directamente con respecto al estado de la energía (CEA y ArgP) durante la exposición aguda a TH, así como otros mecanismos fisiológicos vinculados a la exposición crónica a hipertermia y bajos niveles de OD (Peruzza *et al.*, 2017). Lo que indica que se requiere evaluar las respuestas metabólicas de *N. subnodosus* considerando un tiempo de exposición más prolongado a condiciones de hipoxia moderada probadas en este trabajo, dado que la intensidad y el tiempo de exposición pueden determinar en gran medida la tolerancia de los organismos a una condición ambiental subóptima (Peck *et al.* 2009; Angilleta, 2009; Angilleta *et al.*, 2019).

En este estudio se evaluó si los ajustes en la actividad y el contenido de las enzimas metabólicas clave involucradas en el metabolismo aeróbico y anaeróbico se relacionaron con el contenido de energía en juveniles de *N. subnodosus* expuestos a desafíos de T y TH. La relación CCO / CS es un buen indicador de la actividad mitocondrial y, por lo tanto, de los medios de producción de ATP dependientes de  $O_2$  en los tejidos (Boutilier & St-Pierre, 2002; Dudognon *et al.*, 2015). La diferencia leve pero no significativa de las relaciones CCO / CS en el músculo aductor de los juveniles confirma que el metabolismo aeróbico mitocondrial no se vio afectado bajo una hipertermia aguda (T) o cuando los bajos niveles de OD se combinaron con la hipertermia (TH). Se encontró una ausencia similar de cambios compensatorios en las actividades mitocondriales en el músculo aductor de los reproductores expuestos a condiciones de hipertermia similares (Salgado-García *et al.*, 2020). La actividad de CCO no mostró diferencias en el manto, pero la actividad de CS fue significativamente menor en TH en comparación con el grupo T. Los niveles más bajos de CS pueden indicar que la abundancia mitocondrial ya comenzó a disminuir en el manto solo después de 18 horas de exposición a bajos niveles de OD (Mantle *et al.* 2010) lo que sugiere el surgimiento de primeros signos de compensación en las vías de energía aeróbica en el manto, y más

específicamente en el nivel de abundancia mitocondrial. Esta respuesta coincide con disminución en la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo de la energía (ATP) y en la respuesta a los niveles de oxígeno en el manto de los juveniles (*V-type proton ATPase catalytic subunit A*) así como de proteínas involucradas en la reparación de las proteínas para mantener la homeostasis celular (*proteasome subunit beta type-1* y *proteasome subunit beta type-1-like*) durante la exposición a TH. Tales resultados corroborarían los cambios en el metabolismo de la energía mitocondrial que se encuentran en las especies de pectínidos (*P. maximus*) de las zonas templadas en respuesta al calentamiento agudo y la exposición adicional a la hipoxia (Gotze *et al.* 2020) y refuerzan la hipótesis de que el proteoma de los tejidos de moluscos bivalvos como *P. maximus* son indicadores de la tolerancia de los organismos a cambios ambientales como la hipertermia y la baja disponibilidad de oxígeno (Artigaud *et al.*, 2015).

Mientras que las vías enzimáticas aerobias para la producción de ATP no parecen ser afectadas por el desafío de la temperatura bajo normoxia, la hipótesis OCLTT sugiere una regulación al alza del metabolismo anaeróbico en individuos expuestos a temperaturas cercanas a CTmax (Verbeck *et al.* 2016; Portner *et al.*, 2017) Elegimos evaluar las actividades de HK, PK, ODH y AK como representantes de la producción de energía anaeróbica (glucolítica) o independiente de O<sub>2</sub> (AK) (Wongso *et al.*, 1999; Artigaud *et al.*, 2015, Saborowski & Buchholz, 2002;). Del mismo modo, ni PK ni ODH o AK mostraron diferencias significativas en ambos tejidos. Solo la ODH se encontró regulada por disminución (no significativa) en el músculo aductor. Mientras que la actividad glucolítica (HK) se estimuló en reproductores expuestos a un reto de hipertermia similar (Salgado-García *et al.*, 2020), los resultados actuales sugieren que las vías glucolíticas no se estimulan en juveniles en condiciones de laboratorio. De la misma manera que para el VO<sub>2</sub>, tales diferencias también podrían explicarse por respuestas compensatorias a la alta demanda de energía para procesos fisiológicos, pero también por respuestas adaptativas a la variabilidad ambiental de la zona geográfica (*ver antes*). Solo AK mostró un aumento no significativo en su actividad en el músculo que coincide con la disminución significativa del contenido de ArgP. De acuerdo con la hipótesis OCLTT, esta respuesta podría sugerir que los juveniles

tenderían a utilizar preferentemente esta producción de energía independiente del O<sub>2</sub> para enfrentar la demanda de energía bajo desafío térmico (Smith & Morrison, 1969).

En el manto de los juveniles expuestos a TH, se observó que el incremento de la actividad de HK mantiene el flujo de energía hacia las rutas anaerobias, caracterizado por una disminución en la actividad del ciclo de Krebs (CS) y de la actividad de PK, y el ODH. La disminución de ArgP (50%) en el músculo aductor en T y TH, así como una disminución de ODH en el manto, sugieren un posible efecto de estos cambios ambientales sobre el pool de arginina, como se ha documentado en *P. maximus* expuesto a condiciones de hipoxia (Artigaud *et al.*, 2015). Estos cambios en el metabolismo del piruvato, así como el VO<sub>2</sub> reducido de juveniles de *N. subnodosus* en condiciones de TH durante 18 h, podrían sugerir una reducción controlada de los procesos que demandan energía para mantener el equilibrio energético (Strahl *et al.*, 2011; Trueblood & Seibel *et al.*, 2014). Otra hipótesis podría ser que los primeros signos de una disfunción metabólica bajo suministro limitado de oxígeno a temperaturas elevadas se observaron en los juveniles como se observó en *P. maximus* expuesta a hipoxia severa a una temperatura superior a la ventana térmica (25 °C) (Artigaud *et al.*, 2015). De hecho, con base a los estudios sobre tolerancia térmica de las poblaciones de *N. subnodosus* de Baja California Sur, cuya temperatura letal (96 h-LD<sub>50</sub>) es alrededor de a 32 ° C (González-Estrada, 2003), estas respuestas pueden resaltar que *N. subnodosus* es más sensible a la hipoxia que otros bivalvos intermareales y puede ser más vulnerable y menos adaptado para responder a la hipoxia bajo una condición de estrés adicional (Gotze *et al.*, 2020).

De los cambios observados en la abundancia de 54 proteínas del manto de los juveniles de *N. subnodosus*, se encontraron proteínas que participan en el metabolismo de la energía, la organización del citoesqueleto y la apoptosis, que coinciden con las funciones del proteoma que han sido relacionadas a la respuesta a la hipertermia en varios moluscos bivalvos (Fields *et al.*, 2012; Tomanek *et al.*, 2014; Verter *et al.*, 2018). Es interesante que varias proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto (*calponina*, *tropininas*, *proteínas tipo PDZ* y *septinas*) resultaron afectadas por la hipertermia (T), lo que sugiere que posiblemente la interacción entre las enzimas citosólicas y los sustratos y cofactores que participan en una respuesta metabólica específica podrían resultar afectados a medida que avanza el tiempo de

exposición (Fields *et al.*, 2012), mientras que la abundancia de dos proteínas (*proteasome subunit beta type-1* y *proteasome subunit beta type-1-like*) involucradas en la reparación de las proteínas dependientes de ATP y ubiquitina, lo que sugiere una pérdida eventual de la homeostasis proteica en el manto de los juveniles expuestos a TH (Zippay & Helmuth, 2012). En otras especies como *P. maximus*, la respuesta a hipertermia combinada con hipoxia estuvo relacionada a cambios en la abundancia de proteínas como la CK2 (*protein kinase CK2 alpha catalytic subunit*) que ha sido relacionada a la actividad del factor inducible por hipoxia HIF-1 (e. g. HIF-1, *Hypoxia Inducible Factor-1*) (Artigaud *et al.*, 2015), mientras que en el manto de *N. subnodosus*, se encontraron proteínas directamente involucradas con la respuesta a los niveles de oxígeno intracelular (subunidad A catalítica de la ATP asa). Esta respuesta podría confirmar que los tejidos de *N. subnodosus* responden de manera específica a un mismo estímulo ambiental, ayudando a identificar la tolerancia de esta especie a los cambios ambientales en su hábitat.

### **Conclusión**

Los juveniles de *N. subnodosus* responden rápidamente a la condición TH activando respuestas de tolerancia pasiva ( $VO_2$  reducido) mientras que el contenido de energía (CEA) del músculo aductor se mantuvo por completo por hidrólisis de ArgP. Una respuesta hipometabólica al nivel fisiológico fue seguida de cerca por el inicio del metabolismo anaeróbico y los cambios en la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo de energía y la organización del citoesqueleto en el manto, lo que subraya el papel de este tejido en las respuestas de los organismos a los cambios ambientales. Sin embargo, los procesos de alta demanda de energía, como la biogénesis mitocondrial (CCO / CS), solo exhiben ajustes iniciales, probablemente como una respuesta adaptativa de los animales para futuros desafíos de temperatura elevada y baja disponibilidad de oxígeno disuelto (TH).

## CAPÍTULO 3

---

### **Respuestas metabólicas de adultos de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones de hipertermia aguda y esfuerzo reproductivo**

#### ***Resumen***

En ectotermos marinos, la reproducción es un proceso energéticamente costoso que afecta su tolerancia a la temperatura. Para la mayoría de las especies, los impactos de la hipertermia durante la gametogénesis todavía se desconocen. Nuestro objetivo fue evaluar la respuesta metabólica de los adultos de *N. subnodosus* expuestos a desafíos térmicos en el desarrollo temprano (primavera) y maduración avanzada de gónadas (verano). Los organismos recolectados en ambas estaciones fueron expuestos a hipertermia aguda (26 y 30 °C, 24 h), o a temperatura de aclimatación (22 °C) como condición de control. Los niveles de fosfo-arginina (ArgP) fueron mayores en los organismos colectados en verano. La hipertermia (30 °C) estimuló un aumento del gasto de energía reflejado por un aumento transitorio en el consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>) y actividades de HK y arginina quinasa (AK) relativamente más altas. Además, una ligera disminución en la carga de energía adenílica (CEA) fue parcialmente compensada por una disminución en ArgP. Un aumento en los subproductos de nucleótidos como el monofosfato de inosina (IMP) y la hipoxantina (HX) indicaron un estrés térmico a 30 °C. Las respuestas a la hipertermia aguda fueron más pronunciadas en las etapas avanzadas de maduración (verano), lo que indica una posible falta de equilibrio energético, con posibles implicaciones en animales que enfrenten escenarios de hipertermia en su hábitat.

**Palabras clave:** tolerancia, supervivencia, hábitat, reproducción.

## ***Introducción***

Con el aumento continuo de las temperaturas oceánicas globales y la variabilidad creciente de las temperaturas del agua de mar, la capacidad de adquirir (ventilación) y suministrar (circulación) oxígeno a los tejidos puede limitar las actividades fisiológicas y capacidades de ectotermos. La reproducción es un proceso energéticamente costoso que puede afectar la tolerancia térmica de los organismos (IPCC, 2014; Payne *et al.*, 2016). Los estudios de tolerancia térmica se han realizado generalmente en juveniles, con pocos estudios que evalúen los impactos de la hipertermia en las respuestas metabólicas de los adultos durante los períodos de alto esfuerzo reproductivo (Pörtner & Farrell, 2008). En los pectínidos, el crecimiento de las gónadas depende con frecuencia, pero no siempre, de la movilización de reservas de energía desde músculo aductor, en línea con la estrategia reproductiva de la especie, así como en condiciones ambientales particulares (Barber & Blake, 2006; Yee-Duarte *et al.*, 2009). El desarrollo de gónadas puede incluso afectar la funcionalidad del tejido, como lo demuestra la reducción de la energía muscular relacionada al nivel de actividad (Brokordt *et al.*, 2000; Phillip *et al.*, 2008; Kraffe *et al.*, 2008), así como cambios en la cinética de las enzimas metabólicas (Phillip *et al.*, 2008; Kraffe *et al.*, 2008; Guderley & Tremblay, 2016).

Los moluscos usan varias estrategias para tolerar o compensar los cambios en el ambiente, entre ellas, el uso de fosfágenos y rutas anaerobias cuando la demanda de energía supera la capacidad aerobia de los organismos para suministrar el oxígeno a las mitocondrias (Pörtner *et al.*, 1999). En los pectínidos, una disminución del metabolismo aerobio afecta primero a los tejidos más activos como la glándula digestiva y el músculo aductor (Venter *et al.*, 2018). En los organismos adultos, tanto la reproducción como la exposición a hipertermia pueden afectar la capacidad de respuesta del músculo aductor, por lo que se espera que el efecto sinérgico entre estos dos factores tenga una influencia significativa sobre la tolerancia térmica de los organismos. En varias especies de moluscos bivalvos, los eventos de mortalidad masiva ocurren en el verano, cuando la temperatura alcanza valores cercanos al límite de tolerancia de las especies, afectando principalmente a los organismos maduros o en estado de post-desove, en los que la alta demanda energética asociado a estos eventos reproductivos puede causar una condición de estrés metabólico que reduce la capacidad de respuestas de los organismos a los cambios en el ambiente (Lambert *et al.*, 2008). Sin embargo, los eventos

de mortalidad masiva resultan de la interacción de varios factores bióticos y abióticos, entre los cuales se incluyen la presencia de patógenos, hipertermia, hipoxia y el esfuerzo reproductivo (Harshman & Zera, 2007). La exposición a temperaturas elevadas puede ser benéfica para la estimulación a la maduración o al desove, la exposición a temperaturas elevadas también puede causar depresión metabólica y reducir la respuesta inmunológica (Harshman & Zera, 2007; Petes *et al.*, 2008) así como inhibir la gametogénesis, reducir la calidad de los gametos, y causa la reabsorción de los gametos y la disrupción de la periodicidad de los desoves (Riascos, 2006). Aunado a ello, se ha observado un aumento en los eventos de mortalidad en verano en cultivos poblaciones de *N. subnodosus* (Koch *et al.*, 2005) posiblemente asociadas a la interacción de factores endógenos (p. ej., esfuerzo reproductivo) o exógenas (p. ej., hipertermia, hipoxia, disponibilidad de alimentos y patógenos) que no han sido investigados. La tolerancia térmica de los juveniles ya ha sido investigada, con una temperatura letal de 32 °C (González-Estrada, 2003), pero no hay estudios sobre los efectos de la alta temperatura en combinación con una respuesta fisiológica específica como el esfuerzo reproductivo de los organismos adultos. La hipótesis de este trabajo es que los adultos de *N. subnodosus* experimentan restricciones metabólicas severas durante los períodos de mayor esfuerzo reproductivo, limitando su capacidad para responder a condiciones de hipertermia. El objetivo de este estudio fue evaluar las respuestas metabólicas de los reproductores de Bahía Magdalena, B. C. S. después de haber sido expuestos a retos realistas de hipertermia aguda durante etapas tempranas (primavera) y avanzadas (verano) de desarrollo gonádico. Para ello, los reproductores fueron colectados de un sistema de cultivo en Baja California Sur en dos períodos del año que muestran dos etapas distintas de desarrollo de gónadas y luego fueron expuestos a diferentes retos térmicos agudos (22, 26 y 30 ° C) durante 24 h. El consumo de oxígeno se midió como un indicador de la capacidad aerobia de los organismos, examinando las respuestas metabólicas del músculo aductor y el manto, en términos del estado de energía celular y actividades enzimáticas.

## ***Materiales y Métodos***

### ***Sitio de colecta***

Ver Sección 6.2 *Monitoreo de variables ambientales*.

### ***Colecta de organismos***

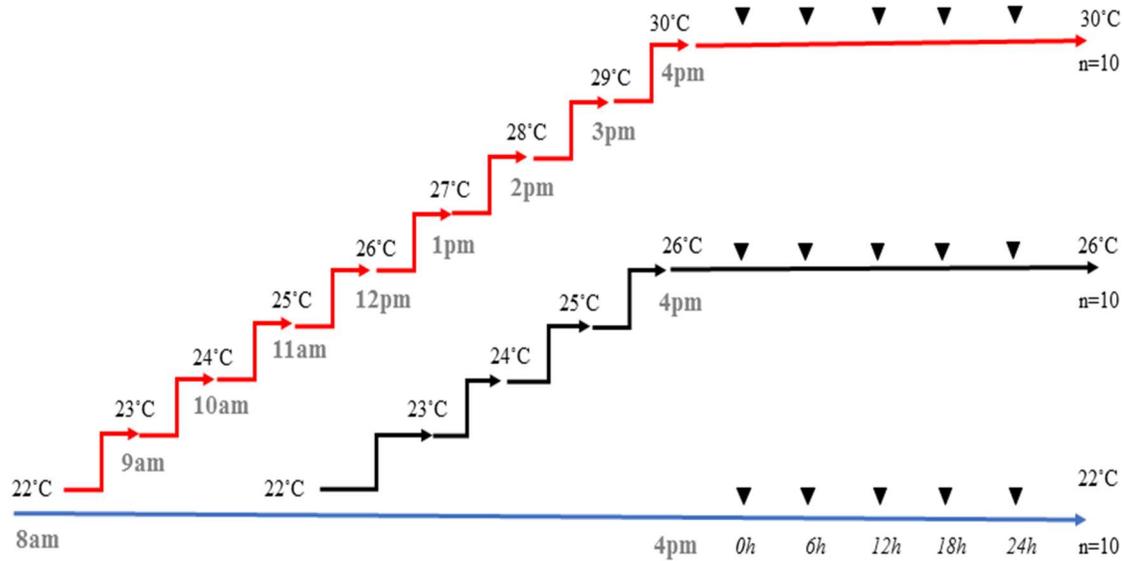
Ver sección de *Materiales y Métodos* del Capítulo 1 de este trabajo de investigación.

### ***Diseño experimental y medición del consumo de oxígeno***

El diseño experimental consistió en tres escenarios térmicos para primavera (21 mayo 2016) y verano (6 julio 2016)

4. **control:** 22°C
5. **intermedia:** 26°C
6. **hipertermia:**30°C

Para los bioensayos realizados en adultos durante la primavera y el verano, los escenarios térmicos se diseñaron basados en la temperatura óptima para el crecimiento de los juveniles (22 °C), similar a la temperatura media registrada en el sitio de colecta entre el 04 de abril y el 31 de mayo 2016 ( $22.3 \pm 1.7$  °C) y el 01 de junio y el 07 de julio 2016 ( $23.6 \pm 2.6$  °C), así como la temperatura máxima reportada en la zona de cultivo (30 °C) durante la última década (2006-2016) de acuerdo a la base de datos pública de la NOAA, sin superar el límite superior térmico letal reportado para juveniles de la especie (32 °C) (González-Estrada, 2003). La temperatura intermedia de 26 °C fue seleccionada con el fin de evaluar posibles respuestas fisiológicas en un escenario más común de variación térmica en el hábitat natural durante un ciclo circadiano una semana antes de la colecta de los organismos para la primavera (19.9 a 25.1°C) y el verano (20.0 a 27.8°C), respectivamente (Fig.36).



**FIGURA 36.** Diseño experimental de los retos térmicos agudos (22, 26 y 30 °C) de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* durante la primavera y verano. Los símbolos negros (▼) representan la medición del consumo de oxígeno de los organismos ( $VO_2$ ) a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de exposición a cada temperatura experimental, el tiempo *ctrl* se refiere al consumo de oxígeno de organismos antes de iniciar el experimento (22 °C). N=10 en cada grupo.

Los organismos se dividieron de manera aleatoria en tres grupos experimentales (22, 26 y 30 °C), para ser colocados de manera individual en cámaras de respiración (0.45 L) cerradas de manera hermética y conectadas a un sistema de flujo continuo ( $60 \text{ ml min}^{-1}$ ) de agua marina aireada a la temperatura de aclimatación ( $22 \pm 0.5 \text{ °C}$ ). Los organismos fueron ayunados durante 12 horas previo al inicio de la etapa experimental. Al día siguiente, se inició el incremento gradual de la temperatura ( $1 \text{ °C h}^{-1}$ ) a partir de la temperatura de aclimatación (22 °C) hasta la temperatura experimental (26 o 30 °C) que se mantuvo constante durante 24 horas. La temperatura del sistema experimental se registró de manera continua con un sensor (Onset UA-002-64, Estados Unidos), manteniendo un nivel de oxígeno disuelto superior al 70%  $\text{SatO}_2$  (Microx TX2, Presens, Alemania) en todos los experimentos.

#### ***Colecta de tejidos y análisis de desarrollo gonádico***

Ver sección de *Materiales y Métodos* del Capítulo 1 de este trabajo de investigación.

### ***Extracción y cuantificación de metabolitos***

Ver sección de *Materiales y Métodos* del Capítulo 1 de este trabajo de investigación.

### ***Actividad de enzimas metabólicas***

Ver sección de *Materiales y Métodos* del Capítulo 1 de este trabajo de investigación.

### ***Análisis estadístico***

Todas las variables fueron analizadas para su normalidad y homocedasticidad usando pruebas de Bartlett y Levene, respectivamente. Se utilizaron transformaciones arco seno y logaritmo cuando fue necesario para cumplir con los supuestos. Un análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas se utilizó para evaluar el efecto de las condiciones experimentales (entre sujetos) a lo largo del tiempo (en los sujetos) sobre el consumo de oxígeno de los organismos para cada estación (primavera, verano). Una prueba de Bonferroni fue aplicada para la comparación de las medias de cada grupo usando los valores de consumo de oxígeno antes de iniciar cada experimento (control). Un análisis de varianza de dos vías (ANOVA-2) fue utilizado para evaluar el efecto de la estación (primavera, verano) y la temperatura (22, 26 y 30 °C) sobre las variables metabólicas analizadas en el músculo aductor y el manto de los reproductores. Las diferencias entre las medias se establecieron con análisis post-hoc (Tukey) considerando como un efecto estadístico significativo un valor de  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis de varianza y student se realizaron en el programa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, Okland, Estados Unidos). Todos los gráficos se editaron con Graphpad 8.3.1 para Windows (GraphPad, La Jolla, California).

## ***Resultados***

### ***Tamaño e Índices morfométricos***

Un incremento en el tamaño de las gónadas (IGS, IMG) y un desarrollo gonadal más avanzado fueron observados en los reproductores colectados en verano, coincidiendo con estudios previos que analizaron el ciclo gonádico de *N. subnodosus* en Bahía Magdalena y la laguna Ojo de Liebre en la Península de Baja California (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004) como se describió previamente en el Capítulo 1 (Fig. 18). El tamaño

de las gónadas fue significativamente más alto en los organismos colectados en el verano (IGS:  $11.2 \pm 0.9$ , IMG:  $4.5 \pm 0.3$ ) que en primavera (IGS:  $7.6 \pm 0.5$ ; IMG:  $3.0 \pm 0.2$ ). Se observó un mayor tamaño del músculo aductor (IMA) en los organismos expuestos a una temperatura alta ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) comparado con otras temperaturas ( $22$  y  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), independientemente de la estación (Tabla IV).

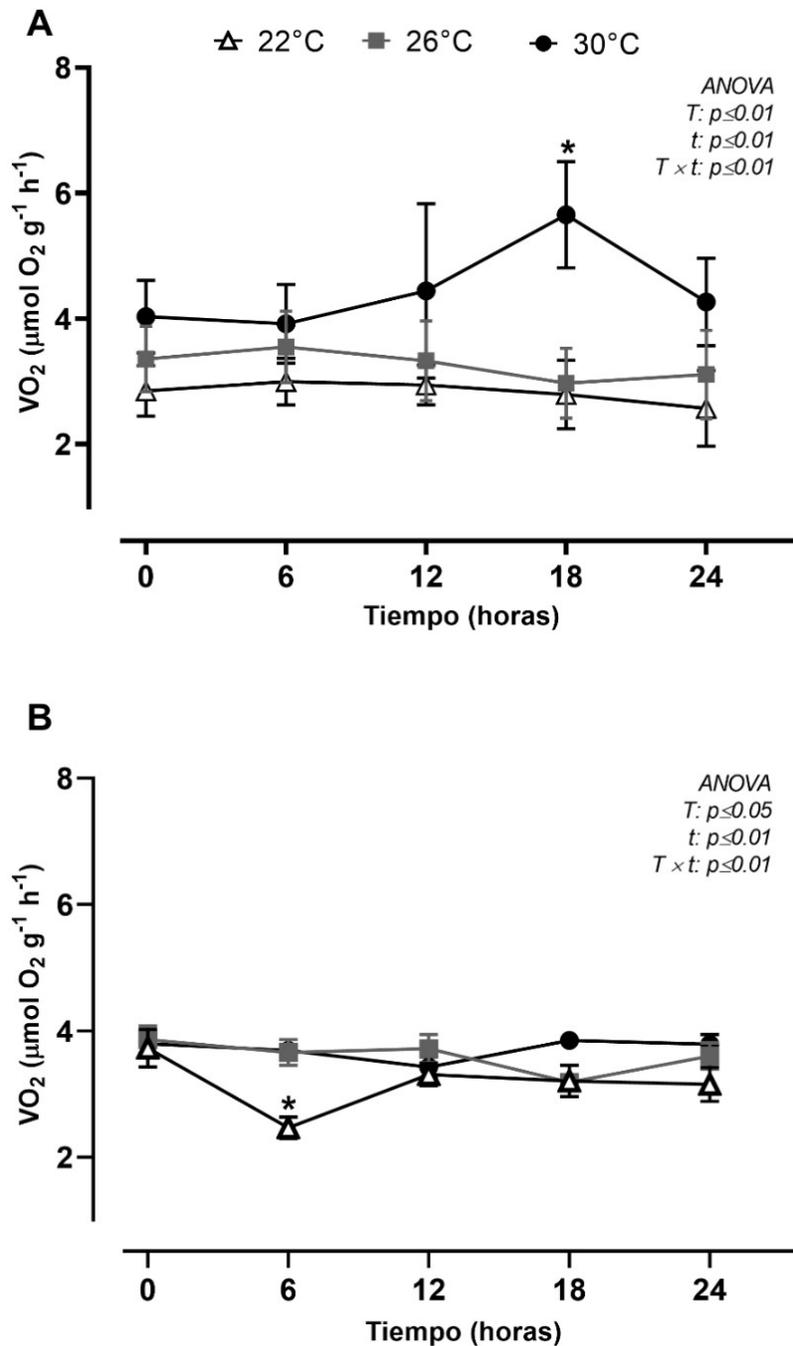
**Tabla IV.** Variables biométricas de los reproductores de la mano de león *N. subnodosus* expuestos a temperatura control ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y dos condiciones de hipertermia aguda ( $26$  y  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de manera independiente durante estadios de desarrollo inicial (primavera) y desarrollo avanzado (verano) de maduración de las gónadas.

Variables	Primavera			Verano			E	T	E x T
	22 °C	26 °C	30 °C	22 °C	26 °C	30 °C			
Peso húmedo de tejidos (g)	45.0 $\pm 2.9$	42.8 $\pm 2.4$	43.1 $\pm 3.8$	48.7 $\pm 4.7$	42.4 $\pm 2.6$	48.5 $\pm 3.4$	NS	NS	NS
Longitud de valvas (mm)	79.5 $\pm 2.7$	79.8 $\pm 2.3$	78.4 $\pm 2.3$	77.0 $\pm 2.1$	73.0 $\pm 1.7$	77.6 $\pm 2.1$	NS	NS	NS
Altura de valvas (mm)	79.0 $\pm 2.2$	76.6 $\pm 1.9$	78.5 $\pm 1.9$	77.4 $\pm 2.3$	75.6 $\pm 1.4$	78.8 $\pm 2.0$	NS	NS	NS
Índice de Condición (IC, %)	68.3 $\pm 6.8$	66.5 $\pm 2.3$	59.3 $\pm 2.5$	67.4 $\pm 2.6$	66.5 $\pm 2.3$	65.2 $\pm 2.1$	NS	NS	NS
Índice del Músculo Aductor (IMA, %)	38.1 $\pm 1.0$	36.9 $\pm 9.0$	39.7 $\pm 0.8$	36.2 $\pm 0.7$	37.1 $\pm 0.6$	38.6 $\pm 0.8$	NS	$p < 0.01$	NS
Índice Gonadosomático (IGS, %)	6.0 $\pm 0.6$	8.0 $\pm 1.2$	8.1 $\pm 1.0$	10.3 $\pm 1.1$	11.1 $\pm 1.5$	12.1 $\pm 2.0$	$p < 0.05$	NS	NS
Índice de Masa Gonadal (IMG)	2.5 $\pm 0.3$	3.3 $\pm 0.4$	3.3 $\pm 0.04$	4.4 $\pm 0.4$	4.3 $\pm 0.6$	3.3 $\pm 0.8$	$p < 0.05$	NS	NS

Los datos expresan el valor de la media  $\pm$  error estándar de la media. Los resultados del ANOVA de dos vías entre las estaciones (E) y las temperaturas (T) se muestra en las últimas columnas (NS: no significativo).

### Consumo de oxígeno

Durante la primavera, los reproductores expuestos a  $22$  y  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  mantuvieron un consumo de oxígeno estable ( $\text{VO}_2$ ,  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), mientras que los animales expuestos a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  presentaron un incremento de su  $\text{VO}_2$  con valores máximos a las 18 horas de exposición, seguido por un regreso a sus valores basales a las 24 horas de exposición a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fig. 37A). En el verano, el  $\text{VO}_2$  de los organismos se mantuvo estable hasta el final de la exposición a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , excepto por una disminución a las 6 horas de exposición en el grupo de organismos control ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Fig. 37B).



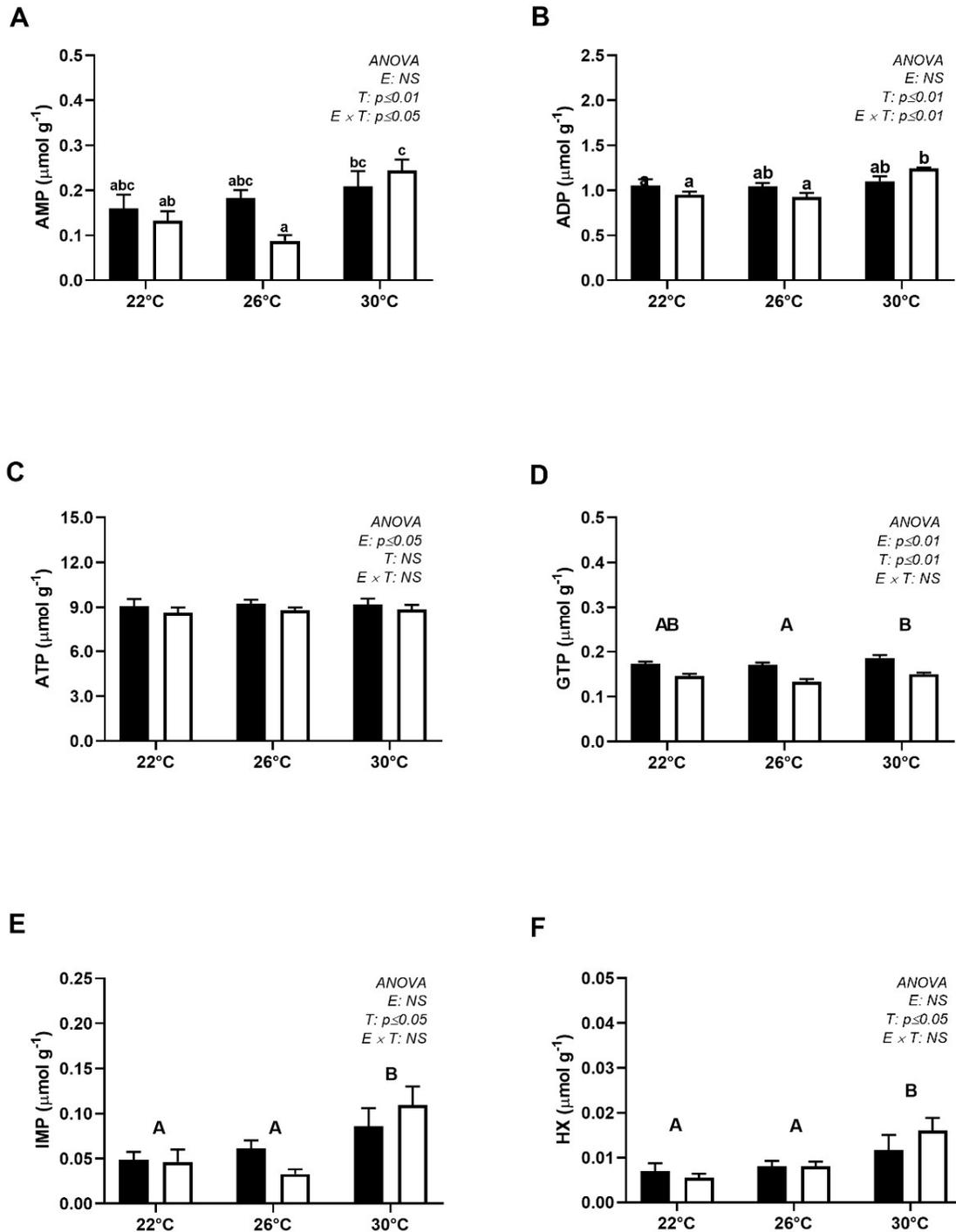
**FIGURA 37.** Consumo de oxígeno de los reproductores de *N. subnodosus* ( $\text{VO}_2$ ,  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) expuestos a retos térmicos (22, 26 and 30 °C) en primavera (A) y verano (B). Los asteriscos representan una interacción significativa entre las condiciones térmicas (T) y el tiempo de exposición (t) (0, 6, 12, 18 y 24 h). ANOVA de mediciones repetidas, prueba de Bonferroni  $p < 0.05$ . T: temperatura. t: tiempo. N=10por grupo. (\*) indica una diferencia significativa en relación con los demás tratamientos y/o tiempos de muestreo. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Composición de Nucleótidos***

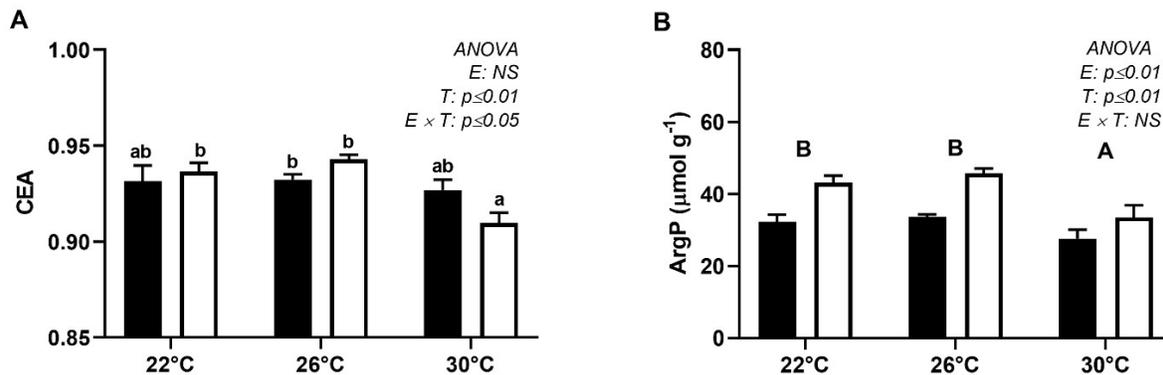
El contenido de AMP, ADP, IMP y HX en el músculo aductor incrementaron en los reproductores expuestos a una temperatura elevada (30 °C), aunque el efecto sobre los niveles AMP y ADP sólo fue observado durante el verano, mostrando una interacción significativa (Figs. 38A-F). La concentración de ATP no fue afectada por la temperatura, mientras que el contenido de GTP fue significativamente menor en el músculo de los organismos expuestos a 26 °C en relación con los valores observados a 30 °C (Figs. 38C- D).

### ***Carga energética adenilica y contenido de ArgP***

Los reproductores colectados durante el verano mostraron una disminución significativa en el valor de CEA en relación con los niveles observados en los organismos mantenidos a 22 y 26 °C, respectivamente (Fig. 39A). Los niveles de ArgP fueron significativamente más altos en los organismos colectados en el verano. Adicionalmente, la exposición a una temperatura elevada (30 °C) estimuló una disminución significativa en el nivel de ArgP en el músculo aductor particularmente en los reproductores colectados en el verano. Durante la primavera, el nivel de ArgP disminuyó de  $32.3 \pm 2.0$  y  $33.6 \pm 0.7$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  a 22 °C y 26 °C a  $27.6 \pm 2.5$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  a 30 °C. En verano, el contenido de ArgP disminuyó de  $43.2 \pm 1.9$  y  $45.7 \pm 1.3$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  a 22 °C y 26 °C a  $33.5 \pm 3.4$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  a 30 °C (Fig. 39B).



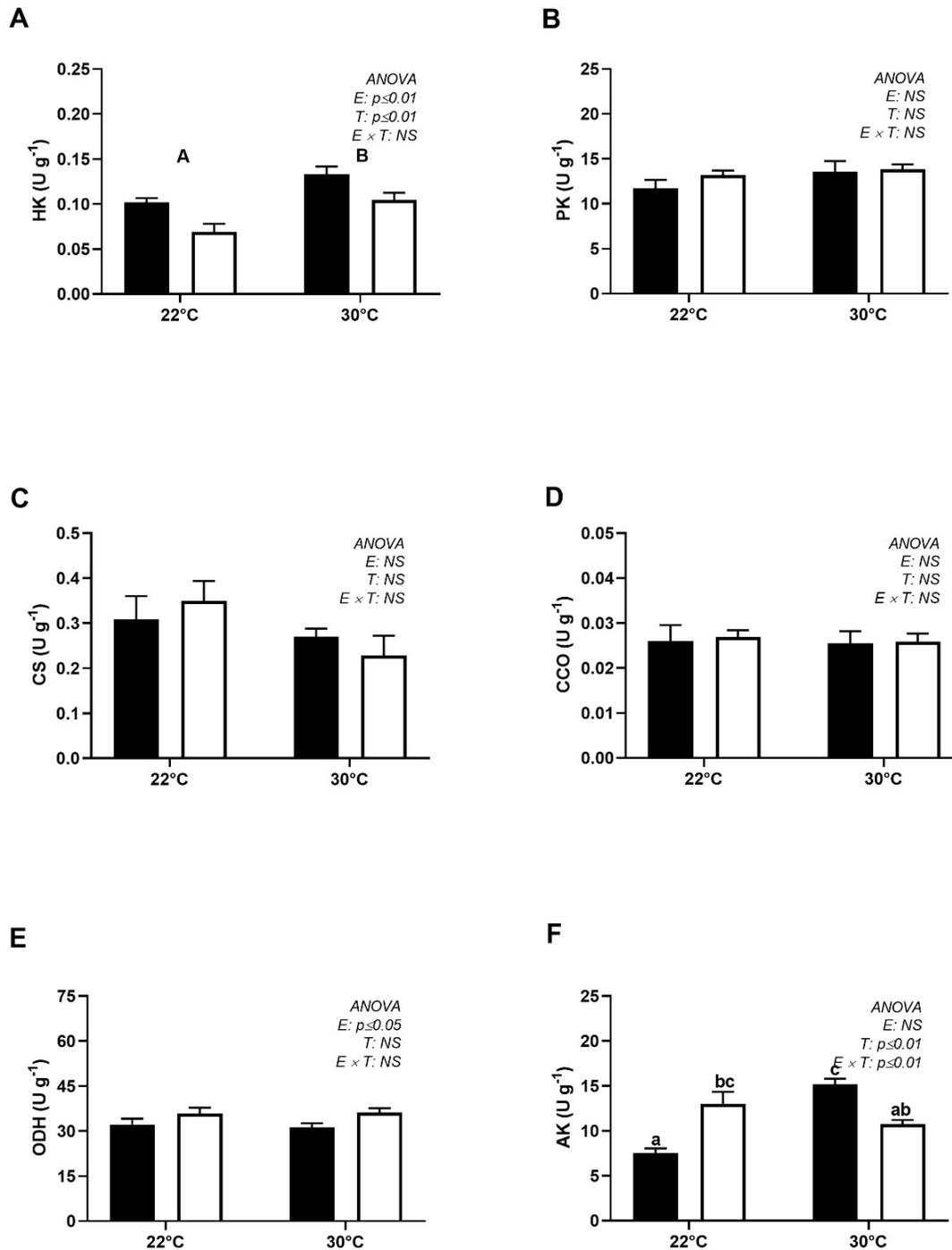
**FIGURA 38.** Composición de nucleótidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) del músculo aductor de reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a retos térmicos agudos (22, 26 y 30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). **A.** Adenosina monofosfato, AMP, **B.** Adenosina difosfato, ADP. **C.** Adenosina trifosfato, ATP). **D.** Guanosina trifosfato, GTP. **E.** Ionosina monofosfato, IMP. **F.** Hipoxantina, HX. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media.



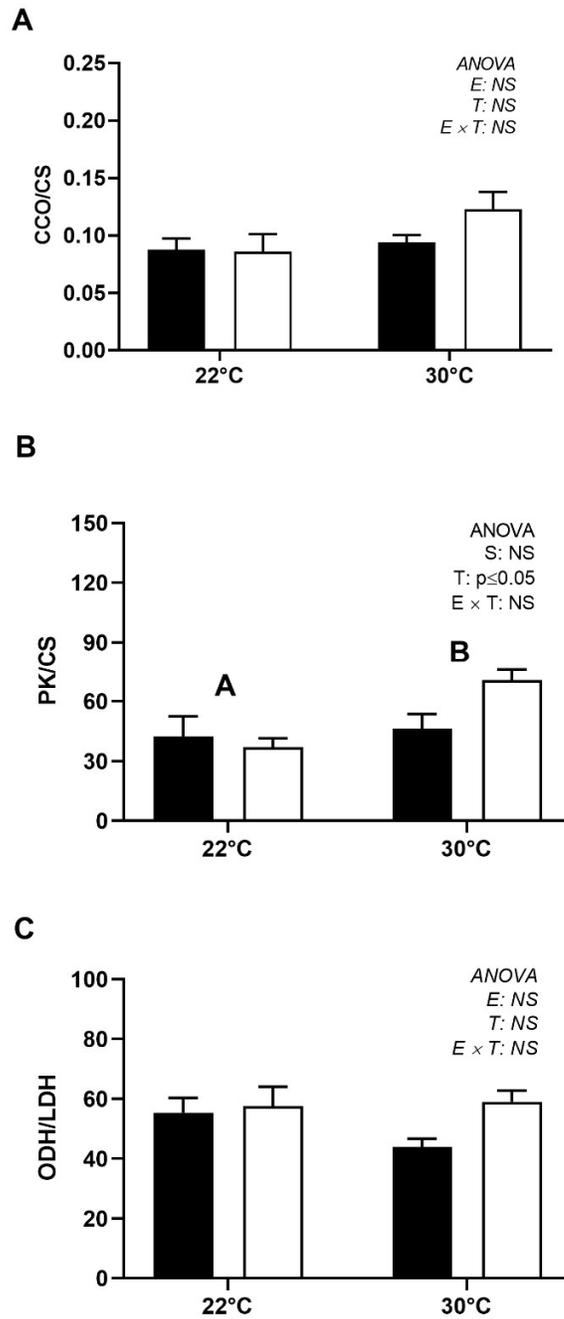
**FIGURA 39.** Carga energética adenilica (CEA) y contenido de fosfo-arginina (ArgP,  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a retos térmicos (22, 26 y 30 °C) durante la primavera (negro) y el verano (blanco). ANOVA 2 vías, Tukey,  $p \leq 0.05$ . E: Estación T: temperatura. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media.

#### ***Enzimas metabólicas en el músculo aductor***

La actividad de la HK en el músculo aductor de los reproductores de *N. subnodosus* durante la primavera fue significativamente mayor que en el verano, con un incremento durante la exposición a 30 °C en ambas estaciones (Fig. 40A). La actividad de la PK fue similar entre temperaturas y estaciones (Fig. 40B), mientras que la actividad de CS presentó una ligera y no significativa disminución a 30 °C (Fig. 40C), resultado en un incremento del radio PK/CS en los animales expuestos a hipertermia (30 °C), especialmente durante la primavera (Fig. 41B). La actividad de la CCO (Fig. 40D) y la relación CCO/CS no fueron afectados por el reto térmico (Fig. 41A). La actividad de la ODH fue 50 veces más alta que la actividad de la LDH en el músculo aductor de *N. subnodosus*. La LDH presentó una actividad similar en ambas estaciones y en todas las temperaturas ( $0.66 \pm 0.02 \text{ U g}^{-1}$ ) (datos no mostrados en Fig. 40), con un aumento en la actividad de ODH en el verano con relación a los valores observados en primavera (Fig. 40E); sin afectar la relación ODH/LDH (Fig. 41C). Finalmente, la actividad de la AK mostró una marcada sensibilidad estacional a la temperatura, incrementando 42% durante la primavera en los organismos expuestos a hipertermia (30 °C), y disminuyendo 17% su actividad en los organismos expuestos a la misma temperatura durante el verano (Fig. 40F).



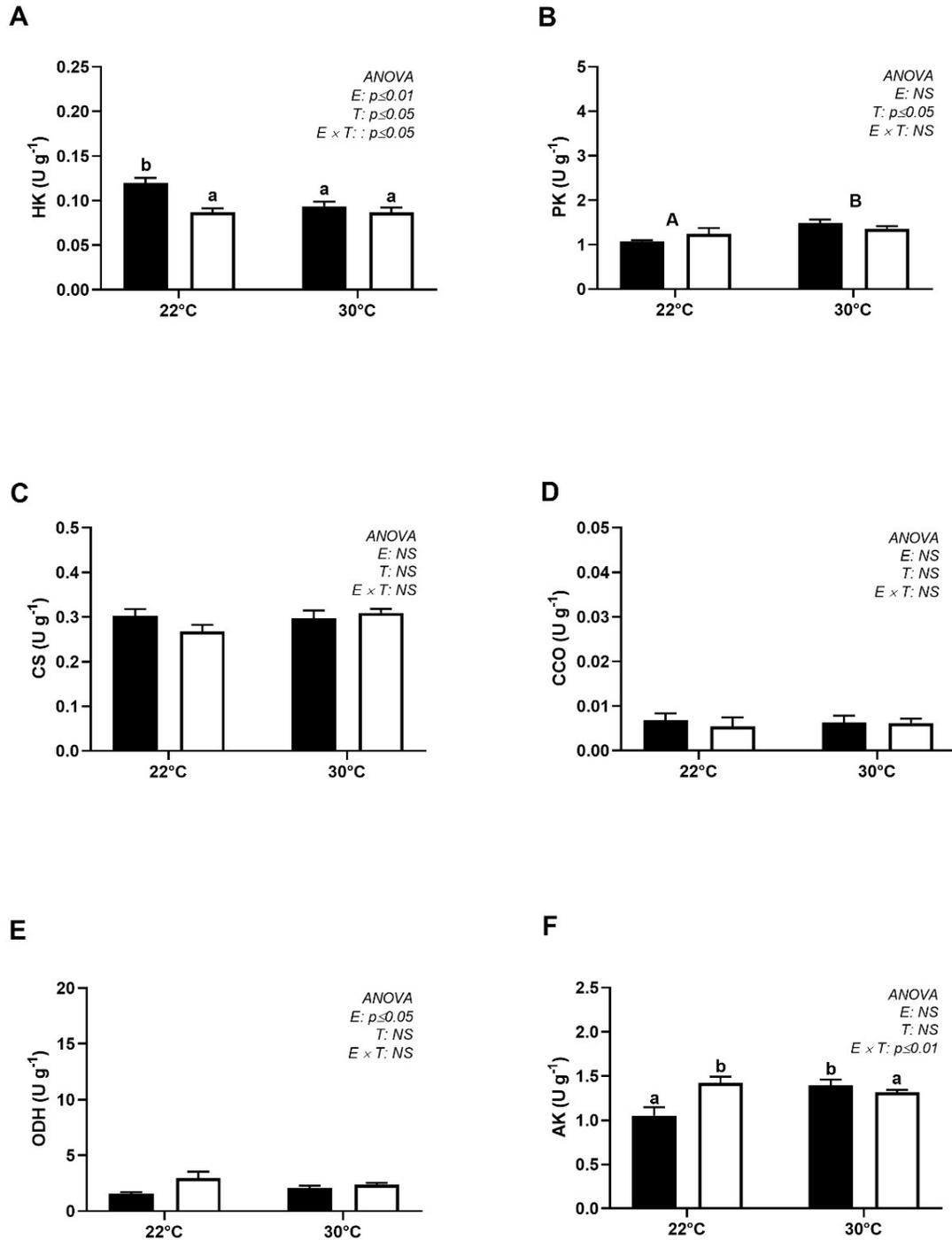
**FIGURA 40.** Actividades de enzimas aerobias y anaerobias (U g<sup>-1</sup>) en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control (22 °C) e hipertermia aguda (30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). **A.** Actividad de hexoquinasa, HK. **B.** Actividad del piruvato quinasa, PK. **C.** Actividad del citrato sintasa, CS. **D.** Actividad del citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Actividad de la octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Actividad de la arginina quinasa, AK. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media.



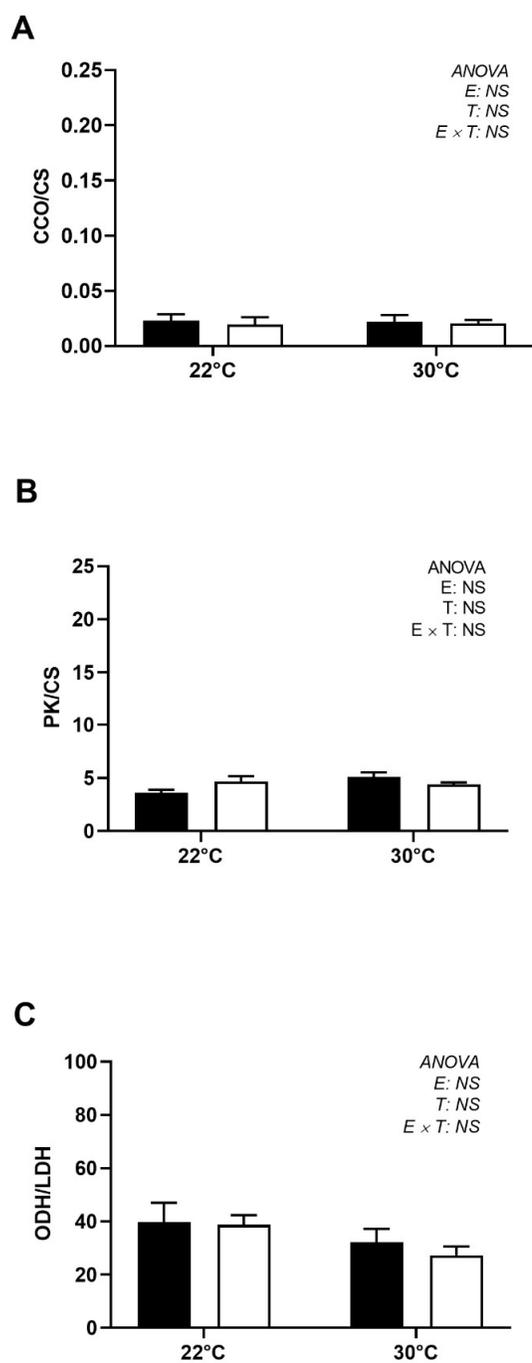
**FIGURA 41.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el músculo aductor de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control (22 °C) e hipertermia aguda (30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=7 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Enzimas metabólicas en el manto***

La actividad de la HK en el manto de los reproductores de la mano de león *N. subnodosus* fue significativamente mayor en primavera, principalmente en los organismos mantenidos a 22 °C (Fig. 42A), mientras que la actividad de la PK presentó valores similares en ambas estaciones, aumentando significativamente su actividad en los organismos expuestos a hipertermia (30 °C) (Fig. 42B). La actividad de las enzimas aerobias (CCO, CS) permanecieron con valores similares entre estaciones y temperaturas (Figs. 42 C, D). La actividad de las enzimas ODH y AK fue mayor en los organismos del grupo control (22 °C) en verano, mientras la actividad de ODH no fue afectada por la temperatura, la actividad de la AK presentó una respuesta estacional a la temperatura, aumentando en los organismos expuestos a hipertermia (30 °C) en primavera, y disminuyendo en los organismos expuestos a la misma temperatura en el verano (Figs. 42E-F). La LDH presentó un aumento significativo durante la exposición a hipertemia ( $p \leq 0.01$ ), con valores más altos en el verano ( $0.08 \pm 0.01 \text{ U g}^{-1}$ ) que durante la primavera ( $0.04 \pm 0.01 \text{ U g}^{-1}$ ) ( $p \leq 0.05$ ) (datos no mostrados en Fig. 42). Finalmente, las relaciones entre las actividades de las enzimas CCO/CS, PK/CS y ODH/ LDH no fueron afectados por la temperatura durante la primavera y verano (Figs. 43 A-C).



**FIGURA 42.** Actividades de enzimas aerobias y anaerobias ( $\text{U g}^{-1}$ ) en el manto de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control ( $22^\circ\text{C}$ ) e hipertermia aguda ( $30^\circ\text{C}$ ) en primavera (negro) y verano (blanco). **A.** Actividad de hexoquinasa, HK. **B.** Actividad del piruvato quinasa, PK. **C.** Actividad del citrato sintasa, CS. **D.** Actividad del citocromo c oxidasa, CCO. **E.** Actividad de la octopina deshidrogenasa, ODH. **F.** Actividad de la arginina quinasa, AK. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas.  $N=5$  organismos para cada combinación de temperatura y estación. Las letras minúsculas representan interacción significativa entre temperaturas y estaciones. Media  $\pm$  error estándar de la media.



**FIGURA 43.** Relación entre las actividades de enzimas metabólicas en el manto de los reproductores de mano de león *N. subnodosus* expuestos a condiciones control (22 °C) e hipertermia aguda (30 °C) en primavera (negro) y verano (blanco). **A.** Citocromo c oxidasa / citrato sintasa, CCO/CS. **B.** Piruvato-quinasa/ citrato sintasa, PK/CS. **C.** Octopina deshidrogenasa/ lactato deshidrogenasa, ODH/LDH. ANOVA dos vías, Tukey  $p \leq 0.05$ . E: estaciones T: temperaturas. N=5 organismos para cada combinación de temperatura y estación. Media  $\pm$  error estándar de la media.

### ***Discusión***

Este trabajo analizó los patrones estacionales en el estado energético de los adultos de mano de león *N. subnodosus* expuestos a hipertermia aguda en condiciones experimentales durante dos diferentes estados de maduración gonádica. El reto térmico de 30 °C se seleccionó con base a los límites de tolerancia térmica de las poblaciones de la especie en la Península de Baja California Sur, reconociéndose un límite de tolerancia térmica superior alrededor de 32°C (96h-LD50) (González-Estrada, 2003), que coincide con las temperaturas máximas que ocurren en la zona de estudio. La influencia de la actividad reproductiva en las reservas y capacidades fisiológicas del músculo aductor se ha abordado ampliamente en los moluscos (para revisiones, ver: Barber & Blake, 2006; Guderley *et al.*, 2010).

El incremento de la tasa metabólica de los organismos ectotermos en respuesta a un incremento agudo de temperatura es una respuesta que refleja un aumento de la demanda de energía. En este estudio, los organismos colectados en el verano no modificaron su consumo de oxígeno durante una exposición aguda a hipertermia durante 24h, mientras que en primavera se observó un incremento momentáneo del consumo de oxígeno en los organismos. Esta respuesta indica que, la sensibilidad a los retos térmicos esté relacionada a la actividad reproductiva, y refleja los mecanismos compensatorios que permiten a los organismos modificar su tasa metabólica en función de los cambios de temperatura estacionales (Guderley & St-Pierre, 2002; Heilmayer & Brey, 2003). Una disminución en la CEA y el contenido de ArgP así como el incremento de los niveles de IMP y HX en los organismos expuestos a un reto térmico agudo puede sugerir que los procesos de producción y uso de la energía no compensaron por completo el gasto energético de los organismos (Pörtner *et al.*, 1999). Un incremento de IMP y particularmente, en el nivel de HX, normalmente ocurre en condiciones *post-mortem* como una consecuencia de la degradación de los nucleótidos (Tejada, 2009). Sin embargo, niveles elevados de IMP pueden ocurrir en organismos vivos bajo condiciones de estrés (Robles-Romo *et al.*, 2014). La concentración de IMP en los adultos de *N. subnodosus* expuestos a 30 °C ( $0.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) alcanzó la mitad del nivel encontrado en el músculo aductor *post-mortem* de *N. subnodosus* ( $0.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ ), mientras que la concentración de HX fue de solo  $0.012 \mu\text{mol g}^{-1}$  en comparación a los niveles observados en músculo aductor *post-mortem* después de un día en hielo ( $0.51 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008). Asimismo, es importante mencionar que algunas variables de

la calidad del músculo *post-mortem* (firmeza, contenido de lípidos y proteínas, composición de aminoácidos específicos) se reducen durante el verano (Beltrán-Lugo *et al.*, 2006) por lo que resulta necesario identificar la variación estacional de los niveles de estos nucleótidos y otras variables asociadas a la condición fisiológica de los organismos vivos y/o la calidad del músculo aductor preservado para su venta. Este incremento en los niveles de IMP y HX también pueden indicar un estado de estrés fisiológico durante la exposición a temperaturas elevadas. Los efectos estacionales de la respuesta a retos térmicos como el incremento del AMP y ADP, así como una disminución de CEA en los organismos expuestos a temperaturas altas durante el verano son evidencias de esta hipótesis. Una disminución de CEA indica un estrés en respuesta a cambios ambientales subletales (Ivanovici, 1980), sin embargo, los niveles más bajos observados en este estudio ( $\geq 0.90$ ) son mayores a los niveles que han sido propuestos como indicadores de estrés moderado (0.5 - 0.75) o severo ( $\approx 0.50$ ) (Moal *et al.*, 1989b). Los niveles de CEA pueden ser restablecidos mediante el uso de reservas de fosfágenos (ArgP) en condiciones de alta demanda energética, tales como una intensa actividad del músculo aductor (Pérez *et al.*, 2008; Robles-Romo *et al.*, 2016), hipoxia (Abe & Munehara, 2007) e hipertermia (Morley *et al.*, 2009). Esta estrategia parece ser utilizada por los adultos de la mano de león para mantener su balance energético, disminuyendo su nivel de ArgP para mantener su nivel de ATP estable durante una exposición a temperaturas elevadas. Este efecto fue más evidente en los organismos expuestos a un reto térmico durante el verano ( $10 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) en relación con el nivel observado en los organismos expuestos a un reto térmico durante la primavera ( $5 \mu\text{mol g}^{-1}$ ). Este resultado sugiere, de nuevo, que existen cambios metabólicos estacionales que permiten a los organismos mantener su balance energético durante la reproducción y/o los cambios ambientales.

Los ectotermos responden a cambios agudos y crónicos de temperatura con ajustes cuantitativos y/o cualitativos en la actividad de las enzimas (Doucet-Beaupré *et al.*, 2010). Varios mecanismos como la expresión isoformas, cambios en la densidad y el volumen de las mitocondrias, así como cambios en la composición de lípidos de la membrana mitocondrial pueden explicar los cambios circadianos y estacionales en la capacidad de respuesta de los organismos (revisión en: Bouchard & Guderley, 2003). En organismos se observaron cambios compensatorios en respuesta a la hipertermia y el estado reproductivo.

La capacidad aerobia del músculo aductor de los reproductores fue afectada por la exposición a temperatura elevada y después, se observaron ajustes para alcanzar la compensación fisiológica (Bouchard & Guderley, 2003; Guderley, 2004). En el presente estudio, las actividades de CCO y CS no fueron afectadas por la exposición a hipertermia (30 °C) en condiciones de laboratorio, indicando una falta de compensación en las propiedades y/o actividad de las mitocondrias después de 24h. En contraste, la actividad de la HK fue estimulada por la exposición aguda a hipertermia durante estadios iniciales y avanzados de desarrollo de las gónadas (primavera y verano), lo que sugiere un incremento de la fosforilación de la glucosa para incrementar el flujo de energía hacia las células. La actividad de la PK, otra enzima reguladora de la actividad glicolítica no presentó diferencias entre temperaturas o diferentes estadios de maduración de las gónadas evaluados en este estudio (desarrollo inicial y maduración). Sin embargo, la relación de la actividad de PK/CS fue relativamente menor en los organismos expuestos a hipertermia durante la primavera, indicando un aumento de la actividad glicolítica anaerobia estimulada por el aumento agudo de la temperatura durante estadios iniciales de maduración de las gónadas (Ioannou *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2014). Esta respuesta probablemente es una fase transitoria en el metabolismo energético (Doucet-Beaupré *et al.*, 2010).

La actividad de la ODH en el músculo aductor de *N. subnodosus* alcanzó los niveles más altos en estadios de maduración de las gónadas avanzados (verano), lo que ha sido relacionado con el uso de rutas anaerobias durante fases de alto requerimiento energético como el desove en otras especies de pectínidos (Brokordt *et al.*, 2000b; Brokordt & Guderley, 2004). En conjunto con los niveles más altos de ArgP en el músculo aductor de los organismos colectados en el verano, se sugiere que la capacidad anaerobia de los reproductores es estimulada durante fases de mayor actividad reproductiva (e. g. desoves) así como períodos de exposición a temperaturas elevadas (e. g. verano). La actividad de ODH es independiente a la temperatura, lo que ha sido interpretado como una adaptación que permite a los organismos mantener los niveles de NAD, NADH y octopina durante procesos fisiológicos que un alto requerimiento energético (Doucet-Beaupré *et al.*, 2010). La actividad de la AK mostró una alta sensibilidad a la temperatura en los reproductores colectados en primavera, incrementándose durante la exposición a temperatura elevada, mientras que en

los organismos colectados en veranos no se observaron cambios en la actividad de esta enzima. Esto parece estar relacionado a una aclimatación de la actividad de la enzima a medida que la temperatura comienza a incrementarse y podría explicar el aumento del contenido de ArgP en el músculo aductor de los reproductores durante el verano. Los estudios previos en pectínidos han sugerido que la actividad de la AK es estimulada por una disminución en el contenido de ArgP así como por el incremento de arginina libre, ADP y fosfato (Pi) (Pörtner *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 2003). Esto coincide con una disminución de los niveles de ArgP simultánea con el incremento de ADP observado en el músculo aductor de los organismos expuestos a un reto térmico durante el verano, y que puede eventualmente estar relacionado al estado reproductivo, así como a las condiciones ambientales del hábitat de los organismos durante este período.

Estas respuestas indican que el músculo aductor es altamente sensible a los cambios en el estado fisiológico de los organismos y a la exposición a temperaturas elevadas. Aunado a ello, las respuestas en la actividad glicolítica (HK, PK) y en el metabolismo de fosfágenos (AK) indican que este tejido también es sensible a los cambios en el estado reproductivo de los organismos, así como durante la exposición a temperaturas elevadas. Asimismo, tanto la actividad glicolítica (primavera), como el metabolismo de fosfágenos y opinas (ODH) (verano) mostró patrones estacionales en este tejido. En particular, el metabolismo de rutas dependientes de arginina (AK) y piruvato (ODH) aumenta durante etapas avanzadas de maduración gonádica (verano), que coinciden con la respuesta observada en el músculo aductor, y sugieren una sincronización de esta respuesta entre ambos tejidos en preparación para el desove. Estos resultados indican que ambos tejidos presentan respuestas metabólicas específicas que reflejan cambios en la demanda de energía asociados a la reproducción y a la respuesta a la hipertermia. Racotta *et al.*, (2003) reportó un incremento de carbohidratos en el manto de los reproductores de *N. subnodosus* a medida que avanza el desarrollo de las gónadas, lo que indica que tanto la actividad de las enzimas glicolíticas y anaerobias del músculo y el manto están asociadas a la capacidad de los organismos para mantener el balance de energía durante períodos de esfuerzo reproductivo.

### **Conclusión**

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los reproductores de *N. subnodosus* muestran un patrón estacional en el metabolismo energético relacionado con la maduración de gónadas. Los cambios estacionales en el estado de energía (CEA, ArgP), el consumo de oxígeno, la glicólisis (HK) y el metabolismo de fosfágenos (AK) y opinas (ODH) en el músculo aductor y en el manto en respuesta a la hipertermia aguda sugiere que los adultos de *N. subnodosus* exhiben diferentes sensibilidades a las condiciones térmicas durante la maduración de las gónadas. Si bien esto podría afectar negativamente balance de energía, la respuesta observada en los organismos sugirió que *N. subnodosus* presenta una alta capacidad para responder al estrés por temperatura aguda en el rango de su tolerancia térmica. Estos resultados conducen a incógnitas adicionales con respecto a la capacidad metabólica y energética de la respuesta y homeostasis bajo exposición repetida a hipertermia aguda y con respecto a la variabilidad creciente en la temperatura del agua de mar como otro gran evento posible en futuros escenarios de calentamiento global.

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL

---

Los ectotermos marinos están expuestos continuamente a cambios ambientales en su hábitat. Cuando estos cambios son abruptos o atípicos pueden resultar en una disminución del desempeño fisiológico y la supervivencia de los organismos, afectando su abundancia y su distribución geográfica. *N. subnodosus* es una especie submareal que habita lagunas costeras a lo largo de las costas del Pacífico, desde el norte de México hasta las costas del Perú. Entre ellas, destacan la laguna Ojo de Liebre, límite norte de la distribución natural de la especie, y Bahía Magdalena, una zona de transición entre las zonas templada y tropical. En ambas lagunas, se han realizado estudios sobre la actividad reproductiva y la tolerancia térmica de la especie, y en algunos casos, se han desarrollado cultivos pilotos con tasas de crecimiento y supervivencia que han sido relacionadas a la incidencia de temperaturas elevadas. Sin embargo, a la fecha no existían estudios que describan las respuestas a nivel celular y molecular de la especie a cambios ambientales como la exposición a temperaturas elevadas y su efecto sinérgico con otras variables, como la baja disponibilidad de oxígeno disuelto.

En los pectínidos, el nivel de energía del músculo aductor refleja cambios en el estado fisiológico (e. g. esfuerzo reproductivo) (Chapman & Atkinson, 1973; Giesy & Dickson, 1981; Woll & Bakke, 2017) y el efecto de la exposición a cambios ambientales (e. g. temperatura) (Moal *et al.*, 1989b; Pérez *et al.*, 2008). En una primera etapa, se pudo ver que en su medio natural (cultivos), el contenido de energía (CEA) en el músculo aductor de *N. subnodosus* mostró valores adecuados tanto para el crecimiento como para la reproducción (Chapman *et al.*, 1971), similares a los niveles de otras especies que se distribuyen en zonas templadas como *P. magellanicus* (de Zwaan *et al.*, 1980; Perez *et al.*, 2008), *P. jacobus* (Grieshaber & Gäde, 1977) y *C. opercularis* (Grieshaber *et al.*, 1978). En los reproductores se observaron cambios en la composición y el nivel de actividad metabólica del músculo aductor a medida que los organismos destinan una mayor cantidad de energía para la reproducción. El nivel de IMP y HX en el músculo aductor de los reproductores presenta niveles mayores antes del inicio de la maduración sexual (juveniles), mientras que los niveles de ADP y GTP aumentan en etapas reproductivas. Estos resultados sugieren que la composición de los nucleótidos de *N. subnodosus* varían a lo largo del desarrollo

gonádico/reproductivo, en respuesta a la demanda energética de la actividad de los organismos (e. g. esfuerzo reproductivo). En particular, es interesante que el aumento de GTP fue mayor durante etapas iniciales del desarrollo gonádico (primavera), dado que las guaninas son acarreadores de grupos fosfatos a varias rutas metabólicas, algunas de ellas involucradas en la diferenciación celular (gametogénesis). Asimismo, se observó que, el nivel de ArgP en el músculo aductor de los juveniles ( $22.4 \pm 2.8 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) y los reproductores en etapas iniciales de desarrollo gonádico ( $23.1 \pm 3.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) son similares, con un aumento del 23.3% durante etapas avanzadas del desarrollo gonádico ( $28.5 \pm 4.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ ). En los reproductores, el nivel de energía (ArgP) del músculo aductor puede ser utilizado para la locomoción (e. g. respuesta de escape) y en mayor medida, para satisfacer el requerimiento de energía para la reproducción (e. g. gametogénesis, maduración, desove). (Brokordt *et al.*, 2000a,b; Guderley & Pörtner, 2010). Una hipótesis sobre un mayor contenido de energía (ArgP) en el músculo aductor de *N. subnodosus* durante etapas avanzadas del desarrollo gonádico (verano) puede ser una estrategia para satisfacer la demanda de energía de las contracciones musculares durante el desove. Esta capacidad de los organismos para almacenar energía en el músculo aductor depende de las condiciones ambientales del hábitat. (Chih & Ellington, 1983; Bailey *et al.*, 2003). El nivel de energía (ArgP) de *N. subnodosus* es similar a otras especies que habitan zonas templadas como *P. magellanicus* (de Zwan *et al.*, 1980) y *P. maximus* (Bailey *et al.*, 2003), por lo que una disminución de ArgP en el músculo aductor de los juveniles y los reproductores expuestos a condiciones agudas de hipertermia (30 °C) podría tener efectos negativos sobre la respuesta de escape de depredadores (e. g. pulpos, estrellas de mar) así como en el desarrollo de procesos fisiológicos (e. g. desove). Los niveles de ArgP en el músculo aductor de *N. subnodosus* reportados en el presente estudio pueden ser utilizados como indicadores de la demanda de energía de procesos fisiológicos (e. g. fatiga muscular) y la exposición a cambios ambientales (e. g. hipertermia) de las poblaciones que habitan lagunas costeras como la laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena y otras zonas dentro del rango de distribución de la especie.

En las células, el estado energético (CEA, ArgP) depende del nivel de actividad de las enzimas metabólicas que pueden presentar cambios de acuerdo con el estado fisiológico de organismos y las condiciones ambientales del hábitat de las especies (Keller *et al.*, 2004;

Sommer & Pörtner, 2004; Philipp *et al.*, 2005; Sukhotin *et al.*, 2006; Abele *et al.*, 2009; Trueblood & Seibel, 2014). En *N. subnodosus* se observó que la actividad de las enzimas CS y CCO fueron mayores en el músculo aductor de los juveniles en relación con los niveles en los reproductores, como un posible indicador de cambios en la abundancia y el volumen de las mitocondrias en este tejido conforme cambia el tamaño, la edad y/o la actividad de los organismos (Pichaud, 2009). En algunas especies, los cambios en la capacidad aerobia del músculo aductor han sido relacionados con el esfuerzo reproductivo (Boadas *et al.*, 1997; Brokordt *et al.*, 2000a), registrando una mayor demanda de energía para la recuperación después del desove (Kraffe *et al.*, 2008). En los reproductores de *N. subnodosus*, la actividad de CCO en el músculo aductor aumentó durante estadios más avanzados de desarrollo gonádico (verano) posiblemente como una estrategia para satisfacer el costo de energía del desove (Brokordt *et al.*, 2000b; Phillip *et al.*, 2008; Labrecque & Guderley, 2011). Sin embargo, los valores de CS y CCO del músculo aductor de los juveniles y los reproductores de *N. subnodosus* son más bajos que los reportados en el músculo aductor de otras especies que habitan zonas templadas como *C. islandica* y *P. magellanicus* (Stewart *et al.*, 1992; Brokordt *et al.*, 2000b; Tremblay *et al.*, 2006; Kraffe *et al.*, 2008), lo que sugiere un efecto de las condiciones ambientales de la zona geográfica. En este sentido, una diferencia en la actividad mitocondrial entre los juveniles y los reproductores de *N. subnodosus*, particularmente para la CCO (10 veces) y CS (2 veces) coincide con la respuesta de especies que habitan zonas frías cuando son expuestas a temperaturas elevadas (verano) (Sommer & Pörtner, 2004). Estos resultados sugieren una respuesta compensatoria de *N. subnodosus* a las condiciones térmicas de la zona geográfica, dado que la laguna Ojo de Liebre (juveniles) está ubicada en una zona templada, mientras que Bahía Magdalena (reproductores) se encuentra en una zona de transición entre una zona templada y una zona tropical (Cruz-Escalona *et al.*, 2013). Los cambios en la actividad de las mitocondrias, así como la acumulación de energía (ArgP) en el músculo aductor de *N. subnodosus* después de una aclimatación corta a condiciones de laboratorio parece confirmar una respuesta compensatoria a cambios ambientales (Pernet *et al.*, 2006; 2007; Bouchard & Guderley, 2003).

En los reproductores, se observó que la acumulación de ArgP en el músculo aductor coincide con un aumento en CCO/CS de este tejido durante etapas de mayor esfuerzo reproductivo (verano), lo que puede determinar la capacidad de los organismos para reestablecer sus niveles de energía en este tejido (Bailey *et al.*, 2003). Aunado a ello, se observó un mayor nivel de actividad metabólica (CCO/CS, PK/CS y ODH/LDH) en el músculo aductor de los reproductores en relación con los niveles observados en el músculo aductor de los juveniles, posiblemente como un reflejo de la demanda de energía para la reproducción. De manera adicional al uso de fosfágenos, los organismos utilizan los carbohidratos del músculo aductor como fuente de energía para el desarrollo de los gametos. En este sentido, la actividad de HK en el músculo aductor aumenta durante estadios iniciales del desarrollo de las gónadas (primavera), mientras que la actividad de la AK y de la ODH aumentan en estados más avanzados de desarrollo gonádico (verano). Estos cambios estacionales en el metabolismo energético de los reproductores de *N. subnodosus* también han sido asociados a la maduración y el desove en otros pectínidos como *Euvola ziczac* (Boadas *et al.*, 1997; Brokordt *et al.*, 2000a) y *P. magellanicus* (Kraffe *et al.*, 2008) e indican que existen cambios en la demanda energética y por lo tanto, la tolerancia de los organismos a cambios ambientales puede variar a lo largo del ciclo gonádico (Petes *et al.*, 2008; Guderley & Pörtner, 2010; Barrento *et al.*, 2013). En *N. subnodosus*, los cambios estacionales en la actividad metabólica tanto en el músculo aductor como en el manto de los reproductores son una evidencia de que existen cambios en el metabolismo energético a medida que avanza el desarrollo de los gametos (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004; Arellano Martínez *et al.*, 2011). En este contexto, la actividad metabólica del manto de *N. subnodosus*, principalmente la glucólisis (HK y/o PK) mostró un aumento en estadios iniciales de desarrollo de los gametos (primavera) y después de una aclimatación corta de los organismos a condiciones de laboratorio (L), mientras que la actividad anaerobia (ODH) aumentó durante etapas avanzadas de maduración gonádica (verano). Estos resultados sugieren que, es posible que exista un vínculo estrecho entre la percepción de los cambios en las variables abióticas (e. g. temperatura) a través de estructuras especializadas en el manto (e. g. tentáculos, manchas oculares) y el inicio de una cascada de señales químicas que contribuyen a mantener el balance energético del organismo, como la acumulación de carbohidratos en el músculo

aductor y el manto de *N. subnodosus* a medida que avanza el desarrollo de los gametos (Racotta *et al.*, 2003).

Para evaluar si los cambios en las respuestas metabólicas de los organismos están relacionadas a la exposición aguda a la temperatura elevada en sinergia con la hipoxia y el esfuerzo reproductivo, los juveniles y los reproductores fueron expuestos a escenarios ambientales diseñados a partir de datos de temperatura y disponibilidad de oxígeno registrados en el sitio de cultivo. El consumo de oxígeno de los juveniles ( $3.2 \pm 0.3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) así como de los reproductores durante etapas iniciales ( $3.3 \pm 0.3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y avanzadas de maduración gonádica ( $3.4 \pm 0.6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) fue similar después de una semana de aclimatación en condiciones óptimas de temperatura (22 °C) en el laboratorio (González-Estrada, 2003) sugiriendo que condiciones de laboratorio no impactan ni a los juveniles ni a los reproductores a ese nivel de organización biológica. Después de una exposición a hipertermia aguda (30 °C, 24h) se observó que mientras los juveniles incrementaron hasta 3 veces su  $\text{VO}_2$  inmediatamente después del inicio de la exposición a hipertermia (30 °C) y mantuvieron un  $\text{VO}_2$  elevado durante 24h, los adultos presentaron una respuesta compensatoria que varió de acuerdo con el estadio de desarrollo de las gónadas y/o temporada de colecta. Durante etapas iniciales de desarrollo gonádico (primavera), los reproductores aumentaron su  $\text{VO}_2$  a las 18h a 30 °C, regresando a sus niveles basales a las 24h, mientras que en etapas avanzadas de maduración gonádica (verano) no se observaron cambios en el  $\text{VO}_2$  en respuesta a la hipertermia (30 °C) durante 24h. Esto demuestra que los cambios estacionales en la demanda energética de los organismos de acuerdo con su estado reproductivo reflejan cambios en su capacidad aerobia y, por lo tanto, la tolerancia térmica de los organismos (Pörtner & Farrell, 2008; Guderley & Pörtner, 2010).

La capacidad aerobia de los organismos determina su tolerancia a cambios de temperatura (Pörtner *et al.*, 2017). Se observó que una exposición a temperaturas elevadas disminuye el contenido energético (ArgP) del músculo aductor de *N. subnodosus*, independientemente de la edad (*i.e.* juveniles y adultos), el sitio y el año de colecta (*i.e.* Ojo de Liebre y Bahía Magdalena). Sin embargo, durante períodos de alto esfuerzo reproductivo (verano), los cambios en la actividad de AK y ODH sugieren que el nivel de arginina es uno de los principales moduladores de la tolerancia térmica, como ha sido reportado en *P. maximus*

(Artigaud *et al.*, 2015; Gotze *et al.*, 2020). Esto podría ser una de las razones por las que en *N. subnodosus* se observa una acumulación de fosfágenos (ArgP) y de carbohidratos en el músculo aductor y en el manto a medida que avanza la temporada reproductiva (verano), si consideramos que el glicógeno aporta el 45% y la ArgP EL 55 % de la energía necesaria para que las células mantengan su homeostasis celular durante períodos de alta demanda de energía (Hochachka & Somero, 2002)

En este estudio, observamos que la exposición aguda a temperaturas elevadas en sinergia con hipoxia moderada (capítulo 2) estimula respuestas de tolerancia pasiva como la disminución de la tasa respiratoria (oxiconformador), el metabolismo celular, particularmente la síntesis de proteínas, que es uno de los procesos más costosos a nivel energético para las células (Hochachka & Somero 2002). Un resultado inesperado fue que, aunque el músculo aductor de *N. subnodosus* es sensible a las condiciones térmicas (capítulos 2 y 3), la actividad de las enzimas metabólicas no mostró cambios adicionales importantes durante la exposición a temperaturas altas en sinergia con hipoxia moderada (TH). En otros pectínidos como *P. maximus* se observó recientemente una respuesta similar (Gotze *et al.* 2020), a diferencia de otros tejidos que muestran mayor susceptibilidad a una condición de hipoxia ambiental como las branquias en *P. maximus* o el manto en *N. subnodosus* (capítulo 2). Esto sugiere que existen respuestas adaptativas para mantener la homeóstasis celular en el músculo aductor a cambios repentinos en la demanda de oxígeno a nivel celular, así como existen también para el rápido restablecimiento del nivel energético después de períodos de hipoxia funcional (e. g. respuesta de escape) (Bailey *et al.*, 2003; Guderley & Pörtner, 2010). Sin embargo, algunos autores han propuesto que las especies más adaptadas a períodos de hipoxia funcional tienen una mayor capacidad para reestablecer su nivel energético rápidamente, mientras que las especies mejor adaptadas a la hipoxia ambiental usan de una manera más eficiente su energía (Carroll & Wells, 1995). Los pectínidos son considerados como organismos activos, que se caracterizan por un alto nivel de CEA y ArgP en el músculo aductor, por lo que se esperaría que sean capaces de reestablecer rápidamente su nivel de energía después de ser expuestos a eventos agudos de hipoxia funcional (e. g. respuesta de escape). Este nivel de actividad podría estar relacionado con la capacidad de los organismos para tolerar condiciones de hipoxia ambiental. Ambas condiciones son afectadas en gran medida por la interacción sinérgica de

la disponibilidad de oxígeno ambiental y la temperatura (Grieshaber *et al.*, 1994). Son pocos los estudios que han descrito el efecto metabólico de la exposición a hipoxia ambiental en estas especies a nivel molecular. Sin embargo, se ha observado que una condición de hipertermia en sinergia con baja disponibilidad de oxígeno puede afectar de manera negativa no solo el metabolismo energético del músculo aductor, sino, además, la actividad metabólica y la abundancia de proteínas involucradas en un gran número de respuestas fisiológicas como la adquisición y transporte de oxígeno a los tejidos (Artigaud *et al.*, 2015) y la percepción de estímulos ambientales (este estudio). En *N. subnodosus*, se encontraron cambios en la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo energético, la organización el citoesqueleto y la apoptosis celular en el manto después de una exposición a condiciones de hipertermia y bajo oxígeno disuelto, que pueden ser indicadores de la tolerancia ambiental de poblaciones de *N. subnodosus* que habiten zonas con condiciones ambientales contrastantes (e. g. temperatura, disponibilidad de oxígeno, alimento) como las costas este y oeste de la Península de Baja California Sur. En comparación con organismos intermareales como los ostiones (*Crassostrea spp.*) y los mejillones (*Mytilus spp.*) que están expuestos frecuentemente a temperaturas elevadas y condiciones hipóxicas (e. g. emersión) y están adaptados para incrementar su metabolismo anaerobio rápidamente en respuesta a estos cambios ambientales. Esto nos podría sugerir que especies submareales como *N. subnodosus* responden a estos cambios en el medio ambiente, reduciendo su actividad metabólica para prolongar su tiempo de tolerancia y/o probabilidad de supervivencia a condiciones ambientales subóptimas. Esta diferencia en la capacidad de respuesta de los moluscos bivalvos a cambios ambientales puede afectar su rango de distribución vertical en la columna de agua y/o su distribución latitudinal dentro de su rango de distribución geográfica (Zippay & Helmuth, 2012) aunque debido a la gran diversidad de adaptaciones de las especies, así como a variabilidad ambiental de los ecosistemas marinos, esta relación puede resultar compleja (Bruning *et al.*, 2013). Sin embargo, es evidente que el aumento en la intensidad y la frecuencia de los eventos de hipertermia y baja disponibilidad de oxígeno pueden limitar de manera importante el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de las poblaciones naturales de *N. subnodosus* en el Pacífico Norte, particularmente de las poblaciones que se ubican en el límite norte de la distribución de esta especie, como la laguna Ojo de Liebre. En otros moluscos bivalvos como *M. galloprovincialis*, el aumento de la temperatura ha

estimulado el desplazamiento de las poblaciones que habitan los límites sur de su distribución geográfica, alterando su abundancia y su interacción con otras especies durante los últimos años (Hilbish *et al.*, 2010; Zippay & Helmuth, 2012). Los resultados de este trabajo indican que *N. subnodosus* es menos susceptible que otras especies como *A. irradians* (Ivanina & Sokolova, 2016), que presenta niveles de tolerancia similares a *P. maximus* (Artigaud 2014; 2015), aunque es menos tolerante que *A. purpuratus* (Aguirre- Velarde *et al.*, 2016). Estas diferencias en la tolerancia a cambios de temperatura y oxígeno disuelto son un reflejo de la historia evolutiva de las especies, y de su capacidad de respuesta ante cambios ambientales futuros en su hábitat. Los resultados de este trabajo nos sugieren que *N. subnodosus* es tan o más susceptible a las temperaturas elevadas en sinergia a episodios de hipoxia que otras especies de pectinidos, y, por lo tanto, cualquier cambio de estas variables ambientales pueden alterar la abundancia y el rango de distribución de la especie, como el reciente colapso de las poblaciones naturales de *N. subnodosus* en laguna Ojo de Liebre.

## IX. CONCLUSIONES GENERALES

---

*N. subnodosus* presenta un contenido de energía en el músculo aductor similar al de otras especies de pectínidos que habitan zonas templadas, mostrando niveles adecuados para el crecimiento y la reproducción en su hábitat. Aunado a ello, existen diferencias en la respuesta metabólica, principalmente de las enzimas mitocondriales (CCO, CS) del músculo aductor y el manto de los organismos que indican cambios en la demanda de energía durante el crecimiento (juvenil) y la reproducción (adulto) así como en respuesta a las condiciones ambientales, mientras que los cambios estacionales en el metabolismo de los carbohidratos (HK, PK), fosfágenos (AK, ArgP), así como el nivel de algunos nucleótidos (GTP, HX) en el músculo aductor y el manto están relacionados al esfuerzo reproductivo. *N. subnodosus* mostró una alta capacidad para adaptarse a cambios ambientales (aclimatación) con un aumento de su contenido de energía (CEA y ArgP) en el músculo aductor independientemente de su estado fisiológico, origen y/o temporada de colecta.

Los juveniles de *N. subnodosus* responden rápidamente a la condición TH con una disminución de su  $VO_2$  (oxiconformador) mientras que el contenido de energía (CEA) del músculo aductor se mantuvo mediante la hidrólisis de ArgP. La disminución de su actividad metabólica fue seguida por cambios en la actividad glicolítica y anaerobia, así como en la abundancia de proteínas que participan en el metabolismo de la energía y la organización del citoesqueleto en el manto, lo que subraya en el papel de este tejido en la respuesta a los cambios ambientales. Sin embargo, los procesos de alta demanda de energía, como la biogénesis mitocondrial (CCO / CS), solo se exhiben como ajustes iniciales, probablemente como una respuesta adaptativa de los animales para futuros retos ambientales (TH). Los cambios estacionales en el estado de energía (CEA, ArgP), el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) y la actividad glucolítica (HK) así como en el metabolismo de los fosfágenos (ArgP, AK) en respuesta a la hipertermia aguda sugiere que los reproductores exhiben diferentes sensibilidades a las condiciones térmicas a medida que avanza la maduración de las gónadas. Si bien esto podría afectar negativamente el suministro y el balance de energía, la respuesta observada en los reproductores sugirió que *N. subnodosus* presenta una alta capacidad para responder al estrés por temperatura aguda dentro de su rango de tolerancia térmica.

## X. PERSPECTIVAS

---

Este estudio reportó el estado energético y la capacidad de respuesta de poblaciones cultivadas de mano de león *N. subnodosus* en la laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena en Baja California Sur expuestas a temperaturas elevadas en sinergia con la hipoxia o el esfuerzo reproductivo. Estas respuestas pueden tener implicaciones importantes en la abundancia y distribución de las especies bajo un escenario de cambio climático. Las perspectivas para el desarrollo de futuras investigaciones de tolerancia ambiental en esta especie son:

-Establecer el punto crítico de oxígeno y los niveles subóptimos de energía (CEA, ArgP) durante varias etapas del ciclo de vida de la especie (larva, juvenil, adulto) a diferentes temperaturas.

-Analizar los efectos sinérgicos de la temperatura elevada con otros cambios ambientales (e. g. nivel de oxígeno disuelto, alimento) en condiciones de laboratorio sobre el desempeño fisiológico de los organismos durante diferentes etapas del ciclo de vida de la especie (huevo, larva, juvenil, adulto).

-Evaluar el efecto de cambios ambientales sobre la respuesta de escape y el esfuerzo reproductivo en diferentes etapas del ciclo gonádico (inicial, avanzado, desove y postdesove) con el fin de identificar sus efectos sobre la calidad de los desoves, así como su interacción con factores biológicos (e. g. parasitismo, enfermedades, depredación) que pueden tener impactos a nivel ecológico.

-Incorporar herramientas metabolómicas y transcriptómicas que permitan identificar posibles cambios en la tolerancia térmica de las poblaciones de la especie a nivel celular.

-Integrar la información de bioensayos de tolerancia térmica e información de la caracterización de la variabilidad ambiental del hábitat en modelos energéticos dinámicos (DEB).

## XI. REFERENCIAS

---

- Abe, T., & Munehara, H. (2007). Histological structure of the male reproductive organs and spermatogenesis in a copulating sculpin, *Radulinopsis taranetzi* (Scorpaeniformes: Cottidae). *Ichthyological Research*, 54(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s10228-006-0385-8>
- Abele, D. (2012). Temperature adaptation in a changing climate: nature at risk. *Choice Reviews Online*, 50(02), 50-0873-50-0873. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.50-0873>
- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H. O., & Puntarulo, S. (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 205(13), 1831–1841. <https://doi.org/10.1006/jexp.1997.0094>
- Abele, Doris, Brey, T., & Philipp, E. (2009). Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans. *Experimental Gerontology*, 44(5), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.012>
- Aguirre-Velarde, A., Jean, F., Thouzeau, G., & Flye-Sainte-Marie, J. (2016). Effects of progressive hypoxia on oxygen uptake in juveniles of the Peruvian scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 451, 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.030>
- Aguirre-Velarde, A., Jean, F., Thouzeau, G., & Flye-Sainte-Marie, J. (2018). Feeding behaviour and growth of the Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) under daily cyclic hypoxia conditions. *Journal of Sea Research*, 131(October 2017), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.11.001>
- Alvarez B. y A. Granados, (1992). Variación espacio-temporal de temperatura en un hábitat de invierno de la ballena gris: Laguna Ojo de Liebre. *Ciencias Marinas* 18(1): 151-165
- Anestis, A., Lazou, A., Portner, H. O., & Michaelidis, B. (2007). Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(2), R911–R921. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00124.2007>
- Anestis, Andreas, Pörtner, H. O., Lazou, A., & Michaelidis, B. (2008). Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: Implications for vertical zonation. *Journal of Experimental Biology*, 211(17), 2889–2898. <https://doi.org/10.1242/jeb.016782>
- Angel-Dapa, M. A., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B. P., Acosta-Salmón, H., & Saucedo, P. E. (2015). Comparative analysis of the reproductive strategy of lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in Baja California Sur, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(3), 616–620. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-25>
- Angilletta, M. J., Condon, C., & Youngblood, J. P. (2019). Thermal acclimation of flies from three populations of *Drosophila melanogaster* fails to support the seasonality hypothesis. *Journal of Thermal Biology*, 81, 25–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.02.009>

- Ansell, A. D. (1974). Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Lima hians* from the Clyde Sea Area. *Marine Biology*, 27(2), 115–122. <https://doi.org/10.1007/BF00389063>
- Arellano-Martínez, M., Racotta, I. S., Ceballos-Vázquez, B. P., & Elorduy-Garay, J. F. (2004). Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 23(1), 15–23.
- Arellano-Martínez, Marcial, Ceballos-Vázquez, B. P., Ruíz-Verdugo, C., Pérez de León, E., Cervantes-Duarte, R., & Domínguez-Valdéz, P. M. (2011). Growth and reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culture system at Guerrero Negro lagoon, Baja California Sur, Mexico. *Aquaculture Research*, 42(4), 571–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02652.x>
- Artigaud, S., Gauthier, O., & Pichereau, V. (2013). Identifying differentially expressed proteins in two-dimensional electrophoresis experiments: Inputs from transcriptomics statistical tools. *Bioinformatics*, 29(21), 2729–2734. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt464>
- Artigaud, S., Lacroix, C., Pichereau, V., & Flye-Sainte-Marie, J. (2014). Respiratory response to combined heat and hypoxia in the marine bivalves *Pecten maximus* and *Mytilus* spp. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 175(1), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.06.005>
- Artigaud, S., Richard, J., Thorne, M. A. S., Lavaud, R., Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Peck, L. S., Clark, M. S., & Pichereau, V. (2015). Deciphering the molecular adaptation of the king scallop (*Pecten maximus*) to heat stress using transcriptomics and proteomics. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2132-x>
- Atkinson, D E, & Walton, G. M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 242: 3239–3241.
- Atkinson, Daniel E. (1968). The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7(11), 4030–4034.
- B. Brokordt, Katherina; E. Guderley, H. (2004). Energetic Requirements During Gonad Maturation and Spawning in Scallops: Sex Differences in *Chlamys Islandica* (Muller 1776). *Journal of Shellfish Research*, 23(January), 25–32.
- Bailey, D. M., Peck, L. S., Bock, C., & Pörtner, H. O. (2003). High-Energy Phosphate Metabolism during Exercise and Recovery in Temperate and Antarctic Scallops: An In Vivo <sup>31</sup>P-NMR Study. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(5), 622–633. <https://doi.org/10.1086/376920>
- Baldwin, J., Lee, A. K., & England, W. R. (1981). The functions of octopine dehydrogenase and D-lactate dehydrogenase in the pedal retractor muscle of the dog whelk *Nassarius coronatus* (Gastropoda: Nassariidae). *Marine Biology*, 62(4), 235–238. <https://doi.org/10.1007/BF00397689>

- Ballantyne, J. S. (2004). Mitochondria: Aerobic and anaerobic design - Lessons from molluscs and fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 139(3 SPEC.ISS.), 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.015>
- Barber, R. T. y R. L. Smith 1981. Coastal upwelling ecosystems p- 31-68. In: A. R., Longhurst (ed) Analysis of marine ecosystems. Academic Press New York
- Barber, B J, & Blake, N. J. (1985). Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. *Marine Biology*, 18, 13–18. <https://doi.org/10.1007/BF00397001>
- Barber, Bruce J., & Blake, N. J. (2006). Reproductive Physiology. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 35(C), 357–416. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(06\)80033-5](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(06)80033-5)
- Barrento, S., Lupatsch, I., Keay, A., & Christophersen, G. (2013). Metabolic rate of blue mussels (*Mytilus edulis*) under varying post-harvest holding conditions. *Aquatic Living Resources*, 26(3), 241–247. <https://doi.org/10.1051/alr/2013050>
- Barrios-Ruiz, D., Chávez-Villalba, J., & Cáceres-Martínez, C. (2003). Growth of *Nodipecten subnodosus* (Bivalvia: Pectinidae) in La Paz Bay, Mexico. *Aquaculture Research*, 34(8), 633–639. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00869.x>
- Barrios Ruiz, D., Chavez-Villalba, J., & Cáceres-Martínez, C. (2003). Growth of *Nodipecten subnodosus* ( Bivalvia :Pectinidae) in La Paz Bay, Mexico. *Aquaculture Research*, 2, 633–639.
- Barthel, D. (1984). Adenylate energy charge in three marine bivalve species during anoxia. *Ophelia*, 23(2), 155–164. <https://doi.org/10.1080/00785326.1984.10426611>
- Basso, L., Hendriks, I., Steckbauer, A., & Duarte, C. (2015). Resistance of juveniles of the Mediterranean pen shell, (*Pinna nobilis*) to hypoxia and interaction with warming. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 165, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.05.016>
- Bayne, B. (2017). *Biology of Oysters*. United Kingdom; Academic Press.
- Beis, I., & Newsholme, E. A. (1975). The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochemical Journal*, 152(1), 23–32. <https://doi.org/10.1042/bj1520023>
- Belevich, I., Verkhovskiy, M. I., & Wikström, M. (2006). Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. *Nature*, 440(7085), 829–832. <https://doi.org/10.1038/nature04619>
- Beltrán-Lugo, A. I., Maeda-Martínez, A. N., Pacheco-Aguilar, R., & Nolasco-Soria, H. G. (2006). Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). *Aquaculture*, 258(1–4), 619–632. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.039>
- Beninger, P. G., & Le Pennec, M. (2016). Chapter 3 - Scallop Structure and Function. In S. E. Shumway & G. J. B. T.-D. in A. and F. S. Parsons (Eds.), *Scallops* (Vol. 40, pp. 85–159). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62710-0.00003-1>

- Berthelin, C., Kellner, K., & Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3), 359–369. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00187-X)
- Bijma, J., Pörtner, H. O., Yesson, C., & Rogers, A. D. (2013). Climate change and the oceans - What does the future hold? *Marine Pollution Bulletin*, 74(2), 495–505. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.022>
- Blier, P. U., Abele, D., Munro, D., Degletagne, C., Rodriguez, E., & Hagen, T. (2017). What modulates animal longevity? Fast and slow aging in bivalves as a model for the study of lifespan. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 70, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.046>
- Boadas, M. A., Nusetti, O., Mundarain, F., Lodeiros, C., & Guderley, H. E. (1997). Seasonal variation in the properties of muscle mitochondria from the tropical scallop *Euvola (Pecten) ziczac*. *Marine Biology*, 128(2), 247–255. <https://doi.org/10.1007/s002270050089>
- Bonardelli, J. C., Himmelman, J. H., & Drinkwater, K. (1996). Relation of spawning of the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, to temperature fluctuations during downwelling events. *Marine Biology*, 124(4), 637–649. <https://doi.org/10.1007/BF00351045>
- Bouchard, P., & Guderley, H. (2003). Time course of the response of mitochondria from oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, 206(19), 3455 LP – 3465. <https://doi.org/10.1242/jeb.00578>
- Boutilier, R. G., & St-Pierre, J. (2002). Adaptive plasticity of skeletal muscle energetics in hibernating frogs: mitochondrial proton leak during metabolic depression. *The Journal of Experimental Biology*, 205(Pt 15), 2287–2296. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110662>
- Bozinovic, F., & Pörtner, H. O. (2015). Physiological ecology meets climate change. *Ecology and Evolution*, 5(5), 1025–1030. <https://doi.org/10.1002/ece3.1403>
- Brand AR. (2006). Scallop ecology: distributions and behaviour. In: *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. (651–744). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Brokordt, K. B., Himmelman, J. H. & Guderley, H. E. Effect of reproduction on escape responses and muscle metabolic capacities in the scallop *Chlamys islandica* Müller 1776. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 251, 205–225 (2000a).
- Brokordt, K. B., Himmelman, J. H., Nusetti, O. A., & Guderley, H. E. (2000b). Reproductive investment reduces recuperation from exhaustive escape activity in the tropical scallop *Euvola ziczac*. *Marine Biology*, 137(5–6), 857–865. <https://doi.org/10.1007/s002270000415>
- Brokordt, K., & Guderley, H. (2004). Binding of glycolytic enzymes in adductor muscle of Iceland scallop *Chlamys islandica* is altered by reproductive status. *Marine Ecology Progress Series*, 268, 141–149. <https://doi.org/10.3354/meps268141>

- Brokordt, K., Pérez, H., & Campos, F. (2013). Environmental Hypoxia Reduces the Escape Response Capacity of Juvenile and Adult Scallops *Argopecten purpuratus*. *Journal of Shellfish Research*, 32(2), 369–376. <https://doi.org/10.2983/035.032.0216>
- Brokordt, K., Pérez, H., Herrera, C., & Gallardo, A. (2015). Reproduction reduces HSP70 expression capacity in *Argopecten purpuratus* scallops subject to hypoxia and heat stress. *Aquatic Biology*, 23(3), 265–274. <https://doi.org/10.3354/ab00626>
- Bruning, A., Gaitán-Espitia, J. D., González, A., Bartheld, J. L., & Nespolo, R. F. (2013). Metabolism, growth, and the energetic definition of fitness: A quantitative genetic study in the land snail *Cornu aspersum*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 86(5), 538–546. <https://doi.org/10.1086/672092>
- Bruno, J., Carr, L., & O'Connor, M. (2015). *Exploring the role of temperature in the ocean through metabolic scaling*. 96(February 1914), 3126–3140.
- Burnett, L. E., & Stickle, W. B. (2001). Coastal Hypoxia: Consequences for Living Resources and Ecosystems. In N. N. Rabalais & R. E. Turner (Eds.), *Coastal hypoxia: consequences for living resources and ecosystems* (Vol. 58). American Geophysical Union. <https://doi.org/10.1029/CE058>
- Cáceres-Martínez, R. & Vásquez-Yeomans. (2010). Presence of epibionts and herpesvirus in the lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus*- Aquaculture 2010, World Aquaculture Society, San Diego, CA
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., & Cristobal, S. (2012). Proteomic research in bivalves. Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4346–4359. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.027>
- Carroll, J. L., & Wells, R. M. G. (1995). Strategies of anaerobiosis in New Zealand infaunal bivalves: Adaptations to environmental and functional hypoxia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 29(2), 137–146. <https://doi.org/10.1080/00288330.1995.9516649>
- Casas-Valdez, M., & Ponce-Díaz, G. (1996). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. ... , *Cib. Fao, Gob. Edo. Inst. Nac. ...*. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CIENL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008148>
- Chapman, A. G., & Atkinson, D. E. (1973). *Stabilization of Adenylate Energy Charge by the Adelynate Deaminase Reaction*. 248(23), 8309–8312.
- Chapman, A. G., Fall, L., & Atkinson, D. E. (1971). Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *Journal of Bacteriology*, 108(3), 1072–1086. <https://doi.org/10.1128/jb.108.3.1072-1086.1971>
- Chavez-Villalba, J. y C. Cáceres Martínez. 1992. Scallop culture in the Northwest of Mexico. *World Aquaculture*, 23 (4): 20-25.
- Chih, C. P., & Ellington, W. R. (1983). Division of Comparative Physiology and Biochemistry , Society for Integrative and Comparative Biology Energy Metabolism during Contractile Activity and Environmental Hypoxia in the Phasic Adductor Muscle of the Bay Scallop

- Argopecten irradians concentricu. *Physiological Zoology*, 56, 623–631.
- Clarke, A., & Fraser, K. P. P. (2004). Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*, 18(2), 243–251. <https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2004.00841.x>
- Cobbs, G. A., & Alexander, J. E. (2018). Assessment of oxygen consumption in response to progressive hypoxia. *PLoS ONE*, 13(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208836>
- Cruz-Escalona, V. H., Morales-Zárate, M. V., Navia, A. F., Rguez-Baron, J. M., & del Monte-Luna, P. (2013). Functional analysis of the food web of Bahia Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(3), 519–544. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue3-fulltext-15>
- De La Fuente, I. M., Cortés, J. M., Valero, E., Desroches, M., Rodrigues, S., Malaina, I., & Martínez, L. (2014). On the dynamics of the adenylate energy system: Homeorhesis vs homeostasis. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108676>
- de Zwaan, A., Cortesi, P., van den Thillart, G., Roos, J., & Storey, K. B. (1991). Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: A biochemical analysis. *Marine Biology*, 111(3), 343–351. <https://doi.org/10.1007/BF01319405>
- de Zwaan, A., de Bont, A. M. T., Zurburg, W., Bayne, B. L., & Livingstone, D. R. (1983). On the role of strombine formation in the energy metabolism of adductor muscle of a sessile bivalve. *Journal of Comparative Physiology ■ B*, 149(4), 557–563. <https://doi.org/10.1007/BF00690015>
- de Zwaan, A., Thompson, R. J., & Livingstone, D. R. (1980). Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus* - II. Biochemistry. *Journal of Comparative Physiology ■ B*, 137(2), 105–114. <https://doi.org/10.1007/BF00689208>
- Diario Oficial de la Federación (2012). Acuerdo por el que se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por conducto del Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). México, D.F., viernes 24 de agosto de 2012. pp. 21-128.
- Doney, S. C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N. N., Sydeman, W. J., & Talley, L. D. (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 4(1), 11–37. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041911-111611>
- Dong, L., & McPhaden, M. J. (2017). Why has the relationship between Indian and Pacific Ocean decadal variability changed in recent decades? *Journal of Climate*, 30(6), 1971–1983. <https://doi.org/10.1175/JCLI-D-16-0313.1>
- Dong, Y. wei, & Zhang, S. (2016). Ecological relevance of energy metabolism: transcriptional responses in energy sensing and expenditure to thermal and osmotic stresses in an intertidal limpet. *Functional Ecology*, 30(9), 1539–1548. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12625>
- Donovan, D. A., Bingham, B. L., From, M., Fleisch, A. E., & Loomis, E. S. (2003). Effects of barnacle encrustation on the swimming behaviour, energetics, morphometry, and drag coefficient of the scallop *Chlamys hastata*. *Journal of the Marine Biological Association of the*

United Kingdom, 83(4), 813–819. <https://doi.org/10.1017/S0025315403007847h>

- Doucet-Beaupré, H., Dubé, C., Breton, S., Pörtner, H. O., & Blier, P. U. (2010). Thermal sensitivity of metabolic enzymes in subarctic and temperate freshwater mussels (*Bivalvia: Unionoida*). *Journal of Thermal Biology*, 35(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.10.002>
- Dudognon, T., Guderley, H., Quere, C., Soudant, P., Racotta, I. S., & Kraffe, E. (2015). Laboratory conditioning modifies properties of gills mitochondria from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 162(5), 1033–1045. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2646-4>
- Dudognon, T., Lambert, C., Quere, C., Auffret, M., Soudant, P., & Kraffe, E. (2014). Mitochondrial activity, hemocyte parameters and lipid composition modulation by dietary conditioning in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(3), 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0800-1>
- Dunphy, B. J., Wells, R. M. G., & Jeffs, A. G. (2006). Oxygen consumption and enzyme activity of the subtidal flat oyster (*Ostrea chilensis*) and intertidal Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Responses to temperature and starvation. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 40(1), 149–158. <https://doi.org/10.1080/00288330.2006.9517409>
- Enomoto, T., Nakao, C., & Ohyama, H. (2000). Regulation of glycolysis during acclimation of scallops (*Patinopecten yessoensis* Jay) to anaerobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00235-2](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00235-2)
- Fearman, J., & Moltshaniwskyj, N. A. (2010). Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*, 305(1–4), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.003>
- Felix-Pico, E.F. (1991). Fisheries and aquaculture: Mexico. In: *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. (943-980) Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers,
- Félix-Pico, E.F., Villalejo-Fuerte, M., Tripp-Quezada, A., Holguin-Quiñones, O., (1999). Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended culture at the national marine park of Bahía de Loreto, B.C.S., Mexico. In: *Book of Abstracts, 12th International Pectinid Workshop*, Bergen, Norway, pp. 39-40.
- Fields, P. A., Zuzow, M. J., & Tomanek, L. (2012). Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 215(7), 1106–1116. <https://doi.org/10.1242/jeb.062273>
- Fischer w, F Krupp, W., Schneider, C., Sommer, K. E., Carpenter y U. H. Niem. (1995). Guía fao para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro Oriental. Vols. ii y iii. pp: 644-1813
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J. Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., & Huvet, A. (2010). Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Marine Biotechnology*, 12(3), 326–339. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9227-9>

- Frederich, M., & Pörtner, H. O. (2000). Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 279(5 48-5), 1531–1538. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.r1531>
- Gäde, G. (1983). Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *Journal of Experimental Zoology*, 228(3), 415–429. <https://doi.org/10.1002/jez.1402280304>
- Galindo, F., & Flores Urbina, A. (2006). De la energética a la neurotransmisión: El adenosín trifosfato y sus receptores. *Revista de Neurología*, 43(11), 667–677.
- García-Domínguez, F. A., P. Castro-Moroyoqui & E. F. Félix-Pico. (1992). Spat settlement and early growth of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in Laguna Ojo de Liebre, B.C. México, 1989-1990. In: Triennial Meeting National Shellfisheries Association, Orlando, Florida. *Journal of Shellfish Resources*, 11:195.
- Giesy, J. P., & Dickson, G. W. (1981). The effect of season and location on phosphoadelynate concentrations and adelynate energy charge in two species of freshwater clams. *Oecologia*, 49: 1–7.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Eric, L. (2001). *Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate*. 293(5538), 2248–2251.
- González-Ortiz, L., Hernández-Alcántara, P., Vázquez-Juárez, R., Quiroz-Guzmán, E., García-Garza, M. E., & de León-González, J. Á. (2017). Variación espacial y temporal de la infestación de la concha por *Polydora* sp. (Spionidae: Polychaeta) sobre la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en la laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(4), 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.017>
- Gonzalez-Estrada F. (2003) Temperaturas letales y temperatura óptima para crecimiento en una población de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835). Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Gosling, J. (2015). Reproduction, settlement and recruitment. In: *Marine bivalve mollusk* (157-189). United Kingdom: John Wiley & Sons <https://doi.org/10.1002/9781119045212>.
- Götze, S., Bock, C., Eymann, C., Lannig, G., Steffen, J. B. M., & Pörtner, H. O. (2020). Single and combined effects of the “Deadly trio” hypoxia, hypercapnia and warming on the cellular metabolism of the great scallop *Pecten maximus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 243–244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110438>
- Greenway, S. C., & Storey, K. B. (2000). Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 170(4), 285–293. <https://doi.org/10.1007/s003600000098>
- Greenway, Steven C., & Storey, K. B. (1999). The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 242(2), 259–272. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00103-3)

- Grieshaber, M. (1978). Breakdown and formation of high-energy phosphates and octopine in the adductor muscle of the scallop, *Chlamys opercularis* (L.), during escape swimming and recovery. *Journal of Comparative Physiology* □ *B*, 126(3), 269–276. <https://doi.org/10.1007/BF00688937>
- Grieshaber, M., & Gäde, G. (1977). Energy supply and the formation of octopine in the adductor muscle of the scallop, *Pecten jacobaeus* (Lamarck). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 58(3), 249–252. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(77\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90198-5)
- Grieshaber, M. K., Hardewig, I., Kreutzer, U., & Pörtner, H. O. (1994). Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 125(May 2016), 43–147. <https://doi.org/10.1007/BFb0030909>
- Grubert, M. A., & Ritar, A. J. (2005). The effect of temperature and conditioning interval on the spawning success of wild-caught blacklip (*Haliotis rubra*, Leach 1814) and greenlip (*H. laevigata*, Donovan 1808) abalone. *Aquaculture Research*, 36(7), 654–665. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01269.x>
- Guderley, H. (2004). Locomotor performance and muscle metabolic capacities: Impact of temperature and energetic status. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 139(3 SPEC.ISS.), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.04.001>
- Guderley, H., & Pörtner, H. O. (2010). Metabolic power budgeting and adaptive strategies in zoology: Examples from scallops and fish. *Canadian Journal of Zoology*, 88(8), 753–763. <https://doi.org/10.1139/Z10-039>
- Guderley, H. E. & Tremblay, I. (2016). Swimming in scallops. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (535-566). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62710-0.00012-2>
- Guderley, H., & St-Pierre, J. (2002). Going with the flow or life in the fast lane: Contrasting mitochondrial responses to thermal change. *Journal of Experimental Biology*, 205(15), 2237–2249.
- Guppy, M. (2004). The biochemistry of metabolic depression: A history of perceptions. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 139(3 SPEC.ISS.), 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.02.019>
- Guppy, M., & Withers, P. (1999). Metabolic depression in animals: Physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological Reviews*, 74(1), 1–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00180.x>
- Gurr, S. J., Goleski, J., Lima, F. P., Seabra, R., Gobler, C. J., & Volkenborn, N. (2018). Cardiac responses of the bay scallop *Argopecten irradians* to diel-cycling hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 500(August 2017), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.12.011>
- Harshman, L. G., & Zera, A. J. (2007). The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(2), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.10.008>

- Heilmayer, O., & Brey, T. (2003). Saving by freezing? Metabolic rates of *Adamussium colbecki* in a latitudinal context. *Marine Biology*, *143*(3), 477–484. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1079-7>
- Heilmayer, O., Brey, T., & Pörtner, H. O. (2004). Growth efficiency and temperature in scallops: A comparative analysis of species adapted to different temperatures. *Functional Ecology*, *18*(5), 641–647. <https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2004.00905.x>
- Hernández-Trujillo, S., Esqueda-Escárcega, G., & Palomares-García, R. (2010). Variabilidad de la abundancia de zooplancton en Bahía Magdalena Baja California Sur, México (1997-2001). *Latin American Journal of Aquatic Research*, *38*(3), 438–446. <https://doi.org/10.3856/vol38-issue3-fulltext-8>
- Herreid Clyde F. (1980). Hypoxia in invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *67A*, 311–320.
- Hilbish, T. J., Brannock, P. M., Jones, K. R., Smith, A. B., Bullock, B. N., & Wetthey, D. S. (2010). Historical changes in the distributions of invasive and endemic marine invertebrates are contrary to global warming predictions: The effects of decadal climate oscillations. *Journal of Biogeography*, *37*(3), 423–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02218.x>
- Hochachka, P. W., & Lutz, P. L. (2001). Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals☆. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *130*(4), 435–459. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00408-0](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00408-0)
- Hochachka, P. W & Somero, G. N. ( 2002). *Biochemical adaptation. mechanism and Process in physiological evolution*. New York, The United States: Oxford University Press.
- Holguin-Quiñones, O. E. & García-Domínguez, F. A. (1997). Lista anotada de las especies de moluscos recolectadas en la Bahía de La Paz, BCS Revista *La Bahía de la Paz, Investigación y Conservación*. UABCS/CICIMAR/Scripps Institution of Oceanography, La Paz, BCS, México pp. 93-117.
- Ioannou, S., Anestis, A., Pörtner, H. O. & Michaelidis, B. (2009). Seasonal patterns of metabolism and the heat shock response (HSR) in farmed mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *381*, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.09.014>
- IPCC, 2014: Climate Change 2014. Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II, and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds. Core Writing Team, R. K. Pachauri & Meyer, L. A.) 40–54 (IPCC, 2014).
- IPCC, 2019. Summary for Policymakers. In: Pörtner, H.-O., Roberts, D.C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E. ... Weyer, N.M. (Eds.), IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate, In press. <https://www.ipcc.ch/srocc/chapter/summary-for-policymakers/>.
- Isani, G., Serra, R., Cattani, O., Cortesi, P., & Carpena, E. (1997). Adenylate Energy Charge and Metallothionein as Stress Indices in *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Cadmium and Anoxia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *77*(4), 1187–1197. <https://doi.org/10.1017/S0025315400038704>

- Ivanina, A. V., & Sokolova, I. M. (2016). Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress and protein degradation in molluscan mitochondria. *Journal of Experimental Biology*, *219*, 3794–3802. <https://doi.org/10.1242/jeb.146209>
- Ivanovici, A. M. (1980). Application of adenylate energy charge to problems of environmental impact assessment in aquatic organisms. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, *33*(1–4), 556–565. <https://doi.org/10.1007/BF02414779>
- Jiang, W., Li, J., Gao, Y., Mao, Y., Jiang, Z., Du, M., Zhang, Y., & Fang, J. (2016). Effects of temperature change on physiological and biochemical responses of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Aquaculture*, *451*, 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.012>
- Johnston, I. A., Calvo, J., Guderley, H., Fernandez, D., & Palmer, L. (1998). Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *Journal of Experimental Biology*, *201*(1), 1–12.
- Kawabe, S., Takada, M., Shibuya, R., & Yokoyama, Y. (2010). Biochemical changes in oyster tissues and hemolymph during long-term air exposure. *Fisheries Science*, *76*(5), 841–855. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0263-1>
- Keen A.M. (1972). *Sea Shells of Tropical West America*. Stanford, CA: Stanford University Press.
- Keller, M. (2004). Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *Journal of Experimental Biology*, *207*(14), 2529–2538. <https://doi.org/10.1242/jeb.01050>
- Kleinman S, Hatcher B. G., Scheibling R. E., Taylor, L.H, & Hennigar, A. W. (1996a) Shell and tissue growth of juvenile sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in suspended and bottom culture in Lunenburg Bay, Nova Scotia. *Aquaculture*, *142*: 75-97.
- Kleinman, S., Hatcher, B. G., & Scheibling, R. E. (1996b). Growth and content of energy reserves in juvenile sea scallops, *Placopecten magellanicus*, as a function of swimming frequency and water temperature in the laboratory. *Marine Biology*, *124*(4), 629–635. <https://doi.org/10.1007/bf00351044>
- Koch, V., Rengstorf, A., Taylor, M., Mazón-Suástegui, J. M., Sinsel, F., & Wolff, M. (2015). Comparative growth and mortality of cultured Lion's Paw scallops (*Nodipecten subnodosus*) from Gulf of California and Pacific populations and their reciprocal transplants. *Aquaculture Research*, *46*(1), 185–201. <https://doi.org/10.1111/are.12175>
- Koch, V., Suástegui, J. M. M., Sinsel, F., Mungaray, M. R., & Dunn, D. (2005). Lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835) aquaculture in Bahía Magdalena, Mexico: Effects of population density and season on juvenile growth and mortality. *Aquaculture Research*, *36*(5), 505–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01247.x>
- Kraffe, E., Tremblay, R., Belvin, S., LeCoz, J. R., Marty, Y., & Guderley, H. (2008). Effect of reproduction on escape responses, metabolic rates and muscle mitochondrial properties in the scallop *Placopecten magellanicus*. *Marine Biology*, *156*(1), 25–38. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1062-4>

- Kreutzer, U., Siegmund, B. R., & Grieshaber, M. K. (1989). Parameters controlling opine formation during muscular activity and environmental hypoxia. *Journal of Comparative Physiology B*, 159(5), 617–628. <https://doi.org/10.1007/BF00694388>
- Labrecque, A. A., & Guderley, H. (2011). Size, muscle metabolic capacities and escape response behaviour in the giant scallop. *Aquatic Biology*, 13(1), 51–64. <https://doi.org/10.3354/ab00342>
- Lardies, M. A., Benitez, S., Osoro, S., Lardies, M. A., Benitez, S., Osoro, S., Lagos, N. A., Vargas, C. A., Duarte, C., & Lohrmann, K. B. (2017). Physiological and histopathological impacts of increased carbon dioxide and temperature on the scallops *Argopecten purpuratus* cultured under upwelling influences in northern Chile. *Aquaculture*, 479(December 2016), 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.008>
- Lesser, M. P., & Kruse, V. A. (2004). Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: Metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 137(3), 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.10.022>
- Li, Y., Qin, J. G., Abbott, C. A., Li, X., & Benkendorff, K. (2007). Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(6), R2353–R2362. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00463.2007>
- Li, Q., Zhang, F., Wang, M., Li, M. & Sun, S. (2019). Effects on hypoxia on survival, behavior, and metabolism of zhikong scallop *Chlamys farreri* Jones et Preston 1904. *Journal of Oceanology and Limnology*, 38: 351–363. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-9074-0>
- Livingstone, D. R., & Bayne, B. L. (1977). Responses of *Mytilus edulis* L. to low oxygen tension: Anaerobic metabolism of the posterior adductor muscle and mantle tissues. *Journal of Comparative Physiology ■ B*, 114(2), 143–155. <https://doi.org/10.1007/BF00688965>
- Livingstone, D. R., de Zwaan, A., & Thompson, R. J. (1981). Aerobic metabolism, octopine production and phosphoarginine as sources of energy in the phasic and catch adductor muscles of the giant scallop *placopecten magellanicus* during swimming and the subsequent recovery period. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 70(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90120-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90120-6)
- Lodeiros, C. J., Rengel, J. J., Guderley, H. E., Nusetti, O., & Himmelman, J. H. (2001). Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture*, 199(1–2), 63–72. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00505-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00505-1)
- Long, W. C., & Seitz, R. D. (2008). Trophic interactions under stress: Hypoxia enhances foraging in an estuarine food web. *Marine Ecology Progress Series*, 362, 59–68. <https://doi.org/10.3354/meps07395>
- Lv, Z., Qiu, L., Wang, W., Liu, Z., Xue, Z., Yu, Z., Song, X., Chen, H., Wang, L., & Song, L. (2017). A GTP-dependent Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from *Crassostrea gigas* Involved in Immune Recognition. *Developmental and Comparative Immunology*, 77, 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.001>

- MacDonald, B. A., Bricelj V. M. & Shumway S. E. (2016). Physiology: energy acquisition and utilisation. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 40. Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture and Fisheries*. (301 - 353). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Maldonado-Amparo, R., J.L. Ramírez, S. Ávila & A.M. Ibarra. 2004. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture*. 235:185-205.
- Maguire, J A, Fleury, P. G., & Burnell, G. M. (1999). Some methods for quantifying quality in the scallop *Pecten maximus* (L.). *Journal of Shellfish Research*, 18(1), 59–66. [papers2://publication/uuid/696322A6-A8CA-4D19-A3C2-65104E35B47C](https://doi.org/10.1006/j.sres.1999.00332)
- Maguire, Julie A., Cashmore, D., & Burnell, G. M. (1999). The effect of transportation on the juvenile scallop *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture Research*, 30(5), 325–333. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00332.x>
- Mantle, B. L., Guderley, H., Hudson, N. J., & Franklin C. E. (2010). Enzyme activity in the aestivating green-striped burrowing frog (*Cyclorana alboguttata*). *Journal of Comparative Physiology, Part B*, 180: 1033-1043. <http://doi.org/10.1007/s00360-010-0471-0>
- Martínez, G., Brokordt, K., Aguilera, C., Soto, V., & Guderley, H. (2000). Effect of diet and temperature upon muscle metabolic capacities and biochemical composition of gonad and muscle in *Argopecten purpuratus* Lamarek 1819. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247(1), 29–49. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00143-X)
- Martínez, G., & Pérez, H. (2003). Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*, 228(1–4), 153–167. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00321-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00321-1)
- Massó-Rojas, J.A., Morales-Bojórquez, E., Talavera-Mayer, J., Fajardo-León, M., Hernández-Valenzuela, R., (2000). La Pesquería de Almeja Mano de León, Baja California. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México, Evaluación y Manejo. Instituto Nacional de Pesca, SAGARPA, México, pp. 349-366.
- Minchin, D. (2003) Introductions: some biological and ecological characteristics of scallops. *Aquatic Living Resources*, 16:521–532
- Miller, N. A., Chen, X., & Stillman, J. H. (2014). Metabolic physiology of the invasive clam, *Potamocorbula amurensis*: The interactive role of temperature, salinity, and food availability. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091064>
- Moal, J., Le Coz, J. R., Samain, J. F., & Daniel, J. Y. (1989a). Nucleotides in bivalves: Extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 93(2), 307–316. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90086-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90086-2)
- Moal, J., Samain, J. F., Le Coz, J. R., & Daniel, J. Y. (1989b). Physiological response of *Crassostrea gigas* to tidal emersion. *Topics in Marine Biology*, 53(2–3), 699–704.

- Morley, S. A., Lurman, G. J., Skepper, J. N., Pörtner, H. O., & Peck, L. S. (2009). Thermal plasticity of mitochondria: A latitudinal comparison between Southern Ocean molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 152(3), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.015>
- Muller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M., & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444–495. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05024-11>
- Mustafa, T., & Hochachka, P. W. (1973). Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs-II. Basic catalytic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase in oyster adductor muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 45(3), 639–655. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(73\)90203-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(73)90203-4)
- Nava-Gómez, G. E.. (2019). Desarrollo larval y sustratos energéticos de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Navarro, J. M., Fernández-Reiriz, M. J., & Labarta, U. (2004). Short-term feeding response of the scallop *Argopecten purpuratus* exposed to two different diets. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 84(4), 775–779. <https://doi.org/10.1017/S0025315404009919h>
- Neff, E., MacGregor, J., & Gedan, K. B. (2020). Effects of Short-Duration and Diel-Cycling Hypoxia on Predation of Mussels and Oysters in Two Tributaries of the Chesapeake Bay. *Diversity*, 12(3), 87. <https://doi.org/10.3390/d12030087>
- Osuna-García, M., Hernandez-Llamas, A., & Mazón-Suástegui, J. M. (2008). Production dynamics of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* cultivated off-bottom. *Aquaculture*, 274(2–4), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.028>
- Pacheco-Aguilar, R. et al. Postmortem changes in the adductor muscle of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) during ice storage. *Food Chem.* 106, 253–259 (2008).
- Payne, N. L., Smith, J. A., van der Meulen, D. E., Taylor, M. D., Watanabe, Y. Y., Takahashi, A., Marzullo, T. A., Gray, C. A., Cadiou, G., & Suthers, I. M. (2016). Temperature dependence of fish performance in the wild: Links with species biogeography and physiological thermal tolerance. *Functional Ecology*, 30(6), 903–912. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12618>
- Peck, L. S., Clark, M. S., Morley, S. A., Massey, A., & Rossetti, H. (2009). Animal temperature limits and ecological relevance: Effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology*, 23(2), 248–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01537.x>
- Pérez, H. M., Janssoone, X., & Guderley, H. (2008). Tonic contractions allow metabolic recuperation of the adductor muscle during escape responses of giant scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360(2), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.04.006>

- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., & Guderley, H. (2007a). Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology*, 210(17), 2999–3014. <https://doi.org/10.1242/jeb.006007>
- Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., & Guderley, H. (2007b). Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: Energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology*, 210(17), 2999–3014. <https://doi.org/10.1242/jeb.006007>
- Pernet, F., Tremblay, R., Gionet, C., & Landry, T. (2006). Lipid remodeling in wild and selectively bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *Journal of Experimental Biology*, 209(23), 4663–4675. <https://doi.org/10.1242/jeb.02581>
- Peruzza, L., Gerdol, M., Oliphant, A., Wilcockson, D., Pallavicini, A., Hawkins, L., Thatje, S., & Hauton, C. (2018). The consequences of daily cyclic hypoxia on a European grass shrimp: From short-term responses to long-term effects. *Functional Ecology*, 32(10), 2333–2344. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13150>
- Petersen, J. L., Ibarra, A. M., Ramirez, J. L., & May, B. (2008). An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *The Journal of Heredity*, 99(4), 337–348. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn012>
- Petes, L. E., Menge, B. A., & Harris, A. L. (2008). Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. *Ecological Monographs*, 78(3), 387–402. <https://doi.org/10.1890/07-0605.1>
- Phillip, E., Brey T., Heilmayer, O., Abele, D. & Pörtner H. O. (2006). Physiological ageing in a temperate and polar swimming scallop. *Marine Ecology Progress Series*, 307: 187-198. <https://doi.org/10.3354/meps307187>
- Phillip, E., E, R., Schmidt, M., Gsottbauer, C., Sängler, A. M., Abele, D. (2008). Size and age-dependent changes in adductor muscle swimming physiology of the scallop *Aequipecten operculatus*. *The Journal of Experimental Biology*, 211: 2492-2501. <https://doi.org/10.1242/jeb.015966>.
- Pichaud, N., Briatte, S., Desrosiers, V., Pellerin, J., Fournier, M., & Blier, P. U. (2009). Metabolic Capacities and Immunocompetence of Sea Scallops (*Placopecten magellanicus*, Gmelin) at Different Ages and Life Stages. *Journal of Shellfish Research*, 28(4), 865–876. <https://doi.org/10.2983/035.028.0416>
- Poloczanska, E. S., Brown, C. J., Sydeman, W. J., Kiessling, W., Schoeman, D. S., Moore, P. J., Brander, K., Bruno, J. F., Buckley, L. B., Burrows, M. T., Duarte, C. M., Halpern, B. S., Holding, J., Kappel, C. V., O'Connor, M. I., Pandolfi, J. M., Parmesan, C., Schwing, F., Thompson, S. A., & Richardson, A. J. (2013). Global imprint of climate change on marine life. *Nature Climate Change*, 3(10), 919–925. <https://doi.org/10.1038/nclimate1958>
- Ponce-Díaz G. A., Massó-Rojas, E. F. Félix-Pico, M.V., Morales-Zárate, N. García, C. Lodeiros-Seijo & S. E. Lluch-Cota. (2011). *Nodipecten spp.* como recurso pesquero. En: *Biología y cultivo de los moluscos Pectínidos del género Nodipecten* (11-26). México:Limusa.

- Porteus, C., Hedrick, M. S., Hicks, J. W., Wang, T., & Milsom, W. K. (2011). Time domains of the hypoxic ventilatory response in ectothermic vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 181(3), 311–333. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0554-6>
- Portner, H.-O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4), 137–146. <https://doi.org/10.1007/s001140100216>
- Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 132(4), 739–761. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4)
- Portner, H. O., & Farrell, A. P. (2008). Physiology and climate change. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 322(5902), 690–692. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pörtner, H. O., Finke, E. & Lee, P. G. Metabolic and energy correlates of intracellular pH in progressive fatigue of squid (*L. brevis*) mantle muscle. *Am. J. Physiol.* 271, R1403–R1414 (1996).
- Pörtner, H. O., Heisler, N., & Grieshaber, M. K. (1984). Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: a theoretical analysis of proton generation by anaerobic metabolism. *Journal of Comparative Physiology B*, 155(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/BF00688785>
- Pörtner, H. O., Peck, L., Zielinski, S., & Conway, L. Z. (1999). Intracellular pH and energy metabolism in the highly stenothermal Antarctic bivalve *Limopsis marionensis* as a function of ambient temperature. *Polar Biology*, 22(1), 17–30. <https://doi.org/10.1007/s003000050386>
- Pörtner, H O. (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 881–893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Pörtner, Hans O. (2008). Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series*, 373, 203–217. <https://doi.org/10.3354/meps07768>
- Pörtner, Hans O. (2012). Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: Unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Marine Ecology Progress Series*, 470, 273–290. <https://doi.org/10.3354/meps10123>
- Pörtner, Hans O., Bock, C., & Mark, F. C. (2017). Oxygen- & capacity-limited thermal tolerance: Bridging ecology & physiology. *Journal of Experimental Biology*, 220(15), 2685–2696. <https://doi.org/10.1242/jeb.134585>
- Rabalais, N. N., Cai, W. J., Carstens, J., Conley, D. J., Fry, B., Hu, X., Quiñones-Rivera, Z., Rosenberg, R., Slomp, C. P., Turner, R. E., Voss, M., Wissel, B., & Zhang, J. (2014). Eutrophication-driven deoxygenation in the coastal ocean. *Oceanography*, 27(1), 172–183. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2014.21>

- Racotta, I. S., Ramirez, J. L., Ibarra, A. M., Rodríguez-Jaramillo, M. C., Carreño, D., & Palacios, E. (2003). Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. *Aquaculture*, *217*(1–4), 335–349. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00366-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00366-6)
- Ramagli L.S. (1999). Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. In: 2-D proteome analysis protocols, *Methods in molecular biology* (99–103). Switzerland: Humana Press.
- Ramírez-Arce, J. L. (2009). Evaluación de la ventaja productiva y grado de esterilidad en triploides de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) como alternativa para el cultivo en el parque nacional Bahía de Loreto, Golfo de California Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas..
- Reinecke-Reyes, M. A. 1996. Madurez y desove de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* Sowerby 1835 (Bivalvia:Pectinidae) en la laguna Ojo de Liebre B. C. S, Mexico In: C. E. Castro-Aguirre, editor: *Boletín Pesquero SERMANAP/INP-CRIP-La Paz*, B. C. S., Mexico. 17-20
- Revilla, J., Márquez, A., Lodeiros, C., & Sonnenholzner, S. (2019). Experimental cultures of giant lion's paw *nodipecten subnodosus* in equatorial waters of the eastern pacific: Progress in larval development and suspended culture. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *47*(5), 818–825. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue5-fulltext-11>
- Rezende, E. L., Tejedo, M., & Santos, M. (2011). Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: Methodological problems and evolutionary implications. *Functional Ecology*, *25*(1), 111–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01778.x>
- Riascos V, J. M. (2006). Effects of El Niño-Southern oscillation on the population dynamics of the tropical bivalve *Donax dentifer* from Málaga bay, Colombian Pacific. *Marine Biology*, *148*(6), 1283–1293. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0165-4>
- Robles-Romo, A., Arjona, O., & Racotta, I. S. (2014). Influence of sampling, storage, processing and optimal experimental conditions on adenylate energy charge in penaeid shrimp. *Archives of Biological Sciences*, *66*(2), 651–666. <https://doi.org/10.2298/ABS1402651R>
- Robles-Romo, A., Zenteno-Savín, T., & Racotta, I. S. (2016). Bioenergetic status and oxidative stress during escape response until exhaustion in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *478*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.01.016>
- Rodríguez-Padilla, I. (2013). Analisis estadstico de la distribucion espacial y temporal (2008 - 2010) de la temperatura y salinidad en la laguna Ojo de Liebre, BajaCalifornia Sur. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara.
- Rohr, J. R., Civitello, D. J., Cohen, J. M., Roznik, E. A., Sinervo, B., & Dell, A. I. (2018). The complex drivers of thermal acclimation and breadth in ectotherms. *Ecology Letters*, *21*(9), 1425–1439. <https://doi.org/10.1111/ele.13107>
- Rosewarne, P. J., Wilson, J. M., & Svendsen, J. C. (2016). Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: a student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers. *Journal of Fish Biology*, *88*(1), 265–283. <https://doi.org/10.1111/jfb.12795>

- Ruiz-Verdugo, C. A., Koch, V., Félix-Pico, E., Beltran-Lugo, A. I., Cáceres-Martínez, C., Mazon-Suastegui, J. M., Robles-Mungaray, M., & Cáceres-Martínez, J. (2016). Scallop Fisheries and Aquaculture in Mexico. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 40(1989), 1111–1125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62710-0.00029-8>
- Saborowski, R., & Buchholz, F. (2002). Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. *Marine Biology*, 140(3), 557–565. <https://doi.org/10.1007/s00227-001-0734-0>
- Salgado-García, R. L., Kraffe, E., Maytorena-Verdugo, C. I., Rivera-Camacho, A. R., Sicard, M. T., Arellano-Martínez, M., & Racotta, I. S. (2020). Metabolic responses of adult lion's paw scallops *Nodipecten subnodosus* exposed to acute hyperthermia in relation to seasonal reproductive effort. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59242-6>
- Sánchez-Montante, O., O. Zaitsev & M. Saldívar-Reyes. 2007. Condiciones hidrofísicas en el sistema lagunar Bahía Magdalena-Almejas. En: R. Funes-Rodríguez, J. Gómez-Gutiérrez & R. Palomares-García (eds.). Estudios ecológicos en Bahía Magdalena, IPN-CICIMAR, La Paz Baja California Sur, México, pp. 1-28.
- Sastry, A. N. (1970). Reproductive physiological variation in latitudinally separated populations of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biological Bulletin*, 138: 56–65.
- Schmidt-Nielsen, K. (1979.) *Animal physiology: adaptation and environment*. Cambridge, England. Cambridge University Press.
- Schmidt, M., Philipp, E. E. R., & Abele, D. (2008). Size and age-dependent changes of escape response to predator attack in the Queen scallop *Aequipecten opercularis*. *Marine Biology Research*, 4(6), 442–450. <https://doi.org/10.1080/17451000802270346>
- Seibel, B. A., Hafker, N. S., Trubenbach, K., Zhang, J., Tessier, S. N., Portner, H.-O., Rosa, R., & Storey, K. B. (2014). Metabolic suppression during protracted exposure to hypoxia in the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, living in an oxygen minimum zone. *Journal of Experimental Biology*, 217(14), 2555–2568. <https://doi.org/10.1242/jeb.100487>
- Seibel, Brad A., Dymowska, A., & Rosenthal, J. (2007). Metabolic temperature compensation and coevolution of locomotory performance in pteropod molluscs. *Integrative and Comparative Biology*, 47(6), 880–891. <https://doi.org/10.1093/icb/icm089>
- Sicard-gonzález, M. T., Tripp-Valdez, M. A., Maeda-Martínez, A., & Lluch-cota, S. E. (2012). Coastal sea surface temperature records along the Baja California Peninsula. *CICIMAR Océanides*, 27(2), 65–69.
- Sinclair, B. J., Marshall, K. E., Sewell, M. A., Levesque, D. L., Willett, C. S., Slotsbo, S., Dong, Y., Harley, C. D. G., Marshall, D. J., Helmuth, B. S., & Huey, R. B. (2016). Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecology Letters*, 19(11), 1372–1385. <https://doi.org/10.1111/ele.12686>
- Smith, E., & Morrison, J. F. (1969). Kinetic Studies on the Arginine Kinase Reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(15), 4224–4234.

- Sokolova, I. M. (2003). Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *Journal of Experimental Biology*, 206(1), 195–207. <https://doi.org/10.1242/jeb.00054>
- Sommer, A. M., & Pörtner, H. O. (2004). Mitochondrial function in seasonal acclimatization versus latitudinal adaptation to cold in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(2), 174–186. <https://doi.org/10.1086/381468>
- Stewart, J. M., Brass, M. E., Carlin, R. C., & Black, H. (1992). Maximal enzyme activities of energy production pathways in the heart, hepatopancreas, and white muscle of the giant scallop (*Placopecten magellanicus*) and lobster (*Homarus americanus*). *Canadian Journal of Zoology*, 70(4), 720–724. <https://doi.org/10.1139/z92-106>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2004b). Metabolic rate depression in animals: Transcriptional and translational controls. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(1), 207–233. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006195>
- Strahl, J., Dringen, R., Schmidt, M. M., Hardenberg, S., & Abele, D. (2011). Metabolic and physiological responses in tissues of the long-lived bivalve *Arctica islandica* to oxygen deficiency. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 158(4), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.015>
- Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. (1972). Determination of particulate materials, pigment analysis. In: *A practical handbook of seawater analysis*. (175-185). Canada: Fisheries Research Board of Canada.
- Sukhotin, A. A. A., Abele, D., Pörtner, H., Sukhotin, A. A., Abele, D., & Pörtner, H. (2006). Ageing and Metabolism of *Mytilus Edulis*: Populations From Various Climate Regimes. *Journal of Shellfish Research*, 25(3), 893–899. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[893:aamome\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[893:aamome]2.0.co;2)
- Sussarellu, R., Dudoignon, T., Fabioux, C., Soudant, P., Moraga, D., & Kraffe, E. (2013). Rapid Mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, 216(9), 1561–1569. <https://doi.org/10.1242/jeb.075879>
- Tejada, M. (2009). ATP-derived products and K-value determination. In: *Fishery Products: Quality, safety and authenticity*. Eds. Harmut Rehbein & Jörg Oehlenschläger.. (68–88). United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd.
- Thompson, E. L., Taylor, D. A., Nair, S. V., Birch, G., Coleman, R., & Raftos, D. A. (2012). Optimal acclimation periods for oysters in laboratory-based experiments. *Journal of Molluscan Studies*, 78(3), 304–307. <https://doi.org/10.1093/mollus/ey012>
- Thompson, R. J., Livingstone, D. R., & de Zwaan, A. (1980). Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus* - I. Physiology. *Journal of Comparative Physiology* ■ B, 137(2), 97–104. <https://doi.org/10.1007/BF00689207>
- Tomanek, L. (2012). Environmental proteomics of the mussel *mytilus*: Implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. *Integrative*

and *Comparative Biology*, 52(5), 648–664. <https://doi.org/10.1093/icb/ics114>

- Tomanek, L. (2014). Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *Journal of Proteomics*, 105, 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.009>
- Tremblay, I., & Guderley, H. E. (2014). Scallops show that muscle metabolic capacities reflect locomotor style and morphology. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(2), 231–244. <https://doi.org/10.1086/674107>
- Tremblay, I., Guderley, H. E., & Fréchette, M. (2006). Swimming Performance, Metabolic Rates, and Their Correlates in the Iceland Scallop *Chlamys islandica*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(6), 1046–1057. <https://doi.org/10.1086/507780>
- Tripp-Valdez, M. A., Bock, C., Lannig, G., Koschnick, N., Pörtner, H. O., & Lucassen, M. (2019). Assessment of muscular energy metabolism and heat shock response of the green abalone *Haliotis fulgens* (Gastropoda: Philipi) at extreme temperatures combined with acute hypoxia and hypercapnia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 227, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.08.009>
- Tripp-Valdez, M. A., Bock, C., Lucassen, M., Lluch-Cota, S. E., Sicard, M. T., Lannig, G., & Pörtner, H. O. (2017). Metabolic response and thermal tolerance of green abalone juveniles (*Haliotis fulgens*: Gastropoda) under acute hypoxia and hypercapnia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 497(December 2016), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.09.002>
- Trueblood, L. A., & Seibel, B. A. (2014). Slow swimming, fast strikes: effects of feeding behavior on scaling of anaerobic metabolism in epipelagic squid. *Journal of Experimental Biology*, 217(15), 2710–2716. <https://doi.org/10.1242/jeb.106872>
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13(9), 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Ulrich, P. N., & Marsh, A. G. (2008). Proteome Assay of Temperature Stress and Protein Stability in Extreme Environments: Groundwork with the Heat Stress Response of the Bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Shellfish Research*, 27(1), 241–246. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[241:PAOTSA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[241:PAOTSA]2.0.CO;2)
- Vaquer-Sunyer, R., & Duarte, C. M. (2008). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15452–15457. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105>
- Velázquez-Abunader, I., López-Rocha, J. A., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B. P., & Cabrera, M. A. (2016). Estimation of growth parameters in a wild population of lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in Bahía de Los Angeles, Baja California, Mexico. *Hidrobiologica*, 26(1), 133–142. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcb/hidro/2016v26n1/velazquez>
- Venter, L., Loots, D. T., Mienie, L. J., Jansen van Rensburg, P. J., Mason, S., Vosloo, A., & Lindeque, J. Z. (2018). Uncovering the metabolic response of abalone (*Haliotis midae*) to environmental hypoxia through metabolomics. *Metabolomics*, 14(4), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1346-8>

- Verberk, W. C. E. P., Durance, I., Vaughan, I. P., & Ormerod, S. J. (2016). Field and laboratory studies reveal interacting effects of stream oxygenation and warming on aquatic ectotherms. *Global Change Biology*, 22(5), 1769–1778. <https://doi.org/10.1111/gcb.13240>
- Verberk, W. C. E. P., Leuven, R. S. E. W., van der Velde, G., & Gabel, F. (2018). Thermal limits in native and alien freshwater peracarid Crustacea: The role of habitat use and oxygen limitation. *Functional Ecology*, 32(4), 926–936. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13050>
- Verdelhos, T., Marques, J. C., & Anastácio, P. (2015). Behavioral and mortality responses of the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule* to temperature, as indicator of climate change's potential impacts. *Ecological Indicators*, 58, 95–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.042>
- Viant, M. R., Rosenblum, E. S., & Tjeerdema, R. S. (2001). Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 765(1), 107–111. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00428-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00428-5)
- Villa-Guerrero, A. (2019). *Circulación por marea y transporte de sedimento en el sistema lagunar Ojo de Liebre-Guerrero Negro*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.
- Villalejo-Fuerte, M., Arellano-Martínez, M., Robles-Mungaray, M., & Ceballos-Vázquez, B. P. (2004). Notes on the growth, survival, and reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* maintained in a suspended culture. *Hidrobiológica*, 14(2), 161–165.
- Vosloo, A., Laas, A., & Vosloo, D. (2013). Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Differential responses of juvenile and adult South African abalone ( *Haliotis midae* Linnaeus ) to low and high oxygen levels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 164(1), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.09.002>
- Williams, J. R., & Babcock, R. C. (2005). Assessment of size at maturity and gonad index methods for the scallop *Pecten novaezelandiae*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 39(4), 851–864. <https://doi.org/10.1080/00288330.2005.9517357>
- Woll, A. K., & Bakke, S. (2017). Stress and mortality in the supply chain of live scallops *Pecten maximus* L., from scuba diver to market. *Aquaculture Research*, 48(2), 594–607. <https://doi.org/10.1111/are.12906>
- Wongso, S., Ushio, H., & Yamanaka, H. (1999). Glycolytic enzymes in the tissues of three species of scallop (Bivalvia: Pectinidae). *Fisheries Science*, 65(1), 123–128. <https://doi.org/10.2331/fishsci.65.123>
- Yee-Duarte, J. A. . C.-V. B. P. & M. A.-M. (2009). Variation in the morphophysiological indices of the lion paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in Bahía de los Ángeles, B.C., Gulf of California. *CICIMAR Océánides*, 24(2), 91–99. [http://www.cicimar.ipn.mx/oacis/Medios/oceanides/P\\_091-099.pdf](http://www.cicimar.ipn.mx/oacis/Medios/oceanides/P_091-099.pdf)
- Zippay, M. L., & Helmuth, B. (2012). Effects of temperature change on mussel, *Mytilus*. *Integrative Zoology*, 7(3), 312–327. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2012.00310.x>

## XII. ANEXOS

---

### ANEXO 1

#### *Cultivo de juveniles y reproductores de mano de león *N. subnodosus**

##### **Cultivo de juveniles (Ojo de Liebre, B. C. S.)**

###### *Obtención de desoves*

Se colectaron reproductores silvestres de mano de león *N. subnodosus* con maduración evidente de la sección masculina y femenina de las gónadas en la laguna de Ojo de Liebre, B. C. S. en verano del 2016. Los organismos se transportaron en contenedores de poliuretano con agua marina del sitio de colecta y aireación constante al laboratorio de Genética acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en La Paz, B. C. S. donde se mantuvieron a una temperatura media similar a la del sitio de colecta ( $22 \pm 1$  °C), con aireación constante y en condiciones de ayuno durante 12 horas. Al día siguiente, los organismos fueron colocados en contenedores individuales con agua marina filtrada para la estimulación al desove por shock térmico (García-Esquivel *et al.*, 2000; Racotta *et al.*, 2003). Los ovocitos y el esperma fueron mezclados en relación (1:1) y colocados en contenedores plásticos con agua marina y aireación constante, con un monitoreo constante de la fertilización de los ovocitos.

###### *Cultivo de larvas y juveniles*

Las larvas de mano de león *N. subnodosus* se cultivaron en condiciones controladas en el laboratorio de Genética Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, de acuerdo con el protocolo descrito por Ramírez-Arce, 2009. El cultivo de las larvas en condiciones controladas de laboratorio hasta alcanzar una talla mínima de semilla (2 mm, LT) fue de 45 días hasta su transporte y siembra en un sistema de cultivo en suspensión (< 2 m de profundidad) en la localidad de “Las Casitas” (27°51’50” N 114°08’42” W) en la laguna Ojo de Liebre, B.C. S., México. Los juveniles de *N. subnodosus* fueron cultivados durante

nueve meses (noviembre del 2016 a julio del 2017) en la laguna Ojo de Liebre previo al inicio de los experimentos. Durante el período de cultivo, se realizaron registros mensuales de longitud total de las valvas (LT, mm), el peso húmedo de los tejidos (g) y el peso seco de los tejidos (g)

### **Cultivo de reproductores (Bahía Magdalena, B. C. S.)**

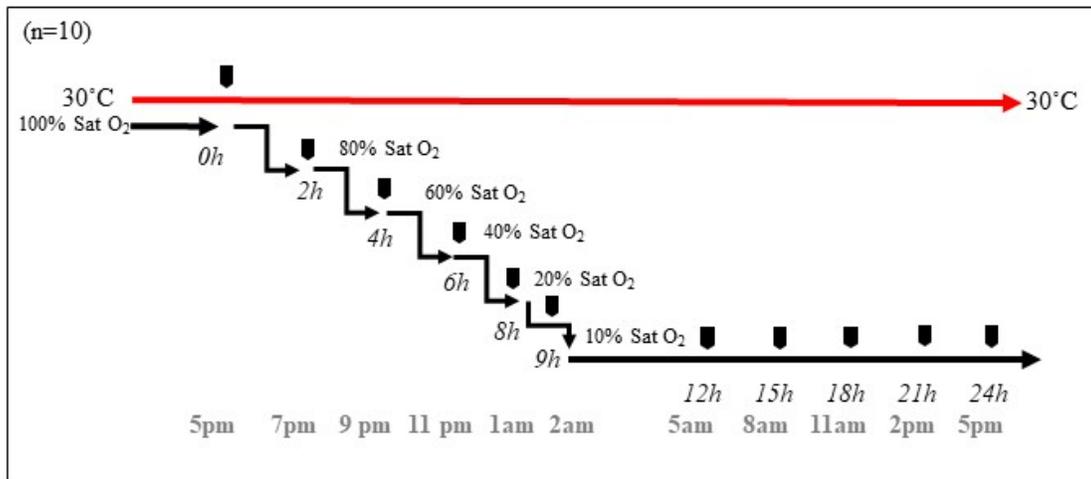
Los organismos utilizados en este estudio, se obtuvieron de desoves de reproductores silvestres colectados en la laguna Ojo de Liebre, B.C. S. en el mes de Agosto del 2014, los cuales fueron transportados en contenedores de poliuretano con agua marina colectada del medio (18°C) al laboratorio de Genética Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste bajo condiciones controladas de temperatura y alimento, La estimulación al desove se realizó incrementando de manera paulatina (1°C d<sup>-1</sup>) la temperatura del agua de 18 a 22°C. La alimentación consistió en una mezcla de microalgas *I. galbana* y *C. calcitrans* (1:1) con una dosis de 30,000 millones cel<sup>-1</sup> org<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, utilizando un sistema de alimentación continua por goteo durante 10 días. Posteriormente, se realizó el desove por shock térmico, la fertilización y el cultivo de las larvas y juveniles (septiembre, 2014) de acuerdo con lo descrito por Ramírez-Arce, 2009. En diciembre 2014, los juveniles (5-6 mm) se transportaron a el estero de Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B. C. S (25°10'10" N 112°11'24" W y 24°26'24" N 113°33'00" W). El cultivo de los juveniles inicio en bolsas de malla de 3 mm y luego en canastas ostrícolas de polipropileno (60 cm x 40 cm x 13 cm) suspendidas en un sistema *Long Line*. La densidad de organismos se mantuvo en un 50% de cobertura de área de la canasta aproximadamente, realizando un ajuste periódico de acuerdo con el incremento de talla de los organismos. Durante el segundo ciclo anual de cultivo, se realizó el muestreo de los organismos durante la primavera (mayo 2016) y el verano (06 julio 2016) de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos.

## ANEXO 2

### *Determinación de tiempo máximo de tolerancia de los juveniles de *N. subnodosus* a temperatura elevada combinada con hipoxia severa*

#### Diseño experimental

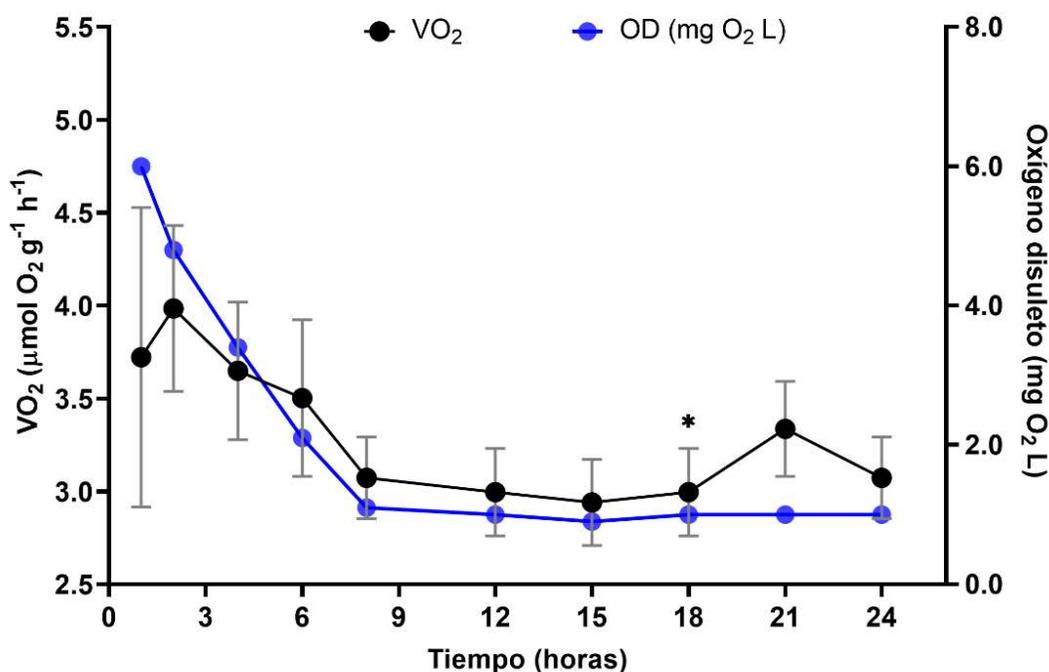
Se seleccionaron de manera aleatoria un grupo (n=10) de organismos para ser ayunados (12h) previo al inicio de la fase experimental. Cada organismo fue colocado en una cámara de respiración individual (350ml) de flujo abierto (60 ml min<sup>-1</sup>) durante 2 horas a la temperatura de aclimatación (22±1 °C) previo al inicio del experimento. Al día siguiente, los organismos se expusieron a un aumento gradual de temperatura de 22 a 30 °C (1 °C h<sup>-1</sup>) en normoxia (≥90% SatO<sub>2</sub>). Dos horas después de llegar a 30 °C, la disponibilidad de oxígeno se disminuyó de manera progresiva (100, 80, 60, 40, 20, 10% SatO<sub>2</sub>) y se mantuvo a 10% SatO<sub>2</sub> hasta el final del período experimental (24h).



Diseño experimental del bioensayo preliminar para determinar el tiempo máximo de tolerancia de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* a una condición de hipertermia combinada con hipoxia severa (10% Sat O<sub>2</sub> 1 mg O<sub>2</sub> L). (■) Determinación del consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub> μmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) de cada organismo experimental antes, durante y después de alcanzar una condición de hipoxia severa (n=10). A las 18h de exposición se observó una pérdida de reacción de los organismos a un estímulo físico de acuerdo con los criterios definidos para otros pectínidos por Vacquer-Snyder *et al.*, 2012; Basso *et al.* 2015 y un 50% de mortalidad de los organismos.

## Consumo de oxígeno y supervivencia

El consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) de cada organismo se determinó antes de iniciar la fase experimental, una vez que alcanzaron la condición de hipertermia (0h), durante la hipoxia progresiva y de manera continua cada 3 horas hasta observar una pérdida de reacción de los organismos a un estímulo físico y/o mortalidad de acuerdo con lo descrito por Vacquer-Snyder *et al.*, 2012; Basso *et al.* 2015. Al finalizar el experimento (24h), se observó que los organismos reducen su consumo de oxígeno de manera gradual de acuerdo con la disminución de la disponibilidad de oxígeno disuelto (oxiconformador), con una pérdida de reacción al estímulo físico a partir de las 18 horas de exposición que coincide con un incremento de la tasa de mortalidad (50%). El consumo de oxígeno de los organismos que mantenían actividad física fue monitoreado hasta las 24h de exposición.



Consumo de oxígeno de los juveniles de mano de león *N. subnodosus* ( $VO_2$ ,  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) expuestos a una condición de hipertermia ( $30^\circ\text{C}$ ) combinada con una hipoxia gradual (100, 80, 60, 40, 20, 10%  $\text{SatO}_2$ , 6.5 a 1  $\text{mg O}_2 \text{ L}$ ). (\*) pérdida de reacción de los organismos a un estímulo físico 50% de mortalidad.  $VO_2$  de organismos remanentes (50%) fue monitoreado hasta un tiempo máximo de exposición de 24h