



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas

Efecto de la acidificación del agua de mar en el transcriptoma y
epitranscriptoma asociado a la formación de la concha embrionaria
y larval en la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*)

SEBASTIÁN ENRIQUE FULLER VARGAS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática.

Profesor Guía y Patrocinante
Dr. Felipe Aguilera Muñoz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

19-12-2024

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
RESUMEN GRÁFICO.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
El proceso de biomineralización y formación de concha durante la ontogenia de los moluscos.....	4
Composición mineralógica y componentes orgánicos que forma parte de la concha en los moluscos.....	6
Acidificación de los océanos y su efecto en formación de la concha en moluscos.....	7
Componentes moleculares involucrados en la formación de concha en moluscos y acidificación de los océanos.....	9
Modificaciones químicas de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), acidificación de los océanos y formación de la concha en moluscos	11
La Ostra del Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>) como sistema modelo para estudiar la formación de la concha y el efecto de la acidificación del agua de mar.....	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1.1 Obtención y mantenimiento de individuos adultos de <i>Crassostrea gigas</i>	19
1.2 Obtención de gametos, fertilización y generación de embriones y larvas de <i>Crassostrea gigas</i>	19
1.3 Acidificación del agua de mar artificial	19
1.4 Extracción de ARN total y preparación de librerías de secuenciación de ARN directo.....	20
1.5 Identificación de modificaciones químicas del ARN en embriones y larvas de <i>C. gigas</i> mantenidas en condiciones de pH normal y acidificado.....	20
1.6 Identificación de modificaciones químicas de ARN que presenten metilación diferencial entre estadios de desarrollo y/o condiciones de pH	21

2.1 Búsqueda de genes involucrados en la formación de concha embrionaria y/o larval en <i>C. gigas</i>	23
2.2 Identificación de genes con expresión diferencial en embriones y larvas de <i>C. gigas</i> mantenidas en condiciones de pH normal y acidificado.....	24
2.3 Identificación de los procesos biológicos y funciones moleculares alteradas por la acidificación del agua de mar en embriones y larvas de <i>C. gigas</i>	24
RESULTADOS	25
Identificación de regiones con metilaciones m ⁶ A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico.....	25
Patrones en la metilación de motivos DRACHs en el desarrollo embrionario y larval de la Ostra del Pacífico.	27
Identificación de los transcritos e isoformas con metilaciones m ⁶ A expresadas durante el desarrollo embrionario y larval bajo condiciones de acidificación del agua de mar.....	33
Análisis de enriquecimientos de términos de Ontología de Genes (GO) en las isoformas con metilaciones m ⁶ A durante el desarrollo embrionario y larval de la Ostra del Pacífico.....	37
Identificación de dominios funcionales asociados a las metilaciones m ⁶ A durante el desarrollo embrionario y larval de la Ostra del Pacífico en condiciones de acidificación.....	39
Expresión diferencial de genes durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico en condiciones de acidificación del agua de mar.	46
Caracterización de los genes expresados diferencialmente durante el desarrollo embrionario y larval de la Ostra del Pacífico en condiciones de acidificación.....	50
Alteraciones en la dinámica de expresión y patrones de metilación m ⁶ A bajo condiciones de acidificación del agua de mar en la Ostra del Pacífico.....	59
DISCUSIÓN	66
Preferencia en la metilación de motivos DRACHs en el desarrollo embrionario larval de la Ostra del Pacífico y alteraciones producto de la acidificación del agua de mar.	66
Caracterización del metiloma de m ⁶ A durante el desarrollo embrionario y larval de la Ostra del Pacífico y su rol en la formación de la concha larval.....	68
Expresión diferencial durante el desarrollo embrionario y larval de la Ostra del Pacífico mantenidas en condición de acidificación del agua de mar.....	70

Efecto de la acidificación del agua de mar en los patrones de metilación m6A asociados a la formación de concha larval en la Ostra del Pacífico.....	71
Efectos de la acidificación del agua de mar en el transcriptoma y el epitranscriptoma m6A durante la formación de la concha larval en la Ostra del Pacífico.....	73
CONCLUSIONES.....	77
AGRADECIMIENTOS.....	80
REFERENCIAS.....	81
ANEXOS.....	99

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1.....	5
Figura 2.....	8
Figura 3.....	10
Figura 4.....	13
Figura 5.....	18
Figura 6.....	22
Figura 7.....	27
Figura 8.....	30
Figura 9.....	32
Figura 10.....	34
Figura 11.....	36
Figura 12.....	38
Figura 13.....	40
Figura 14.....	42
Figura 15.....	44
Figura 16.....	46
Figura 17.....	49
Figura 18.....	52
Figura 19.....	54
Figura 20.....	56
Figura 21.....	58
Figura 22.....	61
Figura 23.....	63
Figura 24.....	65

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1.....	26
Tabla 2.....	47

ÍNDICE ANEXOS

Figura S1.....	99
Figura S2.....	100
Figura S3.....	101
Figura S4.....	102
Figura S5.....	103
Figura S6.....	104
Figura S7.....	105
Figura S8.....	106
Figura S9.....	107
Figura S10.....	108
Figura S11.....	109
Figura S12.....	110
Figura S13.....	111
Figura S14.....	112
Figura S15.....	113
Figura S16.....	114
Tabla S1.....	115
Tabla S2.....	116
Tabla S3.....	118
Tabla S4.....	121
Tabla S5.....	123

ABREVIATURAS

ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

ARN/RNA: Ácido ribonucleico.

Ca²⁺: Ion calcio.

CaCO₃: Carbonato de calcio.

CO₂: Dióxido de Carbono.

CO₃²⁻: Iones carbonatos.

DMR: Tasa de metilación diferencial (Del inglés, Differential Methylation Rate).

DRACH: motivo consenso de secuencia nucleotídica compuesta por: (D = A/G/U, R = A/G, H = A/C/U).

GO: Ontología de genes (Del inglés, Gene Ontology).

H⁺: Iones de hidrógeno.

H₂CO₃: Ácido carbónico.

H₂O: Agua.

HCO₃⁻: Ion bicarbonato.

Hp_f: Horas post fertilización.

m⁵C: 5-metilcitidina.

m⁶A: N⁶-metiladenosina.

Ppm: Partes por millón.

SMP: Proteínas de la matriz de la concha (Del inglés, Shell Matrix Proteins).

TPM: Transcritos por millón (Del inglés, Transcripts per million).

Ψ: Pseudouridina.

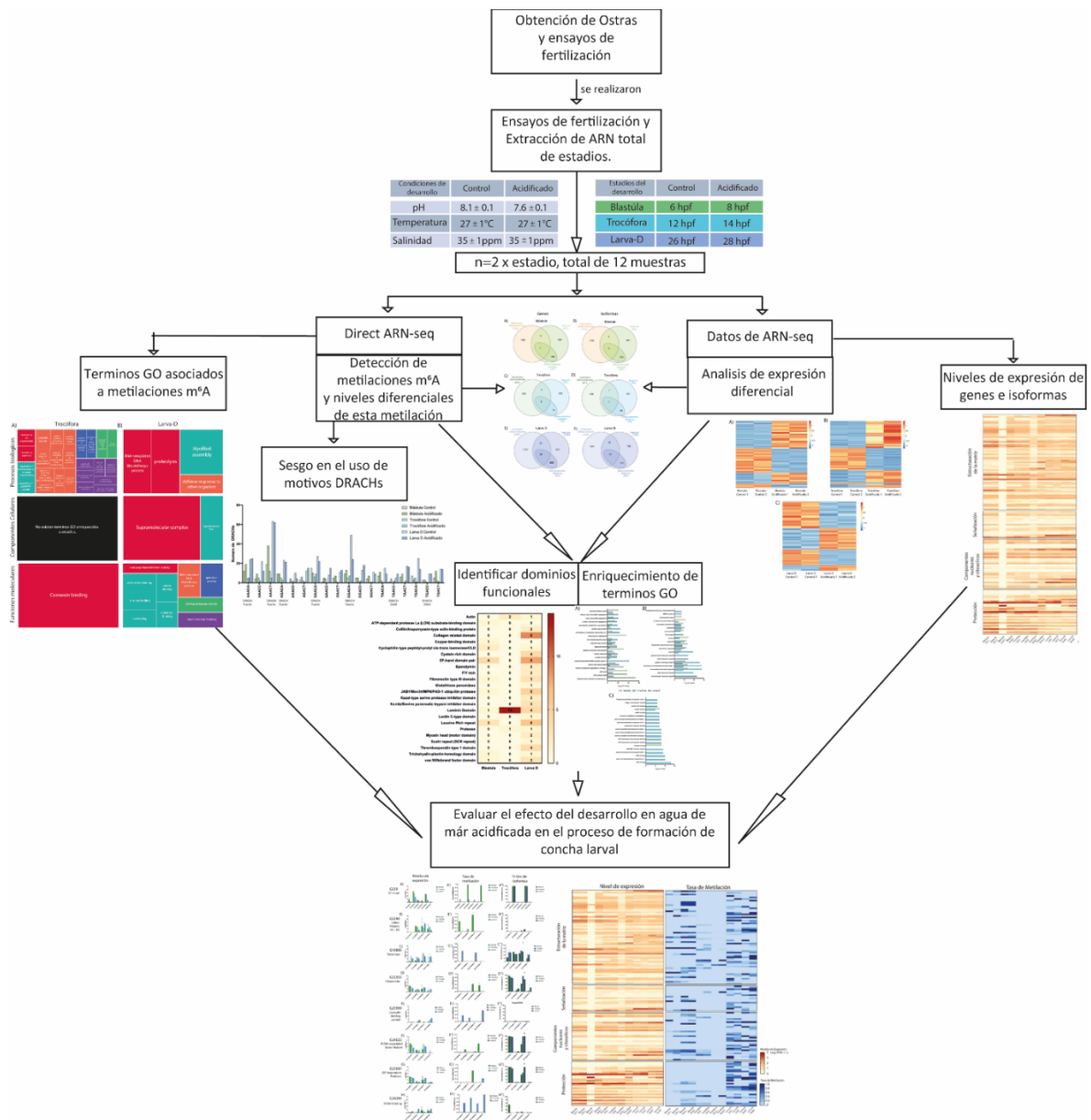
RESUMEN

Desde la Revolución Industrial, las actividades antropogénicas han aumentado drásticamente la concentración de CO₂ atmosférico en nuestro planeta. Una parte significativa de este CO₂ se disuelve en los océanos, lo que provoca la acidificación del agua de mar al reducir el pH y la disponibilidad de iones carbonatos (CO₃²⁻). Esta acidificación afecta negativamente a organismos marinos que dependen de carbonato de calcio (CaCO₃) para formar estructuras mineralizadas, como la concha en especies de moluscos, causando problemas en su fabricación y propiedades físicas. Estudios transcriptómicos han proporcionado información valiosa sobre la respuesta molecular de los moluscos a la acidificación oceánica; sin embargo, el papel de la regulación epigenética, como la metilación del ADN y del ARN, en la respuesta de los moluscos a la acidificación del océano ha sido poco explorada. Aunque se ha mostrado que metilaciones en el ADN tienen un rol en la adaptación de especies de moluscos a la acidificación de los océanos, no se tiene conocimiento si las metilaciones en el ARN tendrían un rol similar. Por lo tanto, esta falta de comprensión subraya la necesidad de investigaciones adicionales para abordar la compleja red regulatoria involucrada en el proceso de formación de la concha en moluscos y su respuesta a condiciones ambientales cambiantes. En esta tesis, determinamos el efecto de la disminución del pH del agua de mar en la expresión génica y su regulación mediante la modificación química N⁶-metiladenosina (m⁶A) presente en el ARN asociado a la formación de concha embrionaria y larval del molusco, conocido como *Crassostrea gigas*. Mediante secuenciación directa del ARN y análisis de datos de ARN-Seq, se identificaron metilaciones m⁶A del ARN y se estableció un catálogo de diferentes modificaciones m⁶A presentes en transcritos expresados en las etapas embrionarias y larvales de *C. gigas*. Además, se identificaron transcritos expresados diferencialmente producto del efecto del agua de mar acidificada en estas etapas del desarrollo. Nuestros resultados describen un catálogo epitranscriptómico m⁶A altamente dinámico proporcionando un vistazo a los procesos biológicos y funciones moleculares que se ven alterados producto de la acidificación del agua de mar, junto a su implicancia en la formación de la concha en *C. gigas*. Enmarcando a la modificación química del ARN m⁶A como un nuevo nivel de complejidad en la red de regulación de la biomineralización.

ABSTRACT

Since the Industrial Revolution, anthropogenic activities have dramatically increased the concentration of atmospheric CO₂ on our planet. A significant portion of this CO₂ dissolves in the oceans, causing seawater acidification by reducing the pH and the availability of carbonate ions (CO₃²⁻). This acidification negatively affects marine organisms that depend on calcium carbonate (CaCO₃) to form mineralized structures, such as the shell of molluscan species, causing problems in their manufacturing and physical properties. Transcriptomic studies have provided valuable information on the molecular response of mollusks to ocean acidification; however, the role of epigenetic regulation, such as DNA and RNA methylation, in the response of mollusks to ocean acidification has been poorly explored. Although it has been shown that DNA methylation plays a role in the adaptation of mollusk species to ocean acidification, it is unknown whether RNA methylation (epitranscriptomic) has a similar role. Therefore, this lack of understanding highlights the need for additional research to address the complex regulatory network involved in the process of shell formation in mollusks and their response to changing environmental conditions. In this thesis, we determine the effect of decreasing the pH of seawater on gene expression and its regulation through the chemical modification N⁶-methyladenosine (m⁶A) present in RNA associated with the formation of the embryonic and larval shell of the mollusk, known as the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Through direct RNA sequencing (Oxford Nanopore) and RNA-Seq data analysis (Illumina), m⁶A methylations of RNA were identified and a catalog of different epitranscriptional modifications present in transcripts expressed in the embryonic and larval stages of *C. gigas*, stages of development where the embryonic and larval shell are built. In addition, differentially expressed transcripts were identified as a result of the effect of acidified seawater at these developmental stages. Our results describe a highly dynamic m⁶A epitranscriptome catalog, providing insight into the biological processes and molecular functions that are altered as a result of seawater acidification, along with its implication for shell formation in *C. gigas*. This frames the chemical modification of m⁶A RNA as a new level of complexity in the regulatory network of biomineralization.

RESUMEN GRÁFICO



INTRODUCCIÓN

El proceso de biomineralización y formación de concha durante la ontogenia de los moluscos

La biomineralización corresponde al proceso mediante el cual los organismos vivos son capaces de generar estructuras esqueléticas mineralizadas (Lowenstam, 1981, Marin et al., 2014). En los océanos, iones y compuestos inorgánicos presentes en el medio ambiente, como el carbonato de calcio (CaCO_3), son selectivamente empleados mediante una serie de procesos celulares que dan a lugar distintas estructuras mineralizadas (Marin et al., 2012). La fabricación de estas estructuras mineralizadas está extendida ampliamente en los animales marinos, con un origen que se remonta al periodo conocido como el Ediacárico/Cámbrico hace ± 545 millones de años atrás (Marshall, 2006). En los ecosistemas modernos, las estructuras mineralizadas que fabrican los animales marinos son ampliamente diversas, en términos de morfología, ecología, función, y mineralogía (Marin et al., 2012). Entre los grupos de animales que tiene la capacidad de construir estructuras mineralizadas, los moluscos han sido ampliamente utilizados para entender el proceso de biomineralización (Jackson et al., 2016).

Los moluscos son el segundo grupo de animales con más especies en el planeta Tierra, representados por alrededor de 200,000 especies distribuidas en diversos nichos ecológicos, incluyendo sistemas de agua dulce, marinos, y terrestres (Ponder & Lindberg, 2008). El gran éxito evolutivo y ecológico de los moluscos es atribuido en parte gracias a la capacidad de fabricar la estructura mineralizada conocida como la concha (Marin et al., 2012; Kocot, et al., 2016; Ivanina et al., 2017). La concha de los moluscos es responsable de diversas funciones desde soporte estructural, protección, defensa, e incluso contribuir a la homeostasis fisiológica del animal (Kocot et al., 2016; Ivanina et al., 2017). Existen diferentes tipos de conchas durante la ontogenia de los moluscos; sin embargo, todas son originadas desde un mismo origen embrionario. Este origen conservado entre moluscos radica en la interacción entre el ectodermo dorsal y el mesodermo durante la gastrulación (Figura 1A). En esta etapa del desarrollo, las células de la punta del arquénteron hacen contacto con células del ectodermo dorsal, lo que llevará a estas células a adoptar su destino

formador de estructuras mineralizadas (Figura 1B). Este ectodermo dorsal se engrosará y formará la placa de la cocha, luego las células ectodermales se invaginarán formando la glándula de la cocha; finalmente la evaginación de este tejido llevará a la formación del campo de la cocha (Marin, et al., 2012; Jackson et al., 2016). La glándula de la cocha es el tejido responsable de la fabricación de la cocha en etapas embrionarias; es decir, larva trocófora y larva-D. Durante su ontogenia, posteriormente la glándula de la cocha se diferenciará en el tejido conocido como el manto, el cual es responsable de la construcción de la cocha en las etapas de juvenil y adultez (Kocot, et al., 2016).

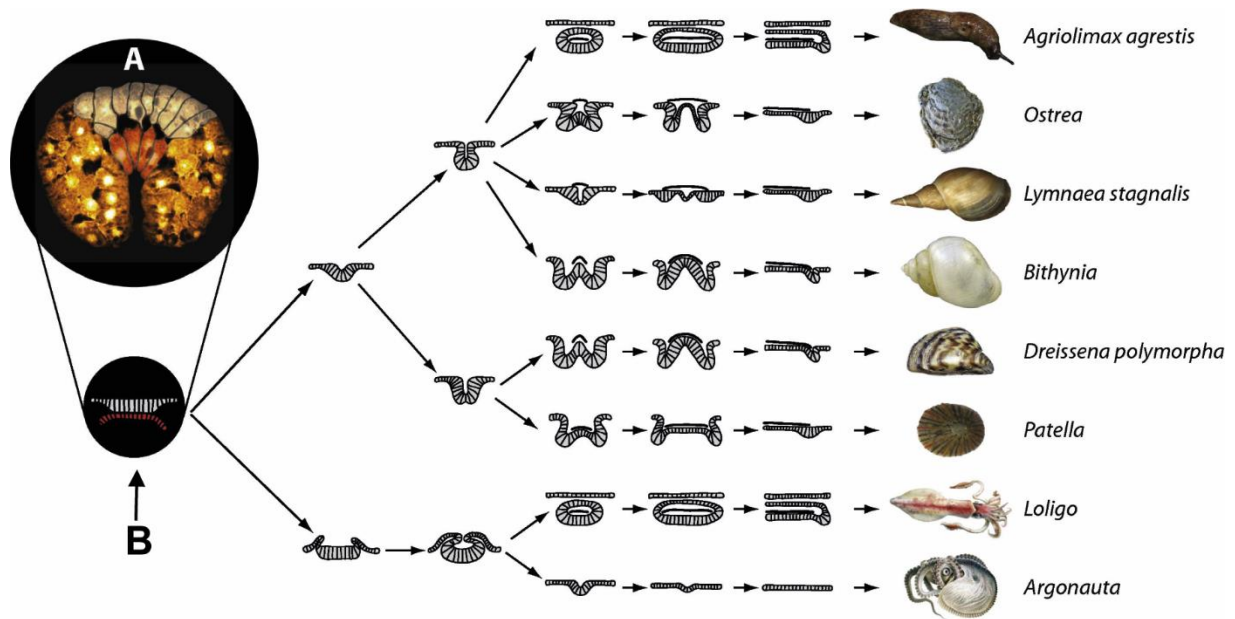


Figura 1. Representantes de diversos clados de moluscos y su proceso de inicio de la formación de concha desde una interacción conservada entre el ectodermo dorsal y el mesodermo. Esta interacción ocurre durante la gastrulación (A), donde las células en la punta del arquenteron (en rojo) hacen contacto con células del ectodermo dorsal (en gris) (B). Desde este evento ontogénico, emergen una diversidad de morfologías de estructuras responsables de formación estructura mineralizada en moluscos adultos. Extraído desde Jackson et al., 2016.

Composición mineralógica y componentes orgánicos que forman parte de la concha en los moluscos

La fabricación de la concha en moluscos involucra un consumo selectivo de iones precursores de calcio (Ca^{2+}) y de bicarbonato (HCO_3^-) provenientes del agua de mar, los cuales son capturados por los tejidos responsables de la formación de concha durante la ontogenia de los moluscos, para ser empleados como bloques de construcción para la fabricación de la concha (Marin et al., 2012). En el caso del bicarbonato, este ion también puede ser obtenido mediante la hidratación del CO_2 captado del medio. Los iones bicarbonato (HCO_3^-) y calcio (Ca^{2+}) reaccionan para formar el carbonato de calcio (CaCO_3), el cual está de forma acuosa en las etapas larvales de los moluscos, para luego ser diferenciado en los polimorfos conocidos como aragonita o calcita (Marin et al., 2012; Gazeau et al., 2013; Gattuso et al., 2015). Para llevar a cabo este proceso, la glándula de la concha se encarga de cristalizar el carbonato de calcio generando cristales amorfos y posteriormente estructuras cristalinas ordenadas de aragonita o calcita (Yokoo 2011; Bots et al., 2012; Suzuki & Nagasawa., 2013). Para formar la aragonita o calcita, se requiere un paso de nucleación del cristal de CaCO_3 , donde se forma previamente un polimorfo amorfo altamente inestable (Bots et al., 2012). Durante la nucleación, se ha reportado que los polimorfos amorfos de calcio se pueden estabilizar regulando el pH del medio y/o confinando las partículas dentro de vesículas lipídicas (Tester et al., 2012; Du & Amstad, 2019).

En el caso de individuos juveniles y adultos, la concha está formada por distintos tipos de polimorfos de CaCO_3 , tales como aragonita, calcita, o vaterita (Suzuki et al., 2013; Gilbert et al., 2022; Huang & Zhang, 2022). Estos polimorfos de CaCO_3 interactúan íntimamente con diversos componentes orgánicos, incluyendo proteínas, polisacáridos, y lípidos, formando la matriz orgánica de la concha (Marin et al., 2012; Kocot, Aguilera, et al., 2016; McDougall & Degnan 2018; Zhao et al., 2018). Dentro de los componentes orgánicos de la concha a lo largo de la ontogenia de los moluscos, las proteínas de la matriz de la concha (o shell matrix proteins - SMP - por sus siglas en Inglés) son las más importantes porque participan en diferentes procesos relacionados con la formación de la concha, incluyendo la nucleación, polimorfismo, calcificación, crecimiento, y orientación de los cristales de CaCO_3 depositados en la concha (Zhang & Zhang 2006; Marin et al., 2012; Marin et al., 2020), pero

también en conferir las propiedades morfológicas y mecánicas de las conchas, tales como la resistencia, ornamentación, y pigmentación (Jackson, et al. 2006; Jackson et al., 2007; Marin et al., 2012; Aguilera et al., 2014).

Estas proteínas, en las etapas embrionaria/larval, son secretadas por la glándula de la concha, mientras que en las etapas juvenil/adulto por el tejido denominado como el manto (Marin et al., 2012; Marin et al., 2020; Rivera-Perez & Hernández-Saavedra, 2021). Por lo tanto, la formación de la concha en moluscos es un proceso genéticamente controlado con una organización jerárquica que involucra la coordinada deposición de cristales de CaCO_3 y la participación de proteínas de la matriz o SMPs (Song et al., 2019; Marin F., 2020). Recientemente, se han publicado varios estudios sobre historias evolutivas de las SMPs con el fin de entender las bases genético-moleculares de la formación de la concha en moluscos (Arivalagan et al., 2017; Aguilera et al., 2014; Aguilera et al., 2017). Sin embargo, en estos estudios se han enfocado en la formación de la concha adulta (teleoconcha), ignorando casi por completo cómo ocurre el proceso de formación de la concha embrionaria (prodisoconcha I) y larval (prodisoconcha II) (Wanninger & Wollesen, 2015). De hecho, actualmente se posee un conocimiento muy limitado de los mecanismos moleculares y repertorios proteicos que podrían estar participando en la formación de la concha embrionaria y larval (Jackson et al., 2007; Zhao et al., 2018; Batzel et al., 2022).

Acidificación de los océanos y su efecto en formación de la concha en moluscos

Los océanos desempeñan un papel fundamental en la regulación del clima al secuestrar y almacenar aproximadamente el 25% del dióxido de carbono (CO_2) antropogénico (Haines. 2003; Gattuso et al., 2015; Barclay et al. 2020; Gruber et al., 2023). Desde el comienzo de la Revolución Industrial alrededor de 1750, la producción de CO_2 debido a actividades humanas ha sido de aproximadamente 2.5 billones de toneladas métricas (Jiang et al., 2023; Gruber et al., 2023), lo que ha resultado en un aumento del CO_2 atmosférico en casi un 50% (Jiang et al., 2023). Esta gran afluencia de CO_2 está alterando la química de los océanos. Por ejemplo, una vez que el CO_2 es absorbido por el agua de mar, una parte reacciona con el agua (H_2O) para formar ácido carbónico (H_2CO_3), que luego se disocia y libera iones de hidrógeno (H^+). Los iones hidrógeno adicionales se asocian con

iones carbonato (CO_3^{2-}) para aumentar la concentración de iones bicarbonato (HCO_3^-). El resultado neto de estas sucesivas reacciones químicas es que los océanos medianamente alcalinos se vuelven más ácidos, disminuyendo el pH del agua de mar y la disponibilidad de los iones carbonato (CO_3^{2-}) presentes en el agua de mar (Figura 2) (Orr, et al. 2005; Barker & Ridgwell, 2012; Gattuso et al., 2015; Barclay et al. 2020). Este proceso se conoce como acidificación de los océanos.

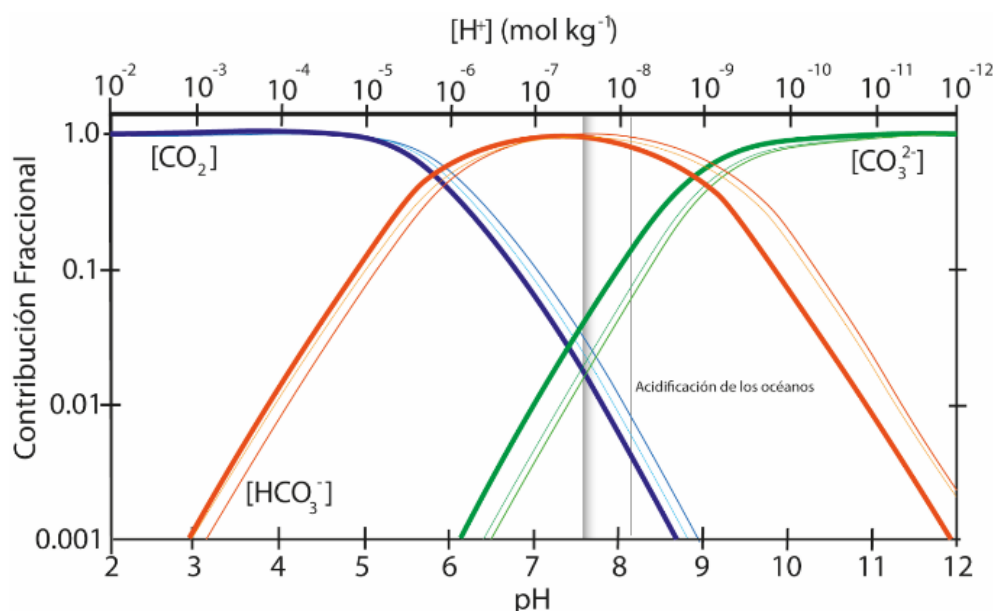


Figura 2. Relación entre el pH y la química del carbonato en el océano. Figura modificada desde Barker & Ridgwell, 2012.

La acidificación de los océanos genera efectos nocivos para diversas especies marinas (Gattuso et al., 2015), viéndose especialmente afectadas aquellas que fabrican estructuras mineralizadas basadas en CaCO_3 , y que utilizan iones carbonato (CO_3^{2-}) presentes en el agua de mar, como componente básico para la construcción de estas estructuras (Barclay et al., 2020, Strader et al., 2022). Dentro de los animales marinos con la capacidad de fabricar caparazones y estructuras esqueléticas basadas en CaCO_3 , los moluscos son unos de los más afectados por la alteración de la química del agua de mar producto de la acidificación de los océanos (Orr, et al., 2005, Barros, et al., 2013; Gazeau et al., 2013; Gattuso et al., 2015). De

hecho, se ha reportado que los efectos de la acidificación del agua de mar son variados a lo largo de la ontogenia de una especie e incluso entre los diferentes grupos taxonómicos que comprenden a los moluscos (Gazeau et al., 2013). Por ejemplo, se ha reportado un efecto altamente negativo en los moluscos gasterópodos y bivalvos porque la disminución del pH del agua de mar incrementa los costos energéticos asociados a procesos fisiológicos, tales como la regulación ácido-base a nivel intracelular y la calcificación de la concha debido a que los cristales amorfos de calcio se solubilizan rápidamente en el agua de mar (Sulpis et al., 2018; Figuerola et al., 2021). Por lo tanto, en estos grupos de moluscos se ve afectado negativamente la sobrevivencia, crecimiento, y descendencia de estas especies (Gazeau et al., 2013; Kroeker et al., 2014; Gattuso et al., 2015; Tan and Zheng, 2020; Auzoux-Bordenave et al. 2020).

Componentes moleculares involucrados en la formación de concha en moluscos y acidificación de los océanos

En moluscos, la formación de concha es un proceso complejo a nivel molecular, con notables diferencias entre especies, e incluso entre individuos de una misma especie (Jackson et al., 2010; McDougall et al., 2013; Aguilera, et al., 2014, 2017). Estudios recientes que han caracterizado las proteínas de la matriz de la concha (SMP) presentes en la concha larval (prodisoconcha II) y/o concha adulta (teleoconcha) en diferentes especies de moluscos revelan que existe una gran diversidad de SMPs que constituyen el repertorio proteico-molecular de las conchas (Arivalagan, et al., 2017; Zhao, et al., 2018; Marin et al., 2007, 2020). Esto lleva a concluir que no es posible identificar una caja de herramientas proteicas básicas (o “toolkit”) utilizada por los moluscos para la fabricación de sus conchas. No obstante, existen similitudes, en términos de dominios funcionales presentes en las SMP, que arrojan luces sobre los componentes esenciales para la formación de la concha en moluscos (Figura 3) (Marín, 2020).

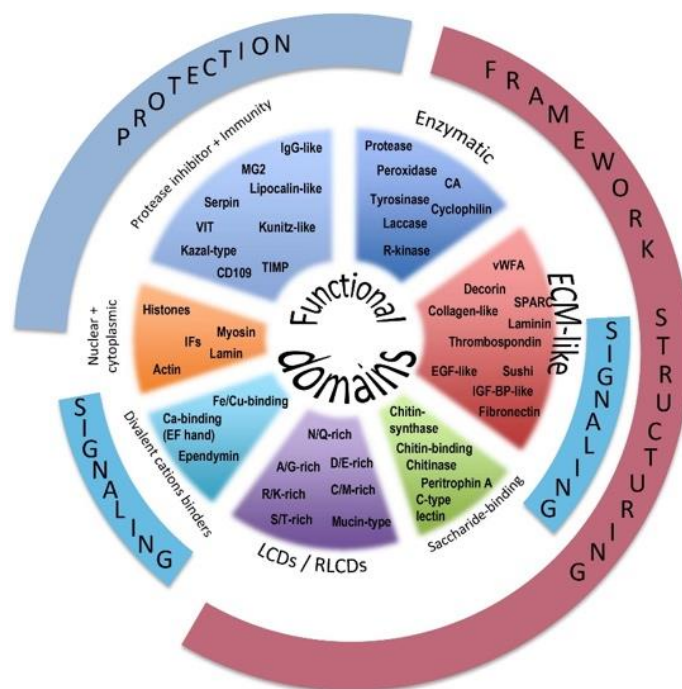


Figura 3. Los dominios funcionales comúnmente encontrados en proteínas de la matriz (SMPs) de la concha de moluscos. Los dominios están agrupados y listados de acuerdo con sus funciones moleculares o rasgos donde la función es incierta. Algunos dominios pueden pertenecer a diferentes categorías. Los círculos más externos corresponden al rol principal a nivel celular/fisiológico en el proceso de biomineralización. Figura extraída desde Marin, 2020.

En este contexto y basado en la Figura 3, las SMPs se pueden clasificar, de acuerdo con su función, en: i) proteínas de matrices extracelulares; ii) enzimas; iii) proteínas que interactúan con polisacáridos; iv) proteínas que unen cationes divalentes; v) proteínas relacionadas con sistema inmune y mecanismos de protección; vi) proteínas citoplasmáticas y nucleares; y vii) proteínas con dominios de baja complejidad o repetitivos de baja complejidad (Marin 2020).

Estudios transcriptómicos han proporcionado una imagen más detallada de los eventos moleculares que sustentan la respuesta fisiológica de los animales marinos a la acidificación de los océanos (Strader et al., 2020). Por ejemplo, en la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) se ha visto que individuos adultos expuestos a un pH de 7.6 por un periodo de 20 días desencadena la regulación de procesos celulares y biológicos, pero suprime de forma destacada algunos procesos metabólicos y actividades enzimáticas

(Zúñiga-Soto et al., 2023). Estos resultados son congruentes con estudios previos en larvas de la misma especie a las 14-16 horas (estado embrionario de la larva trocófora que fabrica la prodisoconcha I) expuestas a niveles similares de pH (De Wit et al., 2018). Por otra parte, se ha reportado que genes relacionados con el sistema inmune se suprimen por efecto de un pH bajo en larvas de *C. gigas* y células inmunes (Wang et al., 2016; Dineshram et al., 2021; Wang et al., 2020), pero en la misma especie, las células del manto, tejido que fabrica la concha adulta (teleoconcha), muestran una sobre-expresión de genes relacionados con inmunidad (Zúñiga-Soto et al., 2023); similarmente a lo que se ha observado en otras especies de ostras (Goncalves et al., 2016; Goncalves et al., 2017). Asimismo, genes asociados a procesos metabólicos se regulan a la baja en individuos adultos y larvas de *C. gigas* (Liu et al., 2020; Zúñiga-Soto et al., 2023), pero no ocurre lo mismo en individuos adultos de *C. virginica* (Downey-Wall et al., 2020), una especie congénérica a *C. gigas*. En resumen, estos estudios demuestran que los moluscos varían dramáticamente en sus respuestas transcriptómicas a un pH bajo, aunque a menudo se observan patrones comunes, incluidos cambios en la regulación de iones ácido-base, procesos metabólicos, calcificación, y mecanismos de respuesta al estrés. Además, se observa que incluso diferentes respuestas transcriptómicas ocurren entre especies estrechamente relacionadas e incluso entre diferentes etapas de la historia de vida de una misma especie.

Modificaciones químicas de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), acidificación de los océanos, y formación de la concha en moluscos

Estudios recientes han demostrado que la plasticidad fenotípica proporciona a un organismo la flexibilidad para ajustar su fenotipo y sobrellevar condiciones ambientales desfavorables, como por ejemplo el cambio climático (Ryu et al., 2018; Lee et al., 2022). Interesantemente, tal plasticidad no se debe a cambios en la secuencia de ácidos nucleicos gatillada por el ambiente, sino más bien se explica por modificaciones epigenéticas que sufre el ADN (Gilbert, 2005; Feil & Fraga, 2012). Por ejemplo, en la especie *Crassostrea gigas* se ha observado que en el tejido gonadal de ostras mantenidas en condición de acidificación ocurren metilaciones del ADN en genes asociados a respuesta al estrés y metabolismo (Venkataraman et al., 2022), mientras que en la especie *Crassostrea virginica* no se observan

perfiles de metilación diferencial asociados a algún gen en particular en el mismo tipo de tejido (Venkataraman et al., 2020). En otra especie de ostra congénica (*C. hongkongensis*), sus larvas tienen un perfil diverso de expresión génica asociada a la metilación del ADN, siendo genes asociados a transducción de señales, sistema endocrino, y respuestas metabólicas y endocíticas los que presentaron mayores patrones de metilación (Dang et al., 2022). Sin embargo, en otro estudio en larvas de la misma especie se encontró que existe una metilación diferencial de genes relacionados con el citoesqueleto, transducción de señales, estrés oxidativo, y procesos metabólicos (Lim et al., 2021). Por el contrario, en el tejido manto de individuos adultos de la misma especie (*C. hongkongensis*), a pesar de ocurrir cambios de metilación del ADN, estos no controlan directamente la expresión génica (Rajan et al., 2021). Sin embargo, al igual que las respuestas transcriptómicas, las metilaciones del ADN, o cambios epigenéticos, son variables entre especies o tejidos, e incluso en diferentes etapas de la ontogenia de una misma especie (Venkataraman et al., 2020; Rajan et al., 2021; Venkataraman et al., 2022; Dang et al., 2022).

Recientemente, se ha descubierto que los transcritos (ARN) también sufren modificaciones químicas, afectando la regulación de la expresión génica (Arcidiacono et al., 2020; Konno et al., 2021). Hoy en día, se han reportado más de 100 modificaciones químicas tanto en ARN codificantes como no codificantes (Arcidiacono et al., 2020; Konno et al., 2021). Dentro de estas modificaciones, se ha determinado que la pseudouridina (Ψ), 5-metilcitidina (m^5C), y N^6 -metiladenosina (m^6A), participan en la regulación de la expresión génica en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, siendo esta última modificación química del ARN la más abundante (Bayoumi & Munir, 2021, Murakami & Jaffrey., 2022, Song, 2024, Cun et al., 2024). Esta característica, ha impulsado el interés sobre el estudio del rol de la metilación m^6A , los cuales han señalado la preferencia general de la metilación m^6A sobre motivos DRACH (D = A/G/U, R = A/G, H = A/C/U). (Bayoumi & Munir, 2021, Campos et al., 2022, Rückle et al., 2022, Cun et al., 2024). Además, se ha observado como en mamíferos y en virus podría existir sesgos de metilación incluso sobre algunas secuencias DRACH en específico, el cual puede cambiar dependiendo del organismo y del tipo celular estudiado (Bayoumi & Munir, 2021, Campos et al., 2022, Rückle et al., 2022, Cun et al., 2024). Sin embargo, no existe información de si estas preferencias pueden alterarse producto de algún estresor ambiental, como lo podría ser el desarrollo en agua de mar acidificada.

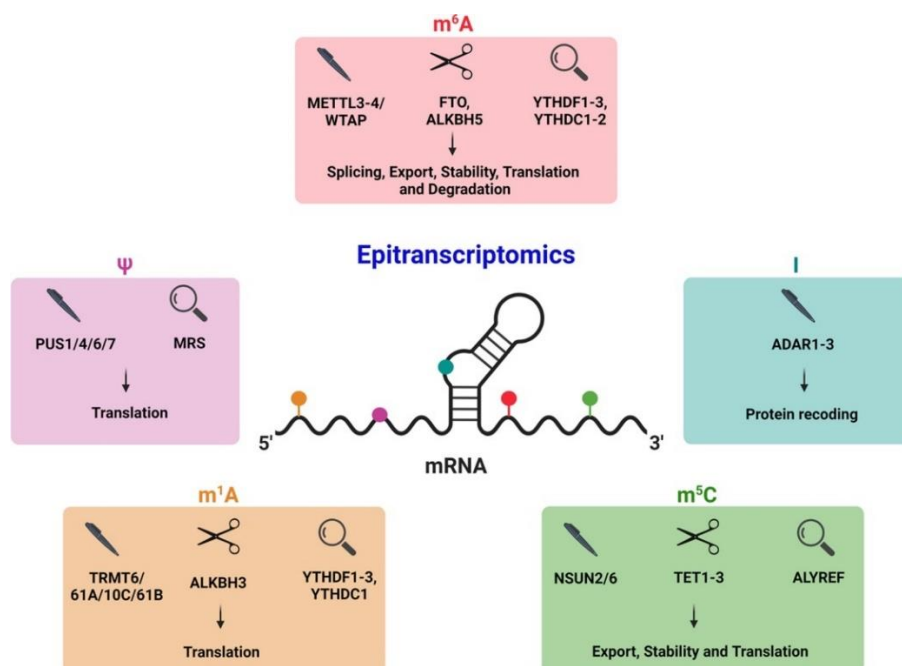


Figura 4. Resumen de las principales modificaciones epitranscriptómicas. Las modificaciones epitranscriptómicas más abundantes y bien estudiadas incluyen la N¹-metiladenosina (m¹A), pseudouridina (ψ), inosina (I), N⁶-metiladenosina (m⁶A), y 5-metilcitosina (m⁵C). Las modificaciones m¹A, m⁶A, y m⁵C implican la adición de un grupo metilo, mientras que la I y ψ son modificaciones de intercambio de bases. Estas modificaciones están controladas por un conjunto de escritores (marcadores), borradores (tijeras), y lectores (lupa) que determinan el destino de los ARN mensajeros (ARNm) modificados regulando varios pasos del procesamiento del ARNm, como el empalme, la exportación, la localización, la estabilidad, la traducción, la degradación, y la recodificación de proteínas. Figura extraída de Chokkalla, et al., 2021.

El estudio sobre las modificaciones químicas del ARN (epitranscriptómica), han conllevado a determinar el alcance del rol de la metilación m⁶A, señalándose roles cruciales en la regulación de la expresión de genes, capaces de modificar el uso de intrones/exones, alternando el uso de transcritos hacia isoformas puntuales y regulando la traducibilidad de los transcritos en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Vandivier & Gregory, 2018; Kumar & Mohapatra, 2021; Tang et al., 2021; Bayoumi & Munir, 2021; Murakami & Jaffrey, 2022; Rückle et al., 2022; Wilinski et al., 2023; Guca et al., 2024; Song, 2024). Además de desempeñar roles importantes en el desarrollo, reproducción, y destino celular (Punzi et al., 2018; Arcidiacono et al., 2020; Dieterich et al., 2021; Konno et al., 2021).

No obstante, estos estudios epitranscriptómicos han sido principalmente realizados en especies de vertebrados, plantas y algunos virus (Vandivier & Gregory, 2018; Kumar &

Mohapatra, 2021; Tang et al., 2021; Bayoumi & Munir, 2021; Campos et al., 2022, Rückle et al., 2022; Ma et al., 2022; Ramakrishnan et al., 2022; Wagner & Schosserer, 2022; Xin et al., 2022; Shen et al., 2023; Guca et al., 2024; Cun et al., 2024). Por ejemplo, en *Drosophila melanogaster* se ha descrito la relevancia de las metilaciones m⁶A en procesos del desarrollo como la diferenciación sexual mediante la inactivación del cromosoma X (Lence et al., 2016) y en el correcto funcionamiento neuronal (Lence et al., 2016). Además, estudios realizados en *Danio rerio* describen cómo las dinámicas de m⁶A en el desarrollo temprano están involucradas en la regulación de la transición materno-cigótico, bloqueando la activación del genoma cigótico y retrasando la degradación de los transcritos maternos (Zhao et al., 2017). Por otro lado, en plantas se destacan diversos estudios que establecen las dinámicas epitranscripcionales como una capa adicional en el entendimiento de procesos del desarrollo y la regulación de la respuesta inmune frente al estrés ambiental (Hu & Manduzio, 2019; Huber et al., 2019; Shoaib & Usman, 2022; Zhou et al., 2022). Sin embargo, en especies de invertebrados, estos tipos de estudios son bien escasos. En moluscos, actualmente existen dos estudios que se han enfocado en la modificación química m⁶A (Le Franc et al., 2020, Le Franc et al., 2022). Ambos estudios han demostrado que los perfiles de metilación m⁶A son dinámicos a lo largo del desarrollo de la especie *Crassostrea gigas*, con bajos niveles de metilación al final de la transición materno-cigoto (Le Franc et al., 2020) y en el estadio del desarrollo conocido como mórula (Le Franc et al., 2022). Sin embargo, aún no se conoce(n) el(los) rol(es) que estas modificaciones químicas del ARN tienen en la formación de concha en moluscos, y cómo el panorama de metilaciones m⁶A pueden alterarse producto de la acidificación del agua de mar.

La Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) como sistema modelo para estudiar la formación de la concha y el efecto de la acidificación del agua de mar

La Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, es una especie de molusco de gran valor comercial alrededor del mundo (Aranishi and Okimoto 2004; Zhang, et al. 2016), y Chile no es la excepción. En el año 2023, la producción anual de esta especie fue de 16 toneladas (SERNAPESCA 2023). Por otra parte, esta especie de molusco es actualmente un sistema modelo emergente en investigación científica porque: i) su desarrollo embrionario se

encuentra bien caracterizado (Zhang, et al. 2012); ii) durante su ontogenia se producen diferentes tipos de concha (embrionaria, larval, y juvenil/adulta) (Wanninger & Wollesen, 2019); iii) su genoma se encuentra secuenciado y anotado (Peñaloza et al., 2021); y iv) sus embriones y larvas son fácilmente manipulables y se pueden mantener en condiciones de laboratorio sin mayor necesidad de una gran infraestructura (Rico-Villa, et al. 2006; Havenhand and Schlegel 2009). Dadas las características antes mencionadas, y la abundante referencia bibliográfica sobre el efecto de la acidificación de los océanos en esta especie, es que *C. gigas* se posiciona como un excelente modelo para estudiar la red reguladora involucrada en el proceso de formación de concha en moluscos, y determinar el efecto de la disminución del pH del agua de mar en la expresión génica y su regulación mediante modificaciones químicas del ARN de transcritos relacionados con la formación de concha embrionaria y larval.

HIPÓTESIS

Considerando los niveles de aumento de CO₂ antropogénico actuales y las proyecciones para el año 2100, se predice que la disminución del pH del agua de mar afectará no solo el proceso de calcificación, sino también varios otros procesos fisiológicos y del desarrollo en una variedad de organismos marinos, incluyendo a los moluscos. No obstante, no todas las especies tienen una respuesta similar a la amenaza de la acidificación de los océanos. Mientras que algunas especies son susceptibles a la disminución del pH del agua de mar, otras pueden montar una respuesta transcriptómica y epigenética (modificaciones del ADN) con el fin de aclimatarse o adaptarse al cambio de pH, volviéndose más resilientes.

Sin embargo, aún no existe evidencia que la disminución del pH del agua de mar produzca modificaciones químicas en el ARN y si estas modificaciones están asociadas con la expresión de ARN mensajeros involucrados en la fabricación de la concha embrionaria y larval en moluscos. Además, no se tiene conocimiento si los moluscos son capaces de implementar respuestas epitranscriptómicas que permitan la compensación metabólica o adaptación al estrés causado por condiciones de acidificación del agua de mar. En este contexto, nos planteamos la siguiente hipótesis para esta tesis:

La disminución del pH del agua de mar produce variaciones en los niveles de metilaciones en el ARN (N6-metiladenosina), alterando la expresión de transcritos e isoformas involucradas en la formación de la concha embrionaria y/o larval en la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la acidificación del agua de mar en la generación de modificaciones químicas del tipo N⁶-metiladenosina en el ARN, las que producen cambios en los perfiles de expresión de transcritos e isoformas asociadas a la formación de la concha embrionaria y/o larval en la Ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*.

Objetivos Específicos

1) Evaluar los niveles globales de modificaciones químicas específicas en el ARN de embriones y larvas de *Crassostrea gigas* bajo condiciones de acidificación del agua de mar.

2) Evaluar los efectos de la disminución del pH del agua de mar en la expresión génica y metilación de transcritos que codifican para proteínas de la matriz orgánica de la concha embrionaria y/o larval en *Crassostrea gigas*.

METODOLOGÍA

Objetivo Específico 1: Evaluación de los niveles globales de modificaciones químicas específicas en el ARN de embriones y larvas de *Crassostrea gigas* bajo condiciones de acidificación del agua de mar.

A continuación, se muestra el diagrama de flujo realizado para el desarrollo del objetivo específico 1 de esta tesis (Figura 5).

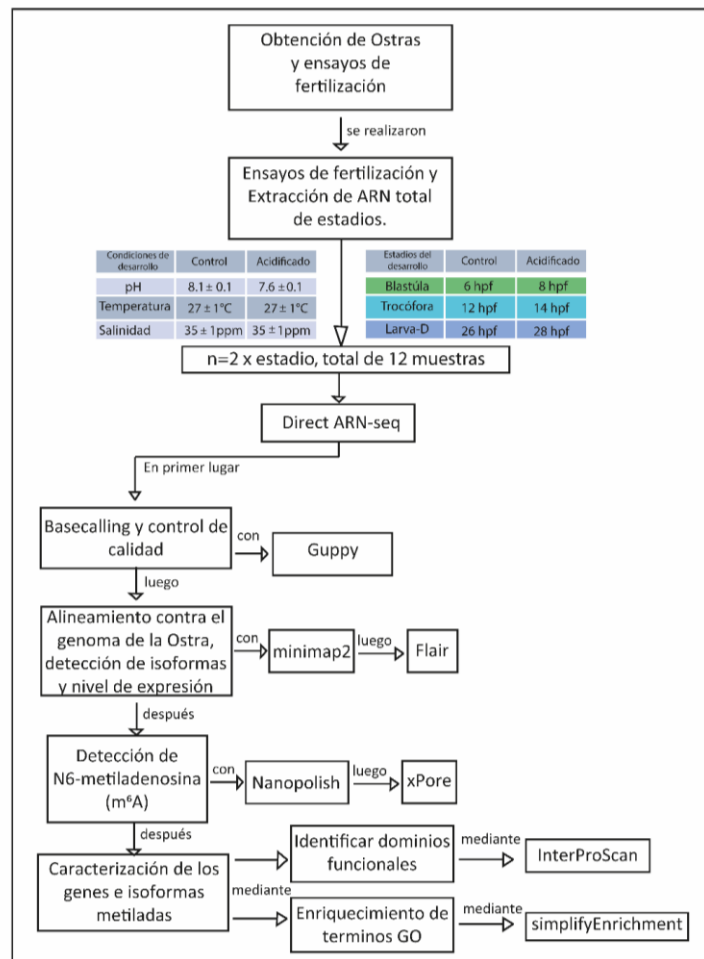


Figura 5. Diagrama de flujo relacionado a la evaluación de los niveles globales de modificaciones químicas del ARN (m6A) en embriones y larvas de *Crassostrea gigas* bajo condiciones de acidificación del agua de mar, actividades realizadas para la ejecución del Objetivo Específico 1 de esta tesis.

1.1 Obtención y mantenimiento de individuos adultos de *Crassostrea gigas*

Las ostras adultas fueron obtenidas desde una granja marina ubicada en la Caleta de Coliumo en la región del BioBío (Chile). Las ostras fueron transportadas en una nevera con agua de mar y fueron mantenidas en el Laboratorio de Genómica Marina, Desarrollo y Evolución de la Universidad de Concepción. Las ostras adultas fueron mantenidas en acuarios de 20 litros con agua de mar artificial a 35 ppm y una temperatura ambiente de 27°C. Los individuos fueron aclimatados por un periodo de 7 días hasta realizar los experimentos de desoves y fertilizaciones.

1.2 Obtención de gametos, fertilización, y generación de embriones y larvas de *Crassostrea gigas*

El cultivo de embriones y larvas de *C. gigas* se realizó mediante protocolos establecidos en el laboratorio. Brevemente, se extrajeron $\approx 100 \mu\text{L}$ de gónada masculina y la totalidad de gónada femenina desde individuos adultos. Las fertilizaciones fueron realizadas al mezclar ovocitos y espermatozoides, los cuales se incubaron a 26°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se confirmó el éxito del proceso de fertilización mediante la observación de huevos fertilizados en un microscopio óptico. Los huevos fertilizados se incubaron durante 3 horas a 26°C para luego ser transferidos a frascos estériles de 400 mL, a los que se les agregó 0,8 mg de cloranfenicol a fin de inhibir el crecimiento de bacterias. Finalmente, se recolectaron embriones a las 6 horas post-fertilización (hpf) y larvas a las 12 hpf y 26 hpf, correspondientes a los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva D, respectivamente. También, se mantuvieron embriones en agua de mar acidificada y se recolectaron embriones a las 8 hpf (blástula), y larvas a las 14 hpf (trrocófora) y 28 hpf (larva D).

1.3 Acidificación del agua de mar artificial

La disminución del pH del agua de mar desde 8.0 ± 0.1 (condición normal) a 7.6 ± 0.1 (condición de acidificación) fue realizada mediante la inyección de dióxido de carbono (CO_2) a través de un biorreactor basado en el consumo de azúcar por levaduras. El pH fue

medido mediante un pH metro manual constantemente durante la preparación del agua de mar acidificada. El agua de mar con un pH de 7.6 ± 0.1 se utilizó para mantener embriones y larvas de *C. gigas* en condiciones de acidificación.

1.4 Extracción de ARN total y preparación de librerías de secuenciación de ARN directo

El ARN total fue obtenido desde embriones en estadio de desarrollo de blástula y larvas en estadio de desarrollo de trocófora y larva D mantenidas en condiciones de pH normal y acidificado, utilizando el reactivo TriReagent (Sigma) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la concentración en ng/ μ L fue determinada usando un espectrofotómetro Nanodrop.

Las librerías de secuenciación de ARN directo se realizaron usando el kit SQK-RNA002, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó una síntesis de ADNc empleando el ARN total extraído y adaptadores polyT. Durante el proceso de síntesis de ADNc, se unió al híbrido ADNc-ARN un adaptador RMX, generando híbridos ADNc-ARN estables que posteriormente fueron lavados y concentrados a través de “beads” magnéticas AMPure para ser resuspendidos en el buffer de elucion. Las librerías de secuenciación fueron cargadas en Flow Cells R9.4 (FLO-MIN106) y el ARN fue secuenciado en tiempo real en un secuenciador GridION Mk1 por un periodo de 40 ± 1 horas. Finalmente, se almacenaron los datos de secuenciación en formatos FASTQ y FAST5, los que fueron utilizados para la identificación de las modificaciones químicas presentes en los ARN mensajeros.

1.5 Identificación de modificaciones químicas del ARN en embriones y larvas de *Crassostrea gigas* mantenidas en condiciones de pH normal y acidificado

Las lecturas en formato FAST5 obtenidas desde el experimento de secuenciación de ARN directo fueron procesadas mediante el programa Guppy (<https://community.nanoporetech.com/downloads>). Las lecturas con un valor de calidad Q menor a 7 fueron removidas (`-min_qscore 7`), obteniendo las lecturas de secuencias en formato FASTQ para cada estadio de desarrollo y condición de pH. Estas lecturas en formato

FASTQ fueron mapeadas contra el genoma de *Crassostrea gigas* (Peñaloza et al., 2021) usando el programa minimap2 (Li, 2018). Luego, los alineamientos fueron utilizados para realizar la cuantificación y clusterización de transcritos a isoformas mediante el programa Flair (Tang et al., 2020), con las opciones por defecto. Con este último programa, además se realizaron los cálculos de expresión de isoformas y comparación de empalmes alternativos (o “splicing”), también mediante las opciones por defecto.

Para la detección de modificaciones químicas del tipo m⁶A, se emplearon los alineamientos en formato BAM obtenidos mediante minimap2 (Li, 2018), así como los datos de clusterización de transcritos e isoformas realizada mediante Flair (Tang et al., 2020). Con estos archivos, se establece un índice de búsqueda mediante el programa Nanopolish (Simpson et al., 2017) para que posteriormente se identifiquen las modificaciones m⁶A en las secuencias utilizando el programa Xpore (Pratanwanich et al., 2021). Estos programas en conjunto permiten comparar los alineamientos con los campos de la corriente eléctrica registrada para cada lectura (secuencia de ARN en este caso) que son almacenadas en los archivos FAST5 con el fin de determinar bases nitrogenadas con patrones distintivos de modificaciones post-transcripcionales del tipo m⁶A. Finalmente, se realizó un catálogo de las modificaciones químicas del ARN presentes en embriones y larvas de *C. gigas* mantenidas en condiciones de pH normal y acidificado.

1.6 Identificación de modificaciones químicas de ARN que presenten metilación diferencial entre estadios de desarrollo de *Crassostrea gigas* y/o condiciones de pH

La identificación de patrones de metilación diferencial en cada estadio de desarrollo, así como entre condiciones experimentales de pH, fue realizada mediante el programa Xpore (Pratanwanich et al., 2021). Este programa permite evaluar entre archivos FAST5 y FASTQ tasas de modificaciones diferenciales (DMR por sus siglas en Inglés); estas DMR calculan la diferencia en niveles de modificaciones post-transcripcionales presentes en los archivos FAST5 entre las condiciones experimentales, permitiendo identificar transcritos con niveles de modificaciones químicas diferenciales entre condiciones experimentales (pH normal y acidificado). Finalmente, se compararon aquellos transcritos que presentaron modificaciones químicas diferenciales con los transcritos que presentaba expresión diferencial mediante la

implementación de diagramas de Venn usando el programa InteractiVenn (Haberle et al., 2015).

Objetivo Específico 2: Evaluar los efectos de la disminución del pH del agua de mar en la expresión génica y metilación de transcritos que codifican para proteínas de la matriz orgánica de la concha embrionaria y/o larval en *Crassostrea gigas*.

A continuación, se muestra el diagrama de flujo realizado para el desarrollo del objetivo específico 2 de esta tesis (Figura 6).

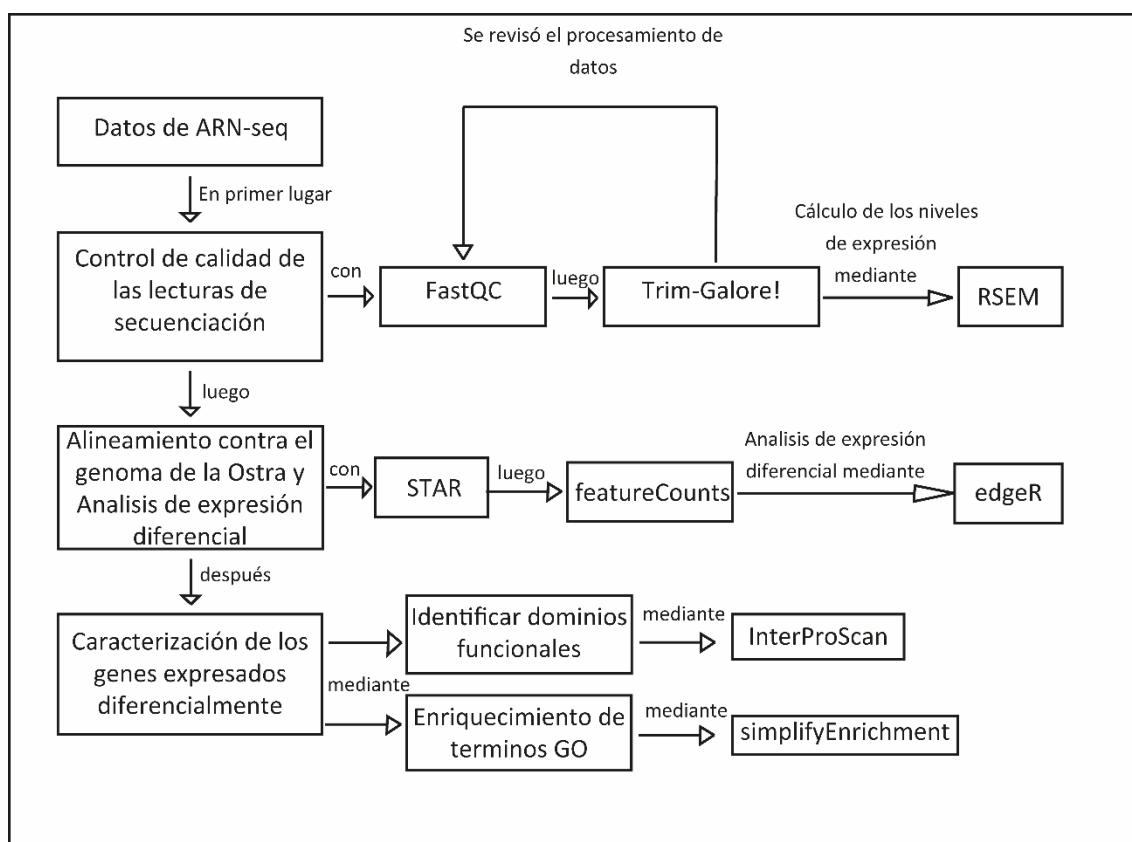


Figura 6. Diagrama de flujo relacionado a la identificación de transcritos con expresión diferencial en embriones y larvas de *Crassostrea gigas* bajo condiciones de acidificación del agua de mar, actividades realizadas para la ejecución del Objetivo Específico 2 de esta tesis.

2.1 Búsqueda de transcritos involucrados en la formación de concha embrionaria y/o larval en *Crassostrea gigas*

Utilizando la literatura ya disponible (Zhao et al., 2018; Li et al 2020; Salamanca-Díaz et al., 2022), se realizó una búsqueda de transcritos que codifican para proteínas que son parte de la matriz orgánica de la concha embrionaria y/o larval de *Crassostrea gigas*. Solo aquellos transcritos que presentan expresión diferencial durante la ontogenia y/o que presenten expresión diferencial producto del desarrollo en el agua de mar acidificada fueron evaluados en las siguientes actividades.

2.2 Identificación de transcritos con expresión diferencial en embriones y larvas de *Crassostrea gigas* mantenidas en condiciones de pH normal y acidificado

Para esta actividad, se utilizaron los datos transcriptómicos no publicados del laboratorio correspondientes a los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva D de *C. gigas* mantenidas en condiciones de pH normal del agua de mar (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1). Con estos datos, se identificaron transcritos con expresión diferencial entre estadios de desarrollo y entre condiciones de pH del agua de mar. Brevemente, el control de calidad de los datos de ARN-Seq se realizó con el programa FastQC (Andrews, 2019). Las secuencias de baja calidad y adaptadores fueron removidas con el programa TrimGalore! (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>). Luego, las lecturas de buena calidad fueron mapeadas contra el genoma de *C. gigas* (Peñaloza et al., 2021) utilizando el programa STAR (Dobin et al., 2013). Los niveles de expresión relativa de los transcritos e isoformas expresados en embriones y larvas de *C. gigas* mantenidas en condiciones de pH normal y acidificado fueron calculados con el programa RSEM (Li & Dewey, 2011). Finalmente, se identificaron los transcritos e isoformas con expresión diferencial mediante el uso del número de lecturas que mapearon a cada transcrito/isoforma de *C. gigas* con el programa featureCounts v2.0.1 (Liao et al., 2014) y también el uso del programa edgeR para identificar los transcritos/isoformas diferencialmente expresadas (Robinson et al., 2010).

2.3 Identificación de los procesos biológicos y funciones moleculares alteradas por la acidificación del agua de mar en embriones y larvas de *Crassostrea gigas*

Con el fin de identificar los procesos biológicos y funciones moleculares asociados a los transcritos de isoformas proteicas que estén metiladas con N⁶-metiladenosina en las muestras de blástula, trocófora, y larva-D, así como aquellos transcritos de isoformas proteicas que se ven afectadas por la acidificación del agua de mar, se realizó una anotación de los términos de Ontología de Genes (términos GO por sus siglas en Inglés) mediante el programa EnTAP (Hart et al., 2021). Brevemente, se realizó una búsqueda de similitud de secuencias mediante el programa DIAMOND (Buchfink et al., 2015), empleando las bases de datos de “non-redundant proteins, NR” y “reference-sequences, RefSeq” de NCBI (O'Leary et al., 2016, Sayers et al., 2022), así como la base de datos SwissProt de UniProt. Posteriormente, el programa EnTAP selecciona la anotación final e identifica posibles contaminantes, para finalmente realizar la asignación independiente de secuencias de proteínas traducidas a familias génicas usando la base de datos eggNOG (Huerta-Cepas et al., 2019), la cual incluye información de dominios funcionales de proteínas (SMART/Pfam), términos de la Ontología de Genes (GO), y asignación de rutas y vías metabólicas KEGG.

Mediante esta anotación se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO mediante el programa topGO (Alexa & Rahnenfuhrer 2022), usando los transcritos e isoformas que presentan tanto metilaciones m⁶A y expresión diferencial entre los estadios de desarrollo y/o las condiciones de pH del agua de mar. Los términos GO enriquecidos fueron visualizados mediante el programa REVIGO (Supek et al., 2011).

RESULTADOS

Identificación de regiones con metilaciones m⁶A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*

Empleando el ARN total extraído, los embriones en estadio de desarrollo de blástula, y las larvas en estadios de desarrollo de trocófora y larva D, mantenidas en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y acidificado (7.6 ± 0.1), fueron utilizados para realizar la secuenciación de ARN directo mediante la plataforma de secuenciación de Oxford Nanopore Technologies.

Las lecturas eléctricas crudas obtenidas en formato FAST5 de los datos de secuenciación directa de ARN de cada estadio de desarrollo (blástula, trocófora, y larva-D) y en cada condición de pH (pH normal y pH acidificado) fueron filtradas, removiendo las lecturas de baja calidad (Q-score < 7) y las secuencias que contienen polímeros de adaptadores. Con este procesamiento, se obtuvieron secuencias de alta calidad en formato FASTQ que fueron alineadas al genoma de referencia de *Crassostrea gigas* (Peñaloza et al., 2021) (Tabla 1).

Tabla 1. Procesamiento las lecturas obtenidas mediante secuenciación de ARN directo con la tecnología Oxford Nanopore Technologies para la identificación de modificaciones m⁶A. Embriones y larvas en estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D se desarrollaron en condiciones de pH normal del agua de mar (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1). El experimento fue realizado mediante dos eventos de desoves y fertilizaciones independientes con el fin de obtener réplicas biológicas (REP1 y REP2). N50 = métrica estadística que indica que el 50% de las lecturas tiene un tamaño igual o mayor al indicado en la columna.

Estadio de desarrollo y condición de pH	N50	Número de lecturas crudas	Número de lecturas procesadas	% de lecturas alineadas contra el genoma de referencia
Blástula pH normal REP1	651 pb	1.72 M	1.46 M	100.00%
Blástula pH normal REP2	650 pb	1.52 M	1.24 M	100.00%
Blástula pH acidificado REP1	1,06 kb	2.17 M	2.05 M	98.81%
Blástula pH acidificado REP2	981 pb	1.40 M	1.30 M	99.96%
Trocófora pH normal REP1	726 pb	2.75 M	2.42 M	100.00%
Trocófora pH normal REP2	1.05 kb	1.65 M	1.55 M	99.21%
Trocófora pH acidificado REP1	671 pb	1.36 M	1.20 M	100.00%
Trocófora pH acidificado REP2	673 pb	1.78 M	1.46 M	100.00%
Larva-D pH normal REP1	992 pb	1.63 M	1.32 M	99.16%
Larva-D pH normal REP2	936 pb	1.35 M	1.17 M	98.13%
Larva-D pH acidificado REP1	1.08 kb	0.91 M	0.77 M	99.87%
Larva-D pH acidificado REP2	1.01 kb	1.99 M	1.74 M	99.18%

Con los alineamientos resultantes, se realizaron análisis de cuantificación, clusterización, y expresión de transcritos/isoformas mediante el programa Flair (Tang et al., 2020). Posteriormente, se realizó la identificación de modificaciones químicas del tipo m⁶A mediante Xpore (Pratanwanich et al., 2021), empleando los archivos de fluctuaciones eléctricas FAST5 y los archivos de alineamientos obtenidos de los procesos anteriores en formato BAM. Utilizando la anotación de los transcritos e isoformas que fueron detectados, cuantificados, y clusterizados anteriormente en las lecturas de alta calidad en cada muestra con condiciones de pH de agua de mar normal y acidificado mediante Flair (Tang et al., 2020), fue posible determinar modificaciones químicas en regiones de 5 kmers, asociados a motivos DRACH (D = A/G/U, R = A/G, H = A/C/U) en las secuencias nucleotídicas. En total se identificaron 59,161, 6,264, y 28,972 regiones de 5-mers con motivos DRACH en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente (Figura 7). Estos motivos DRACH fueron filtrados con el fin de obtener modificaciones químicas m⁶A con significancia estadística. El filtro empleado fue de un valor-p menor a 0.00001, obteniendo un total de 1,205, 678, y 1,730 motivos DRACHs metilados en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente (Figura 7).

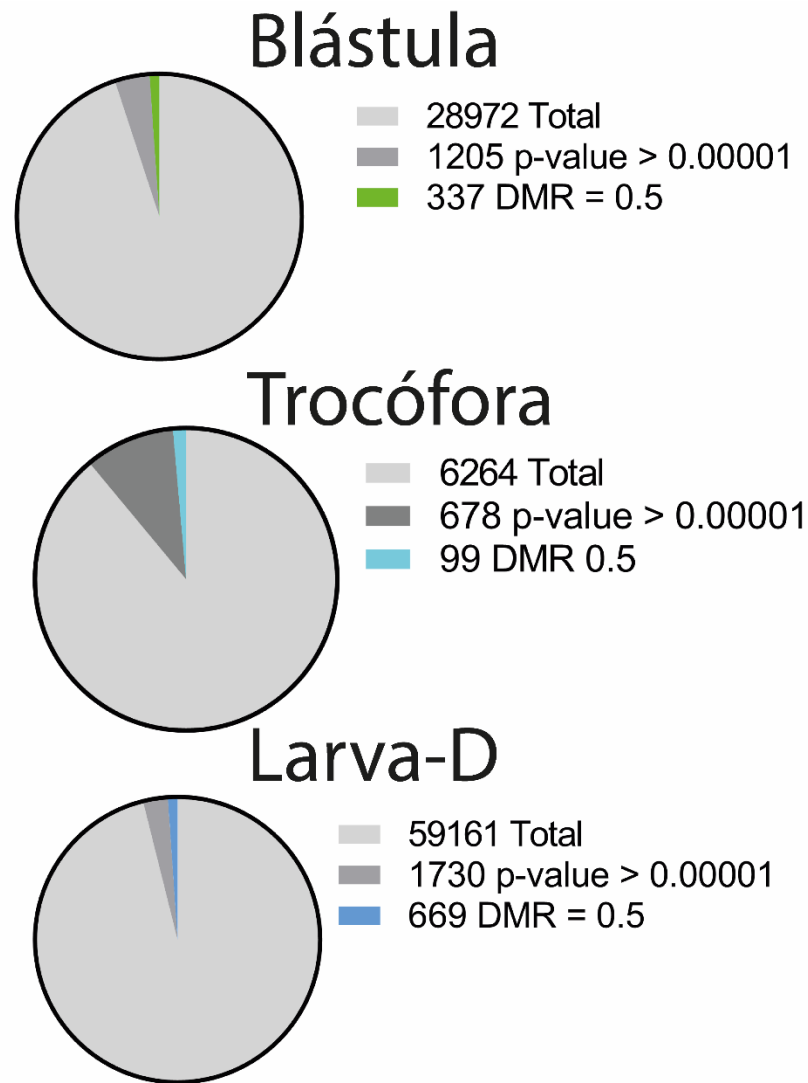


Figura 7. Número de modificaciones N⁶-metiladenosinas (m⁶A) detectadas en regiones de 5-mers en las secuencias de ARN en los diferentes estadios de desarrollo de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*. Regiones con un valor-p menor a 0.00001 corresponden a regiones cuyas metilaciones detectadas son estadísticamente significativas. Regiones con DMR = 0.5 indican una tasa diferencial de metilación mayor a 0.5 o menor a -0.5 entre las condiciones de pH normal y pH acidificado del agua de mar.

Patrones en la metilación de motivos DRACHs durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*

El sesgo de uso de motivos DRACHs para la metilación de transcritos/isoformas con modificaciones químicas del tipo m⁶A describe la preferencia de la localización de estas

modificaciones sobre un determinado grupo de secuencias bajo el motivo DRACH en un transcrito en particular, dependiendo del tipo celular estudiado (Bayoumi & Munir, 2021, Campos et al., 2022, Rückle et al., 2022). Sin embargo, no existe mucha información acerca de las preferencias en los patrones de metilación m⁶A dentro del consenso DRACH durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), mucho menos si pueden existir alteraciones en esta preferencia producto del desarrollo en condiciones de estrés ambiental, por ejemplo, agua de mar acidificada. Por ello, en esta tesis se realizó un análisis comparativo sobre el uso de motivos DRACHs, dato proporcionado por el mismo análisis de detección de metilaciones mediante el programa xPore (Pratanwanich et al., 2021) en los patrones de metilación de m⁶A obtenidos tras el análisis de identificación de metilaciones, buscando posibles preferencias sobre motivos DRACHs que se encuentren fuerte o débilmente metilados. Para ello, se determinaron como motivos DRACHs fuertemente metilados los 5 patrones más altos por muestra de entre los 18 posibles patrones descritos (Figura S1), mientras que los motivos DRACHs débilmente metilados fueron aquellos 5 patrones más bajos por muestra de entre los 18 posibles patrones (Figura S1).

Las metilaciones m⁶A detectadas en motivos DRACH con un valor-p menor a 0.00001 en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D muestran distintos niveles de metilación para cada patrón dentro del motivo DRACH (Figura 8A y Figura S1). De la Figura 8A, podemos observar que en el estadio de desarrollo de blástula los motivos DRACHs catalogados como “fuertes” corresponden a los patrones AAAC, AGAC, GGAC, AAAC, y GAAC, con 230, 113, 111, 91, y 87 regiones metiladas, respectivamente, de un total de 1206 regiones analizadas, lo que comprende un 52.40% de todas las metilaciones m⁶A detectadas para ese estadio de desarrollo (Figura 8A y Figura S1). Similarmente en los estadios de desarrollo de larvas trocóforas, se encuentran metilados fuertemente los patrones de AAAC, GGAC, AGAC, GAAC, y AAAC, con 95, 76, 70, 60, y 45 regiones metiladas, respectivamente, de un total de 678 regiones analizadas, lo que comprende un 51,03% de todas las metilaciones m⁶A reportadas para ese estadio de desarrollo (Figura 8A y Figura S1). Del mismo modo, en las larvas-D, los motivos DRACHs fuertemente metilados corresponden a AAAC, GGAC, GAAC, AAAC, y AGAC, con 300, 205, 139, 125, y 122, respectivamente, de un total de 1738 regiones analizadas, lo que corresponde a un 51,26% de todas las metilaciones m⁶A detectadas para ese estadio de

desarrollo (Figura 8A y Figura S1). Interesantemente, estos resultados posicionan a los patrones AAAC, GGAC, AAAC, GAAC, y AGAC como motivos DRACHs fuertemente metilados en todas las regiones metiladas detectadas para cada muestra de los tres estadios de desarrollo evaluados durante esta tesis. Además, estos motivos DRACHs “fuertes” siguen siendo los patrones con mayor nivel de metilación dentro de las regiones metiladas presentes, luego de aplicar una tasa de metilación diferencial de 0.5 (DMR 0.5), entre los estadios del desarrollo mantenidos en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y acidificado (7.6 ± 0.1) (Figura 8B y Figura S2). Este resultado indicaría que los patrones AAAC, GGAC, AAAC, GAAC, y AGAC, conforman motivos DRACH fuertemente metilados y son patrones preferentes en el marcaje de transcritos con N⁶-metiladenosina durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*C. gigas*), así como en condiciones de acidificación del agua de mar.

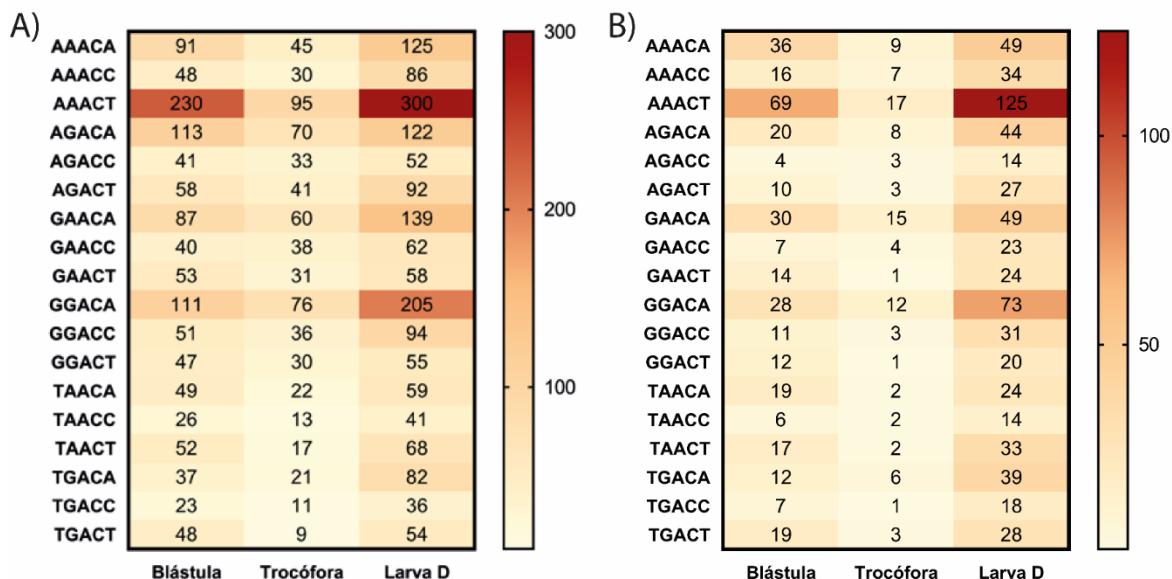


Figura 8. Preferencia de metilación m⁶A en motivos DRACHs detectadas en las secuencias de ARN en los diferentes estadios de desarrollo de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*. Los patrones DRACHs presentes corresponden a las regiones metiladas en embriones en estadio de desarrollo de blástula y larvas en estadio de desarrollo de trocófora y larva-D en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1). En **(A)** se muestran los patrones DRACHs en regiones metiladas con un valor-p menor a 0.00001 en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D; mientras que en **(B)** se muestran los patrones DRACHs en regiones metiladas con un valor-p menor a 0.00001 y que se encuentran diferencialmente metiladas entre la condición de pH normal y pH acidificado con un DMR de 0.5. Para observar con claridad los motivos DRACHs catalogados como “fuerte” y “débil”, ver Figuras S1 y Figura S2.

En contraparte a los motivos DRACHs catalogados como “fuertes”, las metilaciones que se presentan como motivos DRACHs débilmente metilados en embriones en estadio de blástula corresponden a los patrones AGACC, GAACC, TGACA, TAACC, y TGACC, con 41, 40, 37, 26, y 23 regiones metiladas, respectivamente, de un total de 1206 regiones analizadas (Figura 8A y Figura S1), lo que corresponde a tan solo un 13,84% de todas las metilaciones m⁶A detectadas para ese estadio de desarrollo. Mientras que en larvas en el estadio de desarrollo de trocófora, los motivos DRACHs débilmente metilados corresponden a los patrones TGACA, TAACT, TAACC, TGACC, y TGACT, con 21, 17, 13, 11, y 9 regiones metiladas, respectivamente, de un total de 678 regiones analizadas, lo que corresponde a un 10,47% de todas las metilaciones m⁶A detectadas para ese estadio de

desarrollo (Figura 8A y Figura S1). Finalmente, en las larvas en estadio de desarrollo de larva-D, los motivos DRACHs catalogados como “débiles” corresponden a GGACT, TGACT, AGACC, TAACC, y TGACC, con 55, 54, 52, 41, y 36 regiones metiladas, respectivamente, de un total de 1738 regiones analizadas, lo que corresponde a un 13,69% de todas las metilaciones m⁶A detectadas para ese estadio de desarrollo (Figura 8A y Figura S1). Los resultados muestran que estos motivos DRACHs débilmente metilados durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*C. gigas*) pueden cambiar levemente entre los distintos estadios de desarrollo, donde únicamente los patrones TAACC y TGACC se mantienen como DRACHs débilmente metilados (Figura S1).

Sin embargo, a diferencia de los motivos DRACHs fuertemente metilados, al analizar las regiones metiladas con un DMR = 0.5, es decir, regiones cuyos niveles de metilación difieren entre los embriones/larvas mantenidas en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y acidificado (7.6 ± 0.1), existen diferencias en relación con la tendencia general de los motivos DRACHs débiles antes mencionados; no obstante, los patrones TAACC y TGACC se mantienen como motivos DRACHs débilmente metilados tanto entre las regiones con niveles de metilación diferencial, como en los distintos estadios de desarrollo de la Ostra del Pacífico (*C. gigas*) (Figura S1 y Figura S2).

Si bien los resultados sugieren una preferencia general durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico por los motivos DRACHs fuertes (AAACT, GGACA, AAACA, GAACA, y AGACA) para modificar transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A en tales patrones, existen diversos motivos DRACHs metilados con niveles de metilación menos frecuentes y que también pueden variar entre condiciones de pH y entre los estadios de desarrollo utilizados en esta tesis. En la Figura 9 se observa el número de motivos DRACHs metilados en embriones/larvas mantenidas en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y acidificado (7.6 ± 0.1). En dicha figura se puede apreciar que la preferencia de metilación m⁶A por los motivos previamente mencionados como DRACHs “fuertes” mantiene altos números de metilación tanto embriones/larvas que fueron mantenidas en condiciones de pH normal y pH acidificado. Del mismo modo, este patrón se cumple para los motivos DRACHs “débiles” (TAACC y TGACC) con pocas regiones metiladas. Interessantemente, nuestros resultados sugieren que si bien existen preferencias por algunos motivos DRACHs, como se ha

reportado en especies de animales y virus (Bayoumi & Munir, 2021, Campos et al., 2022, Rückle et al., 2022), los patrones de metilación m⁶A son diversos y dinámicos a lo largo de la ontogenia de la Ostra del Pacífico y frente a cambios ambientales - en este caso disminución del pH del agua de mar. En el caso del motivo DRACH “fuerte” (AAACA) en los embriones en el estadio de desarrollo de blástula mantenidos en condiciones de pH normal y pH acidificado, existen 12 y 19 metilaciones sobre AAACA, respectivamente, sugiriendo una leve diferencia. Sin embargo, esto no se observa en las larvas en estadio de desarrollo de trocófora, ni en el estadio de desarrollo de larva-D (Figura 9 y Tabla S1). Similarmente, este comportamiento parece repetirse en múltiples motivos DRACHs, exceptuando casos como el motivo DRACHs “débil” (TAACC), con un mayor número de regiones metiladas diferencialmente en los embriones/larvas mantenidas en condición de acidificación (pH 7.6 ± 0.1) en los tres estadios de desarrollos (blástula, trocófora, y larva-D) analizados en esta tesis.

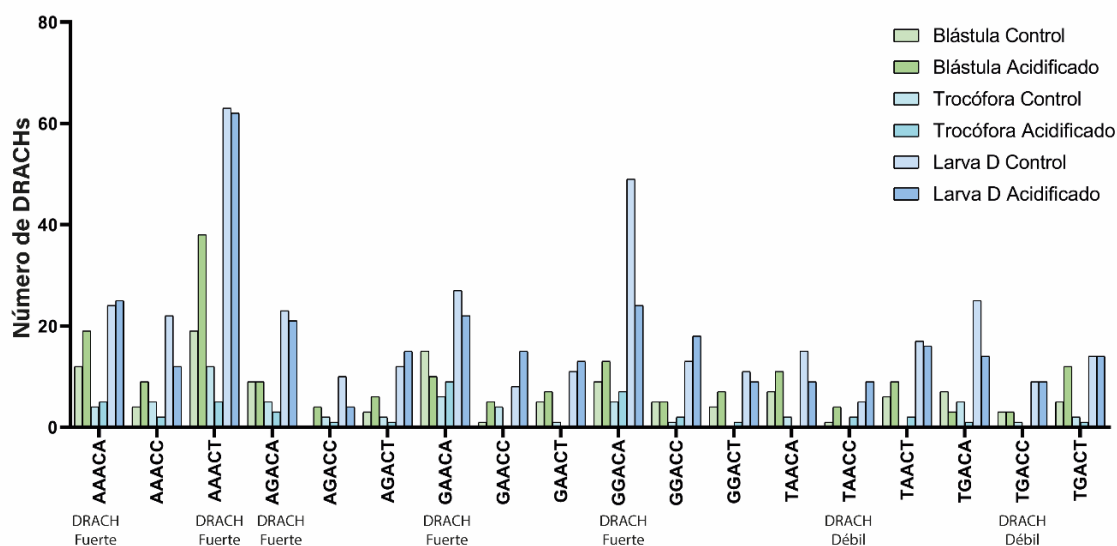


Figura 9. Niveles de metilación m⁶A en motivos DRACHs detectadas en las secuencias de ARN en los diferentes estadios de desarrollo de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas* y en las distintas condiciones de acidificación del agua de mar. Los motivos DRACHs que se observan corresponden a las regiones metiladas entre los embriones/larvas en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D mantenidos en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1). Específicamente, se muestran los motivos

DRACHs en regiones metiladas que fueron identificados con un nivel de confianza de un valor-p menor a 0.00001 y que, a su vez, se encuentran diferencialmente metiladas, con un DMR de 0.5, entre los embriones/larvas mantenidas en ambas condiciones de pH del agua de mar. Para observar con claridad el número de motivos DRACHs (regiones metiladas) por estadio de desarrollo y condición de pH, ver Tabla S1.

Identificación de transcritos e isoformas con metilaciones m⁶A expresadas durante la ontogenia de *Crassostrea gigas* y en condiciones de acidificación del agua de mar

Empleando la detección de metilaciones m⁶A realizada a nivel de 5-kmers, se extrajeron las regiones codificantes para transcritos, y sus respectivas isoformas, basándose en la anotación del genoma de *C. gigas* (Peñaloza et al., 2021). Además, gracias a los resultados de cuantificación, clusterización, y expresión de transcritos e isoformas obtenidas con el programa Flair (Tang et al., 2020) fue posible establecer el número total de transcritos e isoformas que poseen regiones con metilaciones m⁶A.

En la Figura 10, considerando todas las regiones DRACH, que poseen metilaciones en la adenina central del motivo, con una relevancia significativa (valor-p menor a 0.00001), se puede observar que existen un total de 1205 regiones metiladas en 840 transcritos (y 992 isoformas de transcritos) que son expresados en el estadio de blástula en condición de pH normal. Al respecto de las larvas trocóforas, un total de 350 transcritos (y 465 isoformas de transcritos) presentan regiones metiladas; mientras que en el estadio de larva-D, se detectaron un total de 1250 transcritos (y 1426 isoformas de transcritos) con metilaciones m⁶A (Figura 10). El número de regiones m⁶A metiladas consideradas diferencialmente metiladas (DMR = 0.5) en cada estadio de desarrollo producto del mantenimiento de embriones/larvas en pH acidificado, disminuye considerablemente respecto de la identificación de regiones metiladas en embriones/larvas en condiciones de pH normal (Figura 10). Por ejemplo, el número de transcritos e isoformas con metilación diferencial producto del pH acidificado del agua de mar en el estadio de blástula corresponden a 295 y 316, respectivamente (Figura 10). Interesantemente, en las larvas en el estadio de desarrollo de trocófora se detectan 76 transcritos y 86 isoformas con niveles de metilación diferencial producto del pH acidificado (Figura 10). En contraparte, larvas en el estadio de desarrollo de larva-D presentan el mayor

número de metilaciones m⁶A producto del pH acidificado con 584 transcritos y 625 isoformas metiladas (Figura 10).

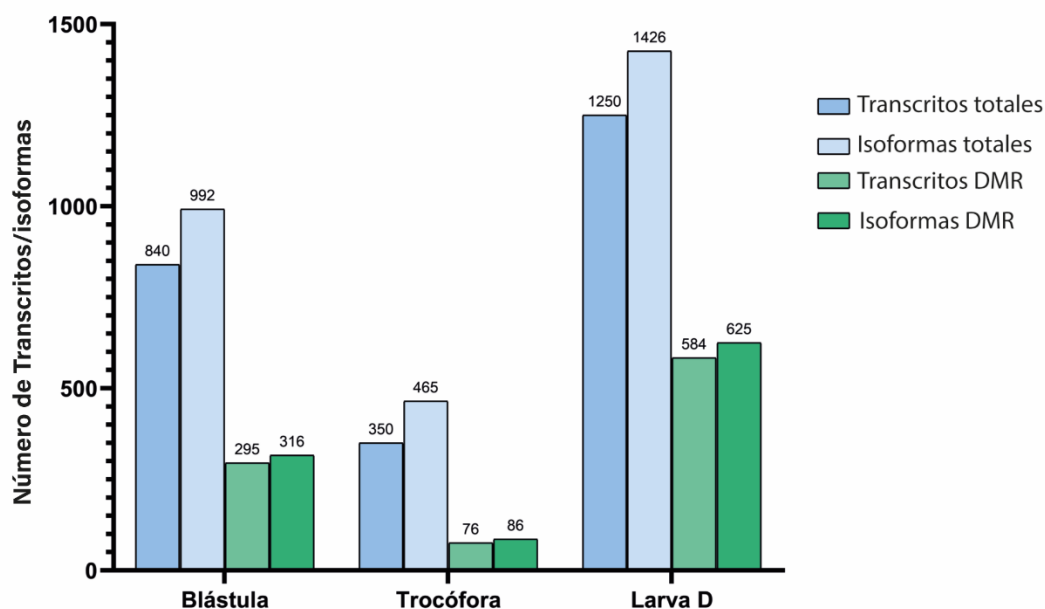


Figura 10. Número de transcritos e isoformas de transcritos detectadas con modificaciones N⁶-metiladenosinas en embriones y larvas de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Las barras celestes indican el número total de transcritos e isoformas con metilaciones m⁶A en los diferentes estadios de desarrollo (blástula, trocófora, y larva-D) de *C. gigas* en embriones/larvas mantenidas en condiciones de pH normal, mientras que las barras verdes muestran el número total de transcritos e isoformas con metilaciones m⁶A y que se encuentran diferencialmente metilados en los embriones/larvas mantenidas en condiciones de pH acidificado.

Es importante considerar que pueden existir múltiples regiones metiladas dentro de un transcrito, siendo posible que las isoformas de un ARN mensajero posean múltiples regiones metiladas, producto del splicing alternativo que ocurre durante el proceso de maduración en la transcripción (Adhikari et al., 2016, Hausmann et al., 2016, Xiao et al., 2016, Zhu et al., 2023). En la Figura 10 y las Tablas S2-S4 se muestran los 30 transcritos con mayor número de regiones metiladas y la distribución de las modificaciones m⁶A por isoforma en cada estadio de desarrollo; eso sí, no considerando una condición de pH del agua de mar en particular. Para ejemplificar esto, el gen/transcrito G14250, con estado de

metilación m6A en todos los estadios de desarrollo, posee distintas isoformas de transcritos metilados (Tablas S2-S4). Específicamente, en el estadio de desarrollo de blástula, el transcrito G14250 posee 17 regiones metiladas, las cuales están comprendidas en 5 isoformas de transcritos que se indican a continuación: G14250.1, G14250.15, G14250.21, G14250.8, y G14250.9. A su vez, estas isoformas de transcritos tienen 3, 5, 3, 3, y 3 regiones metiladas, respectivamente. El mismo transcrito G14250, pero en el estadio de desarrollo de trocófora presenta las siguientes isoformas metiladas: G14250.1, G14250.21, y G14250.15, y específicamente con una región metilada en cada isoforma. Finalmente, en las larvas en estadio de desarrollo de larva-D para el transcrito G14250 se detectaron metilaciones en las isoformas de transcritos G14250.8, G14250.15, G14250.9, y G14250.1, con 3, 3, 2, y 1 región metilada, respectivamente. Utilizando la anotación del genoma de *Crassostrea gigas* (Peñaloza et al., 2021) y el servidor de Ensembl Metazoa (Yates et al., 2022), se sabe que las únicas isoformas codificantes corresponden a G14250.21 y G14250.8, siendo esta última la catalogada como isoforma canónica. En contraparte, las isoformas G14250.1, G14250.15, y G14250.9 se encuentran catalogadas como ARN no codificante.

Al comparar las isoformas de transcritos que se encuentran metiladas diferencialmente durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*C. gigas*) que fueron mantenidas en condiciones de acidificación del agua de mar, podemos observar isoformas diferencialmente metiladas que están presentes en más de un estadio de desarrollo (Figura 11). Por ejemplo, entre los embriones en estadio de desarrollo de blástula y larvas en estadio de desarrollo de trocófora, 3 isoformas de transcritos, G19035.18, G25117.2, y G14250.15, presentan metilaciones m6A (Figura 11). Entre las larvas en estadios de desarrollo de trocófora y larva-D, un total de 6 isoformas (G11124.3, G21637.9, G14469.1, G12645.16, G4644.8, y G32105.1) presentan metilaciones m6A, mientras que en embriones en estadio de desarrollo de blástula y larvas en estadio de desarrollo de larva-D se observa un total de 14 isoformas (G21656.2, G15290.2, G10813.1, G12448.1, G20474.1, G14430.3, G14028.1, G22781.4, G35061.1, G15670.1, G24754.1, G15632.1, G319.1, y G23337.4) con metilaciones m6A (Figura 11). Finalmente, entre los tres estadios del desarrollo evaluados en esta tesis existe solo una isoforma (G14952.2) que está constantemente metilada durante la ontogenia de *C. gigas* (Figura 11). Estos resultados demuestran el gran dinamismo de los patrones de metilación m6A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico y condiciones de

pH del agua de mar. Adicionalmente, para cada una de las isoformas de transcritos que están metiladas en dos o más estadios de desarrollo, se realizó un análisis de similitud de secuencia mediante el algoritmo BLASTP (Camacho et al., 2008) y la base de datos de NCBI de proteínas no redundantes para determinar la proteína codificada por cada una de estas isoformas de transcritos (Figura 11).

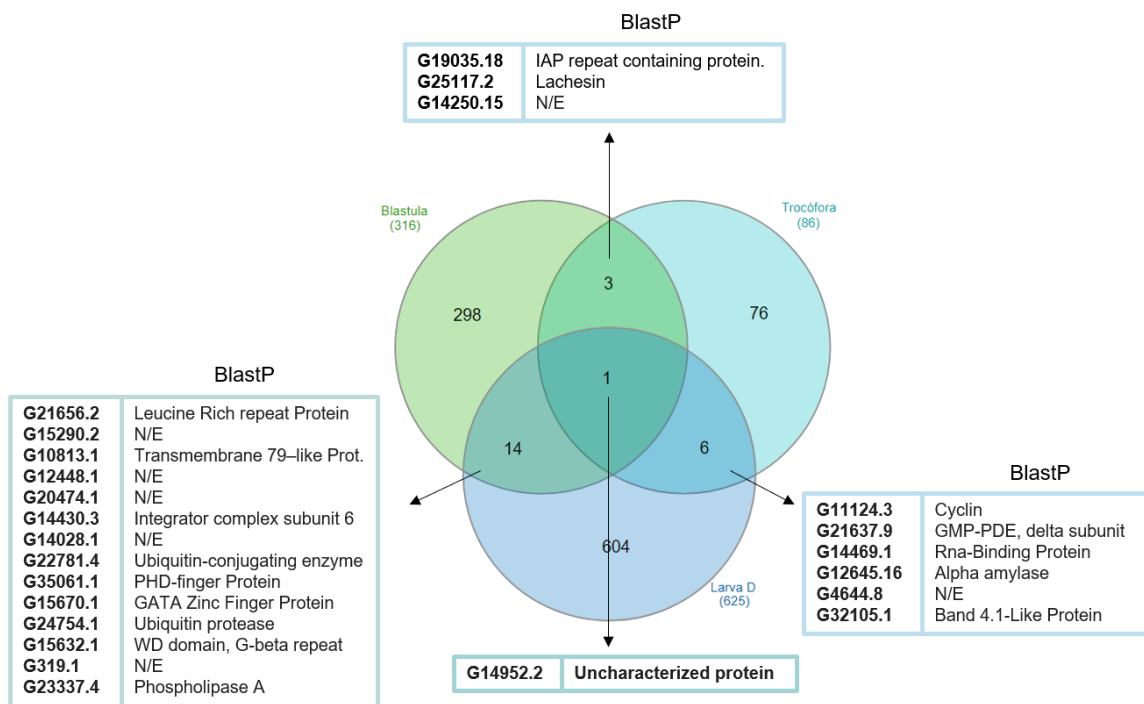


Figura 11. Isoformas cuyos transcritos que presentan la modificación química N⁶-metiladenosinas y con niveles de metilación diferencial producto de mantener embriones y larvas de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en condiciones de pH acidificado. El diagrama de Venn muestra el número de isoformas metiladas que son exclusivas para cada estadio de desarrollo, así como aquellas que son compartidas (y que se encuentran metiladas) en dos o más estadios de desarrollo. La información que se muestra en los recuadros corresponden a los análisis de similitud de secuencias aminoácidicas de las isoformas con metilaciones m⁶A en dos o más estadios de desarrollo.

Análisis de enriquecimientos de términos GO en las isoformas de transcritos con metilaciones m⁶A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*

Las metilaciones m⁶A detectadas en las diversas isoformas de transcritos expresadas en los embriones en estadio de desarrollo de blástula, así como las larvas en los estadios de desarrollo de trocófora y larva-D, carecen de una caracterización molecular en términos de qué procesos biológicos, funciones moleculares, y compartimentos celulares estarían asociados. Por lo tanto, se tuvo que realizar una anotación funcional de términos de ontología de genes (términos GO) para los transcritos, y sus respectivas isoformas, de *C. gigas* mediante la pipeline EnTAP (Hart et al., 2020). Con esta anotación funcional fue posible realizar un análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes (términos GO) mediante el paquete de R topGO (Alexa & Rahnenfuhrer 2022), tanto a nivel de transcritos como de isoformas. En la Figura 12, se observa una variedad de procesos biológicos asociados a los ARN mensajeros (transcritos) e isoformas con niveles de metilación diferencial de m⁶A producto del desarrollo de embriones y larvas de *C. gigas* en agua de mar acidificada. De estos procesos biológicos resaltan los términos GO enriquecidos relacionados con regulación de procesos del ciclo celular, organización del ciclo celular, procesos nucleares, y procesos del desarrollo en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D (Figura 12). Además, existen varios términos GO enriquecidos relacionados a procesos del desarrollo, regulación de vías metabólicas, y regulación de la expresión génica (Figura 12). Estos resultados apuntarían a la potencial implicación funcional de las metilaciones del tipo m⁶A en la regulación de estos procesos biológicos en los estadios de desarrollo empleados en esta tesis (Figura S3). En paralelo, estas modificaciones m⁶A están vinculadas a transcritos e isoformas cuyos términos GO enriquecidos se relacionan a ribosomas, complejos proteicos, citoesqueleto, y diversos organelos (Figura 12). Interesantemente, si bien existe un notable enriquecimiento de términos GO de los transcritos/isoformas metilados relacionados a transporte de moléculas, unión de ARNs y proteínas, estos transcritos/isoformas metiladas fueron principalmente detectadas en larvas en el estadio de desarrollo de trocófora y en menor proporción en embriones en el estadio de desarrollo de blástula (Figura 12), mientras que en larvas en el estadio de desarrollo de larva-D no existen términos GO enriquecidos en los transcritos/isoformas asociados a compartimentos celulares (Figura 12).

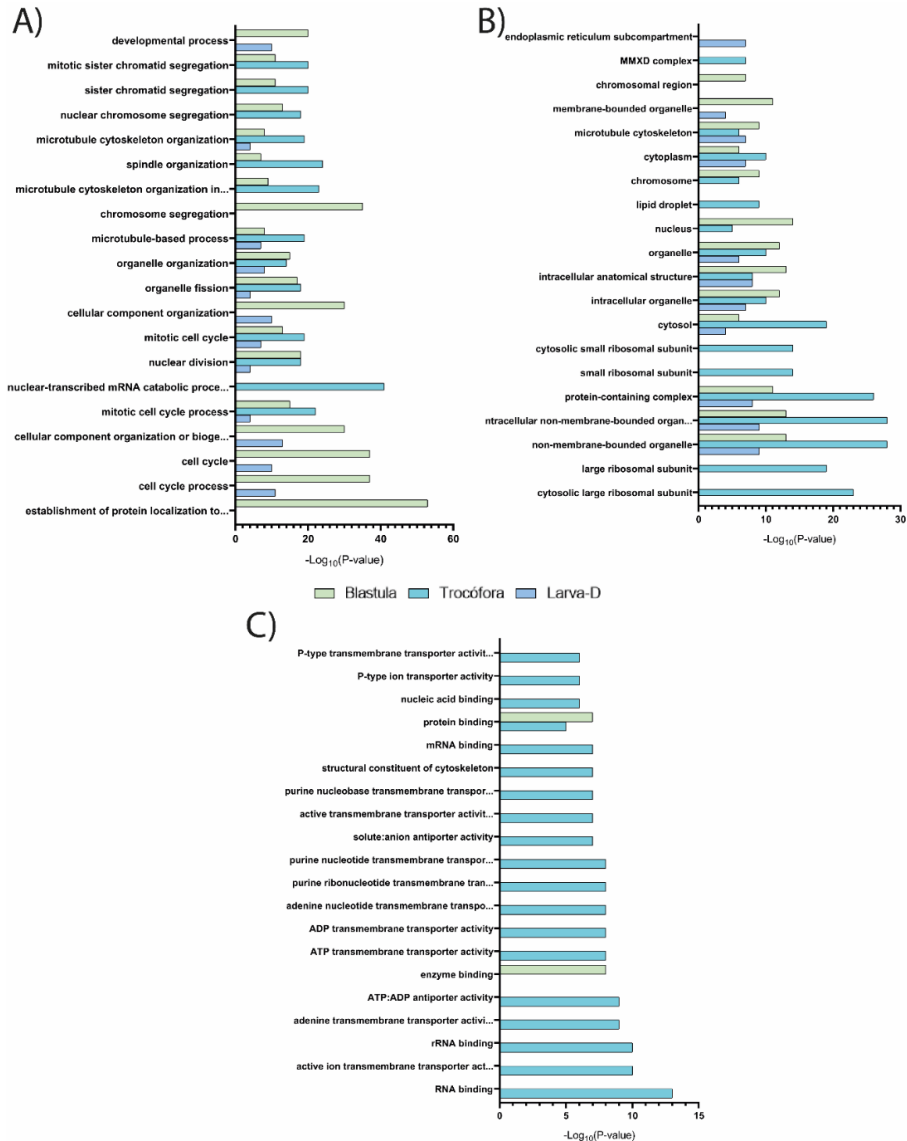


Figura 12. Anotación funcional de los transcritos e isoformas con niveles de metilación m⁶A diferencial producto de la exposición a agua de mar acidificada durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*. Las gráficas de barras muestran los top 20 términos GO enriquecidos con un valor-p menor a 0.05. En (A) se muestran los Procesos Biológicos enriquecidos en embriones en estadio de desarrollo de blástula (barras verde), en larvas en estadio de desarrollo de trocófora (barras celeste), y larvas en estadio de desarrollo de larva-D (barras azules). En (B) se muestran los Compartimentos Celulares enriquecidos en embriones en estadio de desarrollo de blástula (barras verde), en larvas en estadio de desarrollo de trocófora (barras celeste), y larvas en estadio de desarrollo de larva-D (barras azules). En (C) se muestran las Funciones Moleculares enriquecidas en embriones en estadio de desarrollo de blástula (barras verde), en larvas en estadio de desarrollo de trocófora (barras celeste), y larvas en estadio de desarrollo de larva-D (barras azules). Para ver más en detalle los Procesos

Biológicos enriquecidos en transcritos/isoformas metiladas en cada estadio de desarrollo utilizado en esta tesis, ver Figura S3.

Identificación de dominios funcionales asociados a los productos génicos de los transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y en condiciones de acidificación del agua de mar

Si bien existen múltiples transcritos e isoformas que codifican para proteínas con metilaciones m⁶A durante la ontogenia de *C. gigas*, no necesariamente todas estas isoformas están vinculadas al proceso de formación de estructura mineralizada, ya sea la concha embrionaria o larval, en *C. gigas*. Para determinar cuáles isoformas de transcritos - y sus productos génicos - están asociadas a la formación de la concha en *C. gigas*, utilizamos una aproximación indirecta basada en la presencia de dominios funcionales en secuencias de aminoácidos que codifican los transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A.

En este contexto, las proteínas codificadas por los transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A poseen diversos dominios funcionales asociados a la formación de la concha (biomineralización) en moluscos. Interesantemente, existen dominios funcionales que están presentes en dos o más estadios de desarrollo analizados en esta tesis, así como algunos que tiene un patrón estadio de desarrollo específico (Figura 13), apoyando los resultados anteriores sobre el gran dinamismo de las metilaciones m⁶A durante la ontogenia de *C. gigas*. Dentro de los dominios funcionales asociados a biomineralización en moluscos, podemos encontrar dominios WD, Tetratricopeptido, repeticiones de Ankyrin, repeticiones similares a Armadillo/beta-catenina, PDZ, y KH (Figura 13). De estos dominios funcionales se ha descrito que participan en la regulación del ciclo celular, transducción de señales, y la organización del citoesqueleto, mediante interacciones proteína-proteína o proteína-ligando (Marin, 2022). Del mismo modo, existen dominios funcionales asociados a unión a ácidos nucleicos, dedos de Zinc, repeticiones de Leucina (Figura 13). De estos dominios funcionales se ha descrito que participan en la regulación de genes y en mediar interacciones proteína-proteína que son necesarias para ensamblar las matrices orgánicas de la concha (Klug, 2010, Marin, 2020). Finalmente, existen dominios funcionales relacionados con actividad enzimática, incluyendo proteína quinasa, receptores de tirosina proteína quinasa, y dominios GTPasa (Figura 13). Estos dominios funcionales han sido relacionados con funciones de

señalización y regulación de la secreción de componentes minerales y orgánicos de la concha (Aguilera et al., 2014, Saotome et al., 2016, Marin, 2020).

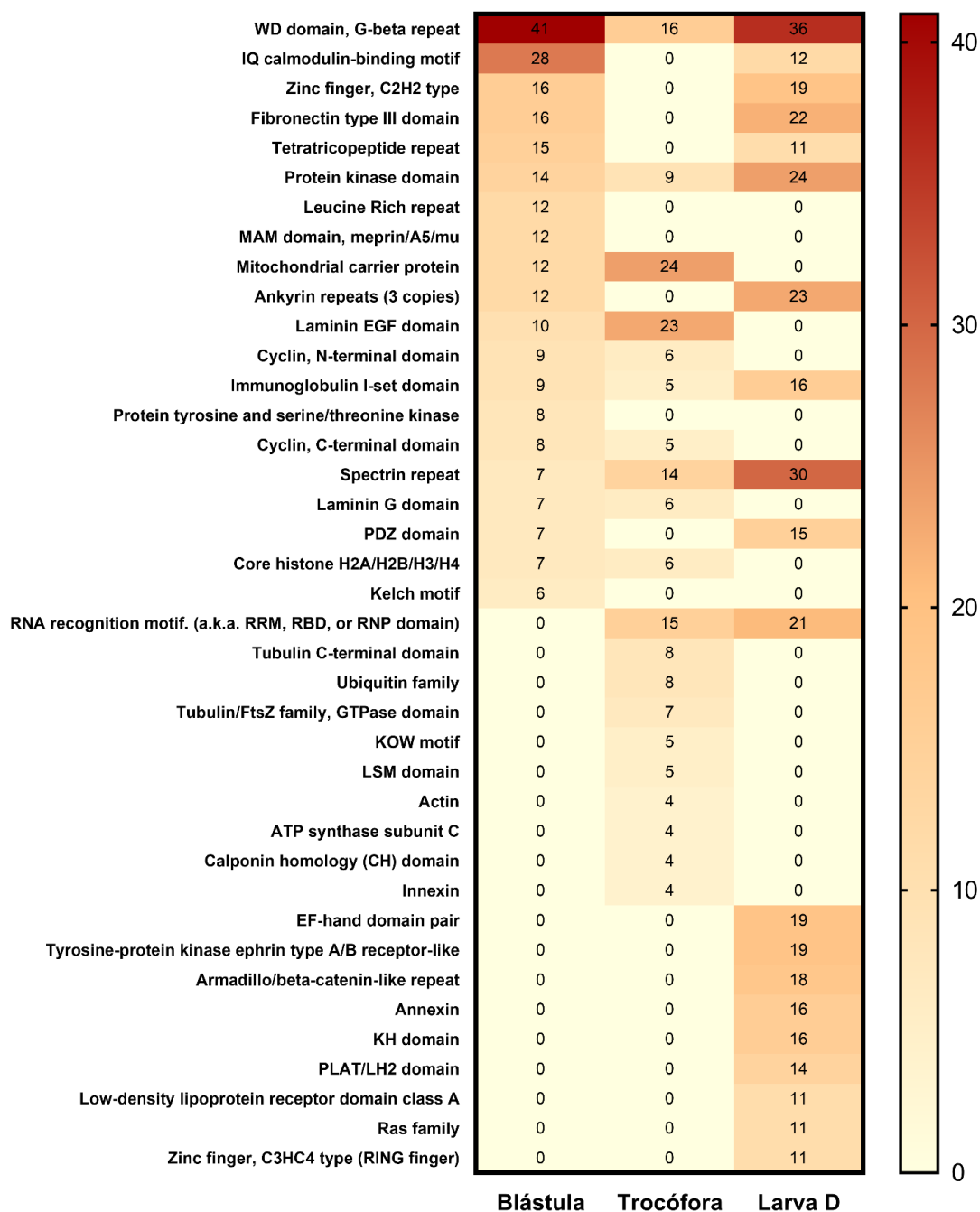


Figura 13. Dominios funcionales más abundantes presentes en las secuencias de aminoácidos codificados por transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*.

Mapa de calor indicando el número de dominios funcionales contenidos en cada transcrito/isoforma en embriones en estadio de desarrollo de blástula, así como en larvas en los estadios de desarrollo de trocófora y larva-D.

Esta distribución de variados dominios funcionales asociados a diversas funciones se mantiene en los transcritos/isoformas con niveles de metilación diferencial producto de mantener embriones/larvas en condiciones de agua de mar acidificada (Figura 14). Estos dominios funcionales están implicados en la adhesión celular, adhesión de matriz extracelular, dominios de fibronectina tipo 3, Laminina G, EGF, Anexina, y EF-hand (Figura 14). Todos estos dominios funcionales son relevantes y recurrentes en la formación y estructuración de la matriz de la concha en moluscos (Marin, 2020). Al igual que los dominios funcionales identificados en las secuencias codificantes de transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A durante la ontogenia de *C. gigas*, existe dominios funcionales que están presentes en un solo estadio de desarrollo (Figura 14), mientras otros están presentes en dos estadios de desarrollo (Figura 14). Interesantemente, no existen dominios funcionales que están presentes en los tres estadios de desarrollo analizados en esta tesis (Figura 14). Estos resultados igualmente apoyan la hipótesis de que las metilaciones m⁶A son bastante dinámicas durante la ontogenia de *C. gigas*, pero que también se ven considerablemente afectadas por factores ambientales como la disminución del pH del agua de mar.

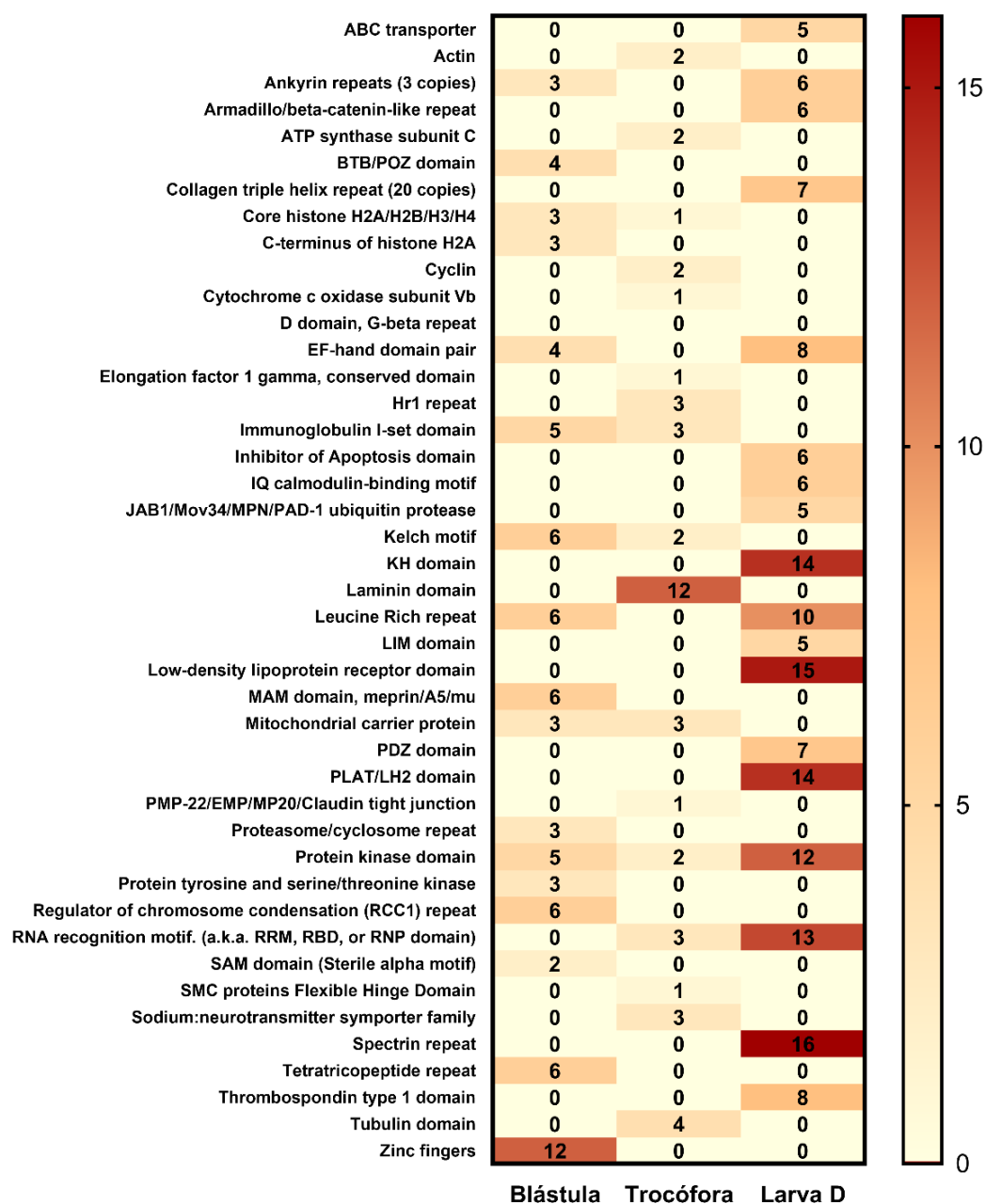


Figura 14. Dominios funcionales más abundantes presentes en las secuencias de aminoácidos codificados por transcritos/isoformas con niveles de metilación diferencial producto de mantener embriones y larvas de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, en condiciones de agua de mar acidificada. Mapa de calor indicando el número de dominios funcionales contenidos en cada transcrito/isoforma en embriones en estadio de desarrollo de blástula, así como larvas en los estadios de desarrollo de trocófora y larva-D. Para ver en específico los dominios funcionales presentes en los transcritos/isoformas metiladas diferencialmente de cada estadio de desarrollo, ver Figuras S4-S6.

Posteriormente para determinar la relación entre los dominios funcionales identificados y su posible participación en la formación de concha durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*C. gigas*) fue necesario asociar estos resultados con la información bibliográfica sobre los principales dominios funcionales presentes en las proteínas extraídas de estructuras mineralizadas en moluscos (Marin, 2020). De hecho, se ha demostrado que la fabricación de la concha, y otras estructuras mineralizadas en moluscos, requiere de una gran variedad de proteínas que participan como auxiliares durante el proceso de mineralización, así como pueden ser parte de la matriz orgánica de la concha (Marin, 2020). Dentro de las actividades auxiliares de estas proteínas se encuentran la deposición del carbonato de calcio, funciones enzimáticas, funciones inmunitarias, y procesos de señalización y pigmentación (Marin y Luquet, 2004, Marin, 2020).

En base a la información de dominios funcionales involucrados en el proceso de mineralización y presentes en las estructuras mineralizadas de moluscos (Marin, 2020), estos se filtraron de los dominios funcionales en todos los transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A que están vinculados al proceso de biomineralización en moluscos. En la Figura 15 se puede observar que se identificaron 88, 51, y 195 dominios funcionales asociados a la formación de concha en moluscos contenidos en los transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente. De la Figura 15, cabe resaltar la presencia de dos grupos predominantes con una mayor cantidad de dominios funcionales identificados y que participarían en el proceso de formación de concha larval. En el primer grupo, se encuentran aquellos dominios funcionales relacionados a procesos de señalización y estructuración de la matriz extracelular (Marin y Luquet, 2004, Marin, 2020), como el dominio Fibronectina tipo III, dominios de Laminina, los dominios de Factor de crecimiento epidérmico (EGF), el dominio de Factor de von Willebrand, el dominio tipo 1 de Trombospondina, repeticiones de Colágeno, repeticiones triples de hélice de colágeno, dominios Sushi, y el dominio de enlace a quitina Peritrofina-A (Figura 15). Estos dominios funcionales, en el contexto de la formación de concha, desempeñan un rol vital en la formación de la matriz de la concha (Marin, 2020). Mientras que, en el segundo grupo se encuentran dominios funcionales relacionados con la unión a iones y de actividad enzimática (Marin, 2020), como los dominios EF hand, los dominios de unión al calcio EGF, el dominio de la Glutatión peroxidasa, y el dominio de la enzima carbónica eucariota tipo 1 (Figura 15).

Estos dominios funcionales están predominantemente presentes en larvas en el estadio de desarrollo de larva-D donde podrían estar participando en la regulación de iones de calcio intracelular, el cual es un componente clave para la formación de los cristales de carbonato de calcio, influyendo en la disponibilidad y uso de componentes necesarios para biomineralizar (Arivalagan et al., 2017, Marin, 2020, Yarra et al., 2021, Hanif et al., 2023).

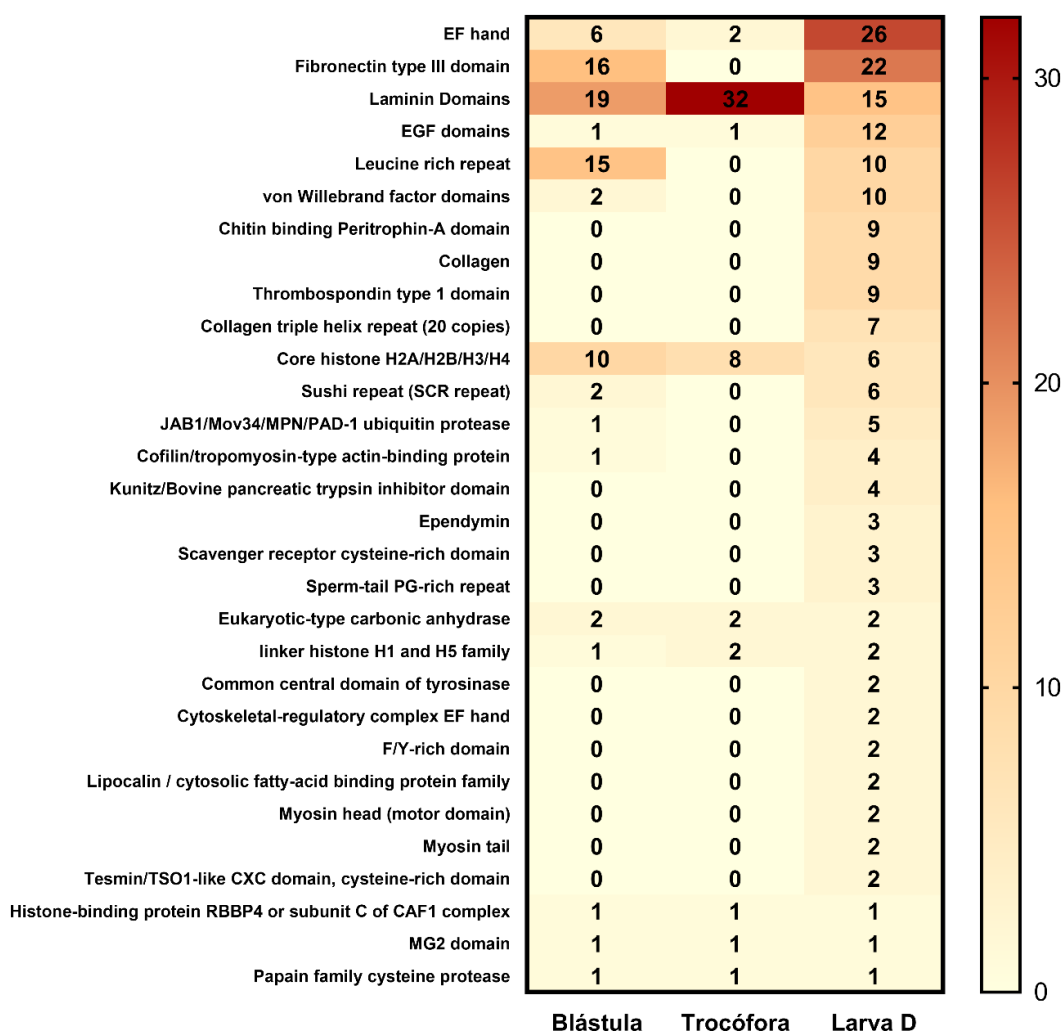


Figura 15. Presencia de dominios funcionales que han sido relacionados con el proceso de fabricación de estructuras mineralizadas en moluscos, según Marin, 2020, en las secuencias de aminoácidos codificada por los transcritos/isoformas metiladas durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*. Mapa de calor indicando el número de dominios funcionales contenidos en cada transcrito/isoforma en embriones en estadio de desarrollo de blástula, así como en larvas en estadio de desarrollo de trocófora y larva-D.

Posteriormente, realizamos la identificación de dominios funcionales asociados al proceso de biomineralización de la concha larval en los transcritos/isoformas que se encuentran diferencialmente metilados en cada estadio del desarrollo analizados en esta tesis, producto de mantener los embriones y larvas de *C. gigas* en condiciones de pH acidificado (Figura 16). Los dominios funcionales de los transcritos/isoformas diferencialmente metiladas abarcan diversas funciones biológicas vinculadas al proceso de formación de concha en moluscos (Marin., 2020). De estos, destacan los dominios EF-Hand, dominios relacionados a colágeno, dominios de laminina, dominios EGF y dominios ricos en leucina, los cuales corresponden a dominios recurrentes en la estructuración de la matriz de la concha y procesos enzimáticos asociados a la biomineralización (Marin, 2020). Interesantemente, se detectó un mayor número de dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas en larvas en el estadio de desarrollo de larva-D y estarían principalmente asociados a los dos grupos predominantes de dominios funcionales previamente mencionados, aquellos asociados a la estructuración de matriz de la concha y los dominios vinculados a la regulación de iones de calcio y actividad enzimática. Sin embargo, existe un mayor número de dominios asociados a la formación de la matriz de la concha en los transcritos/isoformas diferencialmente metiladas por efecto de la acidificación del agua de mar (Figura 16), lo cual sustentaría el hecho que cambios ambientales afectan los patrones de metilación m⁶A y que el estadio de larva-D, donde se encuentra la concha larval completamente formada, es el más afectado por cambios en el pH del agua de mar.

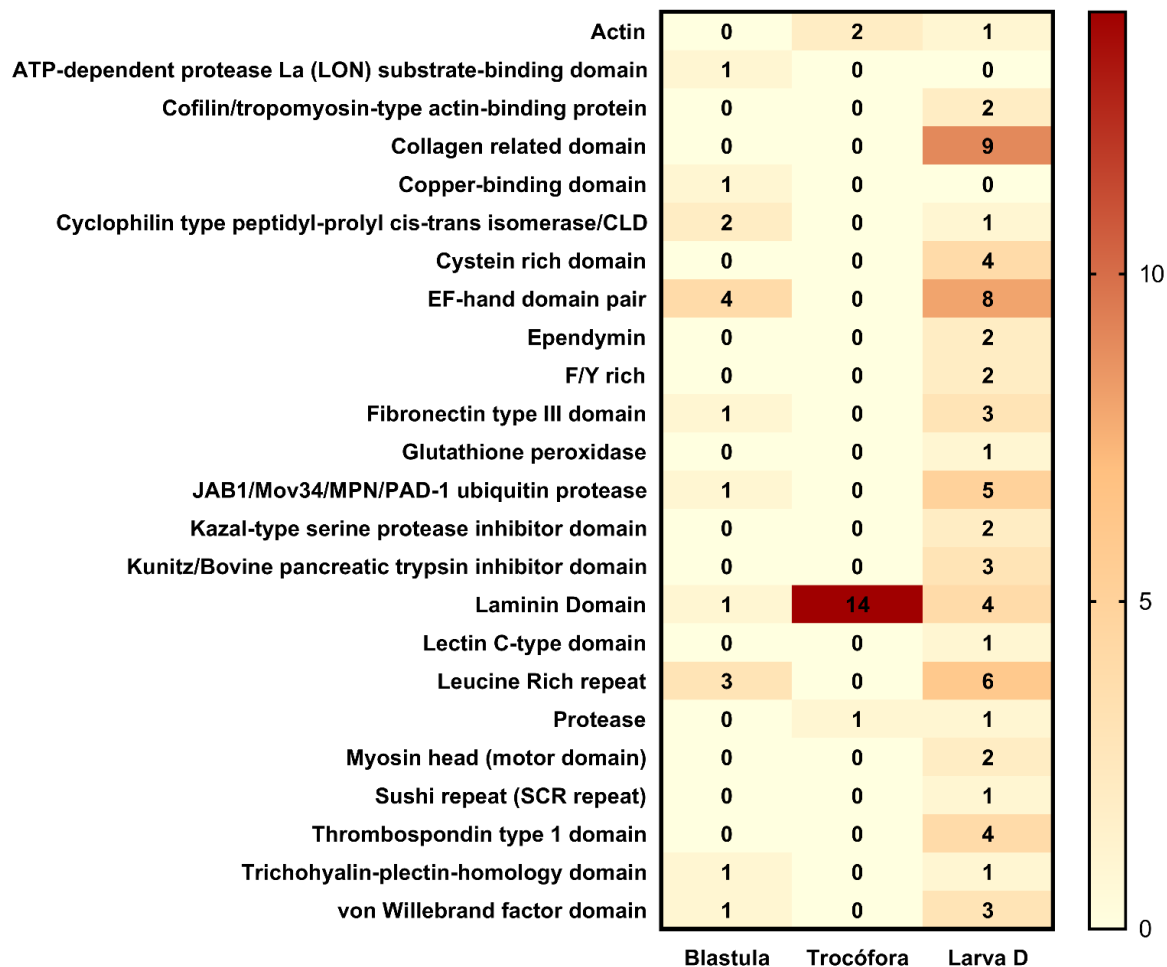


Figura 16. Presencia de dominios funcionales que han sido relacionados con el proceso de fabricación de estructuras mineralizadas en moluscos, según Marin, 2020, en las secuencias de aminoácidos codificada por los transcritos/isoformas diferencialmente metiladas por efecto de la acidificación del agua de mar. Mapa de calor indicando el número de dominios funcionales para cada estadio de desarrollo. Para más detalles de los dominios funcionales, asociados al proceso de fabricación de estructuras mineralizadas en moluscos, en cada estadio de desarrollo analizados en esta tesis, ver Figuras S7-S9.

Expresión diferencial de transcritos e isoformas durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en condiciones de acidificación del agua de mar

En paralelo, para evaluar el efecto en la expresión de transcritos e isoformas durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico de embriones/larvas en condiciones de pH normal y acidificado, se realizó un análisis de expresión diferencial empleando datos de secuenciación

de ARN-Seq de embriones en estadio de desarrollo de blástula y larvas en estadio de desarrollo de trocófora y larva-D que se desarrollaron en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1).

Las lecturas crudas de los datos de ARN-Seq de cada estadio de desarrollo (blástula, trocófora, y larva-D) en cada condición de pH (normal y acidificado) se filtraron eliminando adaptadores y lecturas de baja calidad para obtener lecturas de alta calidad que fueron utilizadas en los análisis posteriores. Luego del procesamiento de los datos de ARN-Seq, se obtuvo que más del 99.11% de los nucleótidos totales fueron conservados en todos los conjuntos de datos utilizados (Tabla 2).

Tabla 2. Procesamiento de las lecturas de ARN-Seq obtenidas mediante la tecnología Illumina para la identificación de transcritos e isoformas con expresión diferencial en embriones en estadio de desarrollo de blástula y larvas en estadios de desarrollo de trocófora y larva-D mantenidas en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1) del agua de mar. El experimento fue realizado mediante dos eventos de desoves y fertilizaciones independientes con el fin de obtener réplicas biológicas (REP1 y REP2).

Estadio de desarrollo y condición de pH	Número de lecturas crudas	Número de lecturas de baja calidad removidas	Número de lecturas de alta calidad	% de lecturas de alta calidad alineadas al genoma de referencia
Blástula pH normal REP1	65.39 M	1.16 M	64.23 M	98.22%
Blástula pH normal REP2	71.83 M	2.96 M	68.87 M	95.88%
Blástula pH acidificado REP1	69.41 M	3.74 M	65.67 M	94.61%
Blástula pH acidificado REP2	67.98 M	0.03 M	67.95 M	99.96%
Trocófora pH normal REP1	68.54 M	0.73 M	67.81 M	98.94%
Trocófora pH normal REP2	60.25 M	0.67 M	59.58 M	98.89%
Trocófora pH acidificado REP1	68.56 M	0.50 M	68.06 M	99.27%
Trocófora pH acidificado REP2	68.47 M	0.72 M	67.75 M	98.95%
Larva-D pH normal REP1	84.78 M	0.92 M	83.86 M	98.91%
Larva-D pH normal REP2	69.45 M	0.67 M	68.78 M	99.04%
Larva-D pH acidificado REP1	71.97 M	3.47 M	68.50 M	95.18%
Larva-D pH acidificado REP2	62.52 M	0.02 M	62.50 M	99.97%

Con las secuencias de alta calidad y el programa STAR, se realizó el alineamiento de las lecturas en contra del genoma de *C. gigas* (Peñaloza et al., 2021) para los embriones/larvas de cada estadio de desarrollo y condición de pH analizados en esta tesis, alineándose en total más del 94,61% de las lecturas (Tabla 2). Luego, se extrajeron de los archivos de alineamiento resultantes el número de lecturas que mapearon a cada transcrito e isoforma de *C. gigas* con el programa featureCounts (Liao et al., 2014). Finalmente, se usó el programa edgeR (Robinson et al., 2010) para identificar los transcritos/isoformas diferencialmente expresados entre los diferentes estadios de desarrollo y las condiciones de pH (Figura 17 y Figura S10). En la Figura 17, se observan el número de transcritos expresados diferencialmente por efecto del pH acidificado, los cuales correspondieron a 1180, 636, y 1407 en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente. Asimismo, se encontraron un total de 1202, 641, y 1436 isoformas de transcritos expresadas diferencialmente por efecto del pH acidificado en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente (Figura 17). De estos, mediante InteractiVenn (Haberle et al., 2015), se identificaron un total de 62 transcritos/isoformas que se encuentran expresados diferencialmente entre los tres estadios de desarrollo investigados en esta tesis (Figura 17).

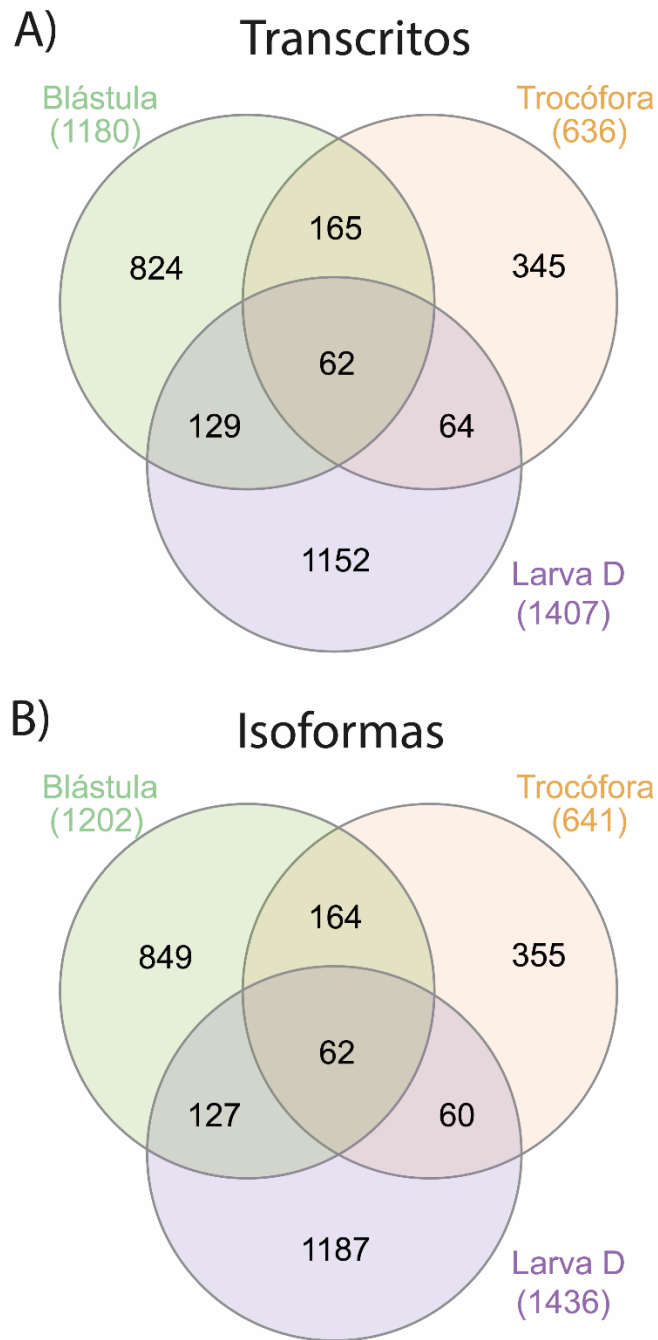


Figura 17. Transcritos e isoformas expresados diferencialmente en diferentes estadios de desarrollo de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, producto de la acidificación del agua de mar. En **(A)** se observa el número de transcritos expresados diferencialmente en los tres estadios de desarrollo, así como aquellos que están expresados diferencialmente en dos estadios de desarrollo y los transcritos que tienen una expresión diferencial específica para un estadio de desarrollo. En **(B)** se observa el número de isoformas expresadas diferencialmente en los tres estadios de desarrollo, así como aquellas que están expresados diferencialmente en dos estadios de desarrollo y las isoformas que tienen una expresión diferencial específica para un estadio de desarrollo.

Empleando el mismo diagrama de Venn construido mediante InteractiVenn (Haberle et al., 2015), realizamos un análisis enfocado en las diferentes etapas del desarrollo larval de *C. gigas*. El análisis de expresión diferencial nos muestra múltiples transcritos/isoformas estadio-específicos expresados diferencialmente debido a los efectos de la acidificación del agua de mar, con 824, 345, y 1152 transcritos expresados diferencialmente en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente (Figura 17). Mientras que, a nivel de isoformas de transcritos existen 849, 355, y 1187 expresadas diferencialmente en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente (Figura 17). Estos transcritos/isoformas estadio-específicos podrían sugerir mecanismos o vías metabólicas específicas que están siendo reguladas producto a la exposición a un entorno de agua de mar acidificada, por lo que un escrutinio más cercano de los procesos biológicos y funciones moleculares de estos transcritos/isoformas es necesario.

Consecuentemente, en respectivas transiciones de la ontogenia de *C. gigas* existen conjuntos de transcritos/isoformas compartidas entre los diferentes estadios de desarrollo. Por ejemplo, entre los estadios de desarrollo de blástula y trocófora, el cual corresponde a una transición larval mucho más extendida temporalmente desde el contexto de ontogenia, siendo blástula un estadio pre-gastrulación y la larva trocófora un estadio post-gastrulación, se comparten 165 transcritos y 164 isoformas (Figura 17). Posteriormente, entre los estadios de desarrollo de trocófora y larva-D, donde se caracteriza ya la presencia de formación de concha larval en la glándula de la concha (Wanninger & Wollesen, 2015), existen 64 transcritos y 60 isoformas de transcritos expresadas diferencialmente (Figura 17). Estos últimos, podrían ser isoformas-transcritos cruciales para el proceso de formación de la concha larval, y que su expresión se esté viendo alterada producto del desarrollo de larvas en condiciones de agua de mar acidificada (Figura 17).

Caracterización de los transcritos/isoformas expresados diferencialmente durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, producto de la acidificación del agua de mar

Para la caracterización de los transcritos e isoformas expresadas diferencialmente durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico en condiciones de acidificación de agua de mar,

se utilizó la misma anotación funcional y los términos de ontología de genes (términos GO) obtenidos mediante el programa EnTAP (Hart et al., 2020), y se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO con el paquete de R topGO (Alexa & Rahnenfuhrer 2022). Los términos GO enriquecidos fueron visualizados mediante la plataforma web de REVIGO (Supek et al., 2011). Cabe destacar que no se obtuvieron términos GO enriquecidos en los transcritos/isoformas expresadas diferencialmente en el estadio de desarrollo de blástula, mientras que en estadio de desarrollo de trocófora se encontraron términos GO enriquecidos en procesos biológicos relacionados a la mantención de mitocondrias, reparación de ácidos nucleicos, y reproducción (Figura 18). Esto sugiere que los transcritos e isoformas expresadas diferencialmente en el estadio de desarrollo de trocófora podrían estar asociados a procesos energéticos y de reparación de material genético producto de la condición de estrés a la cual se encuentran sometidas las larvas trocóforas debido a ser mantenidas en condiciones de acidificación del agua de mar.

Por otra parte, en estadio de desarrollo de larva-D se encuentran términos GO enriquecidos vinculados a procesos biológicos, incluyendo respuesta inmunitaria, regulación de peptidasas, regulación de moléculas de adhesión celular, proteólisis, integración de ADN, y síntesis de ADN desde ARN (Figura 18). Estos resultados, podrían indicar una mayor exposición y susceptibilidad de las larvas de *C. gigas* frente a agentes patógenos externos producto del mantenimiento en agua de mar acidificada, algo que coincide con lo reportado en diversos estudios (Wang et al., 2016, Fuhrmann et al., 2019, Dineshram et al., 2021). Además, se observan términos GO enriquecidos en funciones moleculares, tales como unión de diversas moléculas, iones metálicos, cationes, ácidos nucleicos, iones de calcio, y unión de carbohidratos (Figura 18). Junto a estos, también existen términos GO enriquecidos relacionados a la actividad y regulación de la actividad motora de los microtúbulos, así como de peptidasas y endopeptidasas (Figura 18). En conjunto, los términos GO enriquecidos mencionados indicarían una alteración en funciones que potencialmente podrían estar vinculados al proceso de formación de concha larval, como lo son la regulación de la actividad de peptidasas (Yarra et al., 2021) y unión a cationes, iones de calcio y unión a carbohidratos, los cuales corresponden a funciones fundamentales en el proceso de biomineralización de la concha en moluscos (Le Roy, et al., 2011, Vendrasco et al., 2011, Kocot et al., 2016, Marin, 2020, Yarra et al., 2021).

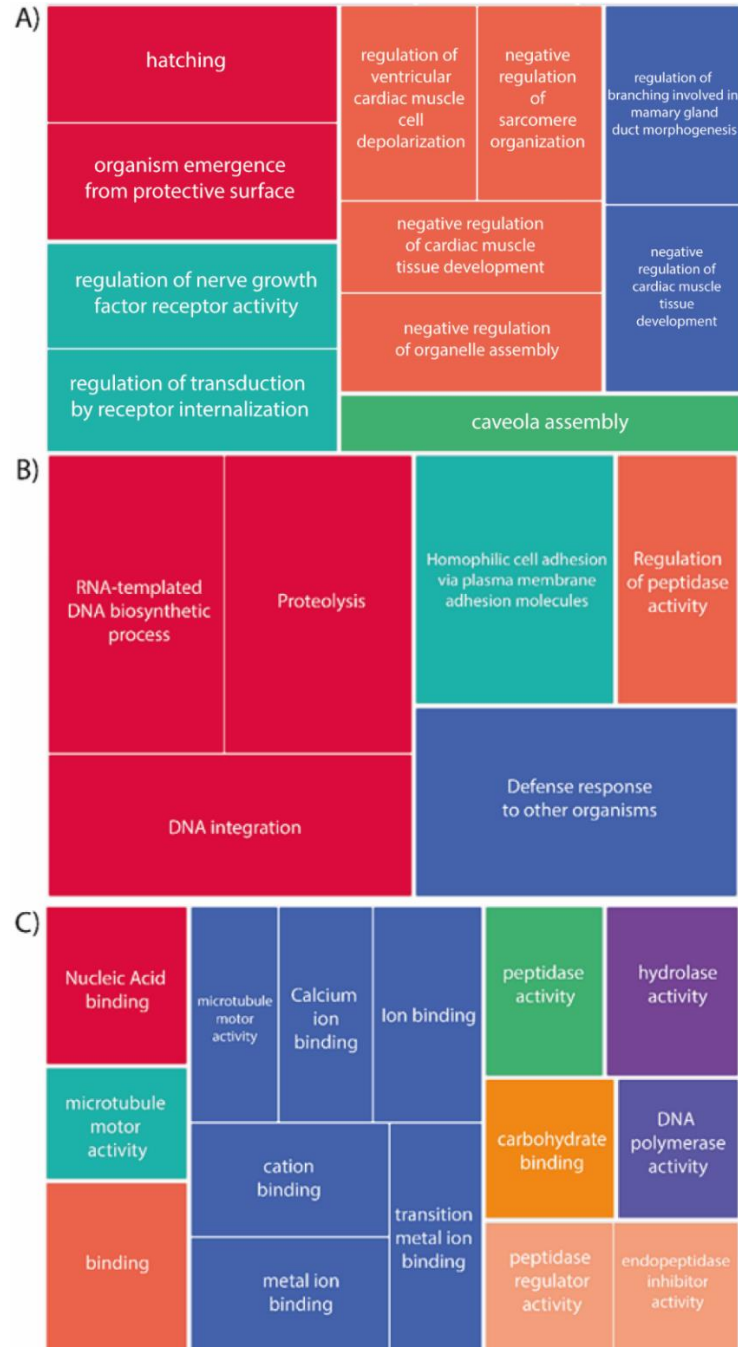


Figura 18. Términos GO asociados a procesos biológicos y funciones moleculares enriquecidos en los transcritos/isoformas expresados diferencialmente producto del mantenimiento de embriones y larvas de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en condiciones de acidificación del agua de mar. En (A) se muestran los términos GO enriquecidos, relacionados a procesos biológicos, en larvas en estadio de desarrollo de trocófora, mientras que en (B) se muestran los términos GO relacionados con procesos biológicos y en (C) con funciones moleculares en larvas en estadio de desarrollo de larva-D.

Al realizar un escrutinio más cercano de los transcritos/isoformas identificados como estadio-específicos y que se encuentran expresados diferencialmente producto del desarrollo en agua acidificada, se encuentra nuevamente una ausencia de términos GO enriquecidos asociados al estadio de blástula. Además, existe una ausencia de términos GO enriquecidos entre aquellos transcritos/isoformas compartidos por estadios de desarrollo, como lo son en blástula-larvas trocófora y larvas trocófora-larva-D. Sin embargo, en los transcritos estadio-específicos expresados diferencialmente en larvas trocóforas y larvas-D se encuentran múltiples términos GO enriquecidos asociados (Figura 19).

Los transcritos estadio-específico que se encuentran expresados diferencialmente en larva trocófora están relacionados con la regulación del desarrollo, crecimiento, y el potencial de acción de células musculares (Figura 19A), mientras que entre los transcritos/isoformas estadio-específicos expresados de larvas-D destacan términos GO enriquecidos asociados a procesos biológicos como de proteólisis, ensamblaje de miofibrillas, y respuesta inmune (Figura 19B). Estos resultados coinciden con lo reportado en otros trabajos sobre bivalvos (Venkataraman et al., 2020; Rajan et al., 2021; Venkataraman et al., 2022; Dang et al., 2022). Además, se observan términos GO enriquecidos de funciones moleculares asociadas a unión a diversos iones metálicos, en conjunto a la unión de iones de calcio y zinc (Figura 19B). Todos ellos son precursores iónicos claves no solo en la mantención de la homeostasis larval, sino que también en la regulación del proceso de biomineralización (Arivalagan et al., 2017, Marin, 2020, Wang et al., 2020, Yarra et al., 2021, Hanif et al., 2023). Sin embargo, la carencia de términos GO enriquecidos asociados a los transcritos/isoformas en el estadio de desarrollo de blástula no nos permite realizar un análisis sobre un posible efecto general de la acidificación en ese estadio de desarrollo.



Figura 19. Términos GO asociados a procesos biológicos y funciones moleculares enriquecidos en los transcritos/isoformas expresados diferencialmente en estadios de desarrollo específicos, producto del mantenimiento de embriones y larvas de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en condiciones de acidificación del agua de mar. En (A) se muestran los términos GO enriquecidos, relacionados a procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares en larvas en estadio de desarrollo de trocófora, mientras que en (B) se muestran los términos GO relacionados a procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares en larvas en estadio de desarrollo de larva-D.

Considerando la contrastante ausencia de términos GO enriquecidos en el estadio de desarrollo de blástula y en los transcritos/isoformas compartidos entre los estadios de desarrollos evaluados de esta tesis (blástula-trocófora y trocófora-larva-D) frente a la variedad de procesos biológicos y funciones moleculares destacados bajo el análisis de enriquecimiento de términos GO asociados a los transcritos/isoformas estadio-específicos en

larvas trocófora y larvas-D (Figura 18 y Figura 19), es imprescindible realizar una búsqueda de los dominios funcionales asociados al proceso de formación de concha, con el fin de profundizar la caracterización de los transcritos e isoformas expresadas diferencialmente durante el desarrollo de embriones y larvas de *C. gigas* en condiciones de acidificación del agua.

Por lo tanto, empleando la información de dominios funcionales involucrados en el proceso de biomineralización de la concha en moluscos reportados por Marin, 2020, se analizaron los dominios funcionales asociados a los transcritos expresados diferencialmente en los distintos estadios de desarrollo analizados en esta tesis. La Figura 20 muestra los principales dominios funcionales presentes en transcritos con expresión diferencial producto de la acidificación del agua de mar y que están asociados a la formación de concha de moluscos. En el estadio de desarrollo de blástula se observa un total de 90 dominios funcionales presentes en transcritos expresados diferencialmente, mientras que en el estadio de desarrollo de trocófora se observa un total de 32 dominios funcionales y en el estadio de larva-D un total de 201 dominios funcionales. Dentro de estos dominios funcionales, se encuentran predominantemente aquellos relacionados con el dominio WD, repeticiones G-beta, proteína quinasa, motivos de reconocimiento de ARN, repeticiones espectrina, dominio PLAT/LH2, y dominios KH (Figura 20). En una menor proporción, se encuentran transcritos que codifican en su secuencia aminoácido dominios laminina EGF y dominios de receptores de lipoproteínas de baja densidad clase A (Figura 20). Interesantemente, algunos dominios funcionales están presentes en transcritos expresados diferencialmente en todos los estadios de desarrollo analizados en esta tesis; mientras que otros, como por ejemplo dominio par EF-hand, repeticiones tetratricopéptidos, dedos de zinc, tipo C3HC4, repeticiones ankyrin, repeticiones ricas en leucina, dedos PHD, dominios MAM, dominios de unión a calmodulina, se encuentran en transcritos expresados diferencialmente en dos de los tres estadios de desarrollo analizados (Figura 20). Finalmente, también existen dominios funcionales que solo están presentes en transcritos con expresión diferencial en un estadio de desarrollo en particular, como por ejemplo repeticiones espectrina, dominio PLAT/LH2, dominio KH, dominios de receptores de lipoproteínas de baja densidad clase A, y dominios de receptores de lipoproteínas de baja densidad clase B en el estadio de desarrollo de larva-D y los dominios

laminina EGF en el estadio de desarrollo de trocófora y el dominio repetición de regulador de condensación cromosómica (RCC1) en el estadio de blástula, respectivamente (Figura 20).

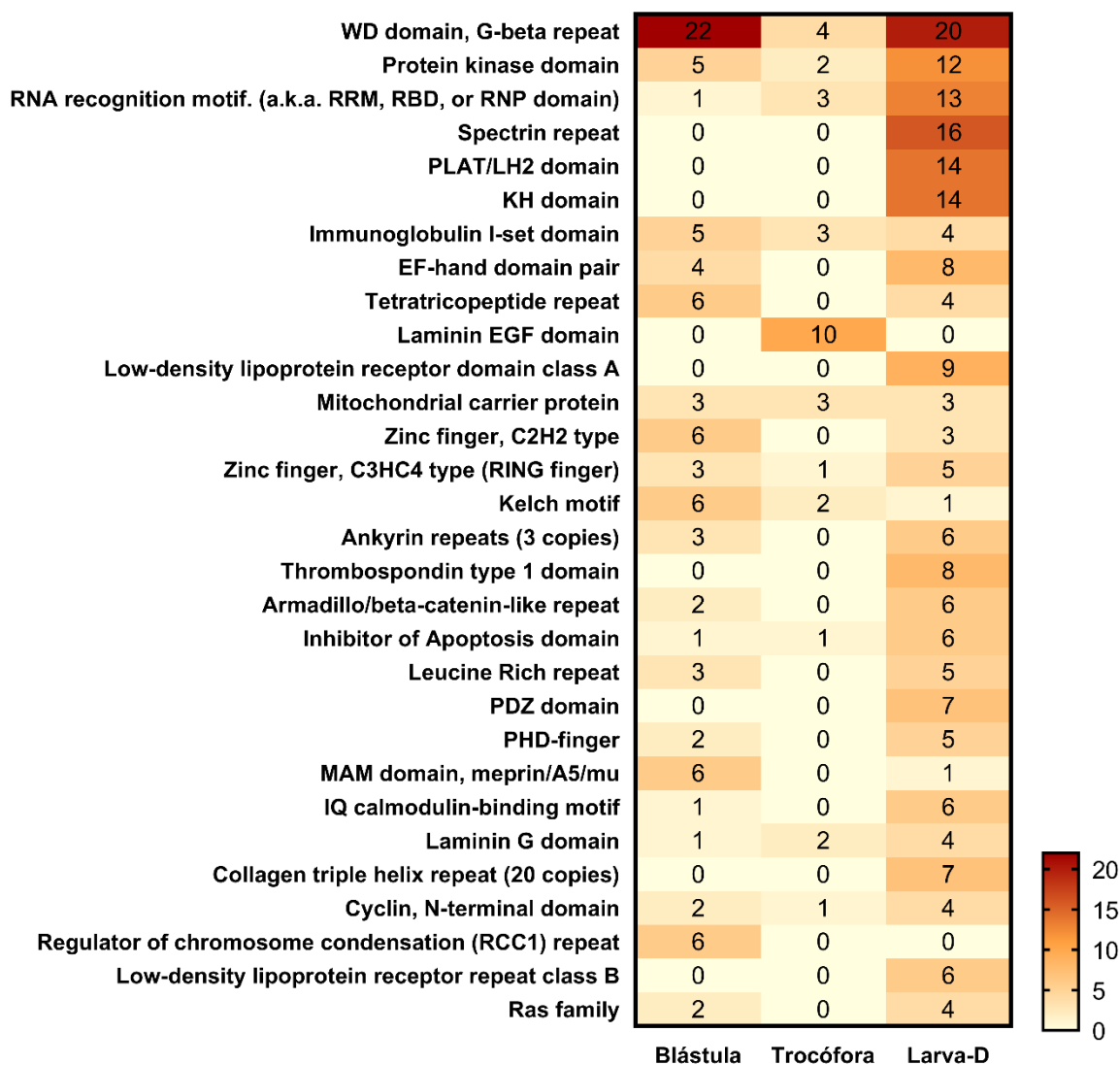


Figura 20. Presencia de dominios funcionales en transcritos expresados diferencialmente producto de la acidificación del agua de mar en la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Mapa de calor indicando el número de dominios funcionales presentes en transcritos con expresión diferencial para cada estadio de desarrollo. Para más detalles de los dominios funcionales asociados a cada estadio de desarrollo analizados en esta tesis, ver Figuras S11-S13.

A su vez, realizamos el mismo análisis antes mencionado, pero enfocándose en las isoformas de transcritos que se encuentran expresadas diferencialmente debido al efecto de la acidificación del agua de mar y que presentan dominios funcionales vinculados al proceso de biomineralización en moluscos (Marin, 2020). De estos análisis, se obtuvieron un total de 12, 14, y 64 dominios funcionales presentes en las isoformas con expresión diferencial y que se han asociado a la formación de concha en moluscos, correspondientes a los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D, respectivamente (Figura 21). Mientras que en el estadio de desarrollo de blástula existen pocos dominios funcionales presentes en las isoformas expresadas diferencialmente (Figura 21), esto se puede explicar porque en dicho estadio de desarrollo aún no se inicia el proceso de biomineralización. Por otro lado, en el estadio de desarrollo de trocófora se detectaron 13 dominios de laminina contenidos en las isoformas de transcritos expresados diferencialmente (Figura 21). Este dominio funcional ha sido descrito como parte del “kit molecular” de biomineralización necesario para construir la concha en moluscos (Marin 2020) y también se ha reportado con expresión diferencial producto de la acidificación del agua de mar en otros estudios (Rajan et al., 2021). Interesantemente, en estadio de desarrollo larva-D existe una gran variedad de dominios funcionales asociados a biomineralización de la concha en las isoformas expresadas diferencialmente (Figura 21). Dentro de estos dominios funcionales, se encuentran aquellos relacionados con la unión a iones y de actividad enzimática, como los dominios EF hand, los dominios de unión al calcio EGF, el dominio de la Glutación peroxidasa (Marin, 2020) (Figura 21). Mientras que otros dominios funcionales presentes en las isoformas proteicas expresadas diferencialmente en el estadio de desarrollo de larva-D corresponden a dominios de repeticiones de colágeno, repeticiones ricas en leucina, y dominios von Willebrand, los cuales estarían asociados a la estructuración de la matriz de la concha (Marin, 2020) (Figura 21). Estos resultados indican que existen isoformas expresadas diferencialmente en el estadio de desarrollo de larva-D que podrían ver alterado su destino como isoforma, tales como la regulación de la unión a iones de calcio y la síntesis de componentes proteicos asociados a la formación de la matriz de la concha larval, producto del mantenimiento de larvas de *C. gigas* en condiciones de acidificación del agua de mar.

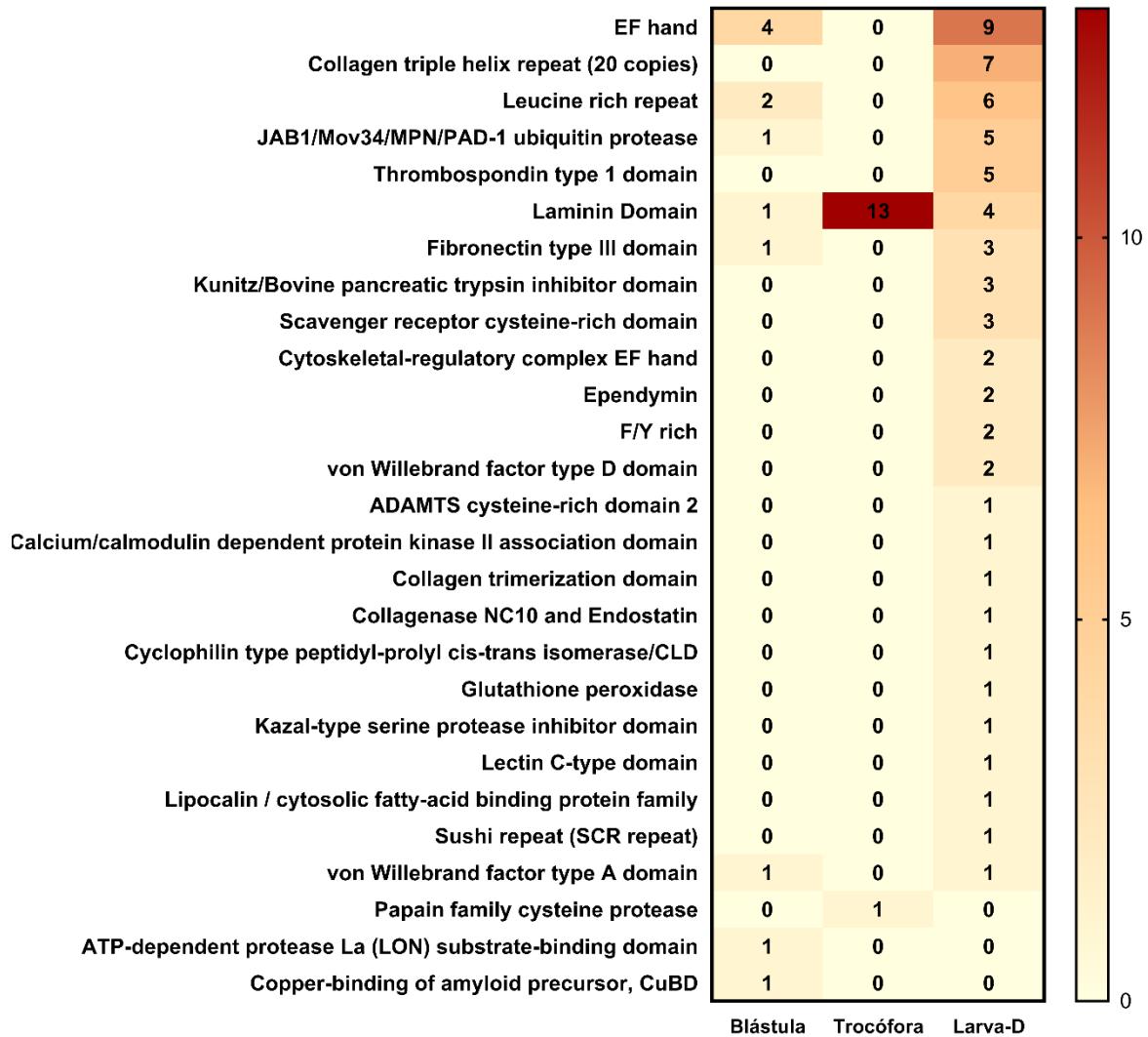


Figura 21. Presencia de dominios funcionales asociados a la formación de concha asociados a formación de concha en isoformas expresadas diferencialmente producto de la acidificación del agua de mar en la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Mapa de calor indicando el número de dominios funcionales asociados a formación de concha presentes en transcritos con expresión diferencial para cada estadio de desarrollo. Para más detalles de los dominios funcionales asociados al proceso de fabricación de estructuras mineralizadas en moluscos en cada estadio de desarrollo analizados en esta tesis, ver Figuras S14-S16.

Alteraciones en el panorama de expresión y patrones de metilación m⁶A producto del mantenimiento de embriones y larvas de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en condiciones de acidificación del agua de mar

Considerando los transcritos/isoformas que se encuentran expresadas diferencialmente, se procedió a compararlos/as con aquellos/as que presentan modificaciones químicas del tipo m⁶A y/o que presentan niveles diferenciales de metilación m⁶A producto del mantenimiento de embriones y larvas en condiciones de acidificación del agua de mar. En la Figura 22 se puede observar que en el estadio de desarrollo de blástula, las isoformas expresadas diferencialmente y con niveles de metilación m⁶A diferencial corresponden a G553.3 (Protein DK), G7240.1 (ARNnc), G24506.8 (Tubulin), G25112.1 (Sin similitud de secuencia), y G26146.4 (Histone H3); mientras que las isoformas de transcritos G21656.2 (Leucine rich-repeat), G5663.1 (Filopodia protein), y G18218.1 (ARNnc) tienen niveles de expresión y metilación m⁶A diferencial producto del desarrollo en agua de mar acidificada (Figura 22).

Por otro lado, en larvas en estadio de desarrollo de trocófora solo se identificó una isoforma expresada diferencialmente y con metilación m⁶A, la que corresponde a la isoforma G34817.29 (small GTP-binding protein), y también solo una isoforma, G20822.6 (ARNnc), se encuentra expresada y metilada diferencialmente producto de la acidificación del agua de mar (Figura 22). En el caso de las larvas en estadio de desarrollo de larva-D, se encuentran en total 15 isoformas expresadas diferencialmente y que poseen por lo menos una metilación m⁶A. Estas isoformas de transcritos corresponden a: G123.9 (ATPase), G423.1 (Sin similitud de secuencias en base de datos), G3249.1 (Forkhead box protein), G14159.2 (Protein-tyrosine phosphatase), G16250.1 (Cytochrome P450), G7758.1 (Acanthoscurrin-2-like), G12321.1 (Glycine-rich RNA-binding protein), G13303.1 (ATP dependant RNA helicase A), G26146.4 (Histone H3), G26746.4 (FAS1), G5528.2 (Anaphase-promoting protein), G6280.1 (RIG-I-like receptor), G6881.1 (rRNA methyltransferase fibrillarin-like), G19035.18 (inhibitor of apoptosis), y G19732.1 (ubiquitin). Además, se identificaron 10 isoformas de transcritos expresadas diferencialmente y que poseen una tasa de metilación m⁶A diferencial producto del mantenimiento de larvas en agua de mar acidificada. Esta isoformas corresponden a: G2451.27 (Calreticulin), G15670.1 (SGNH hydrolase), G22209.6

(Protein-tyrosine phosphatase-like protein), G25177.13 (Fatty acid desaturase), G6435.1 (Actin), G7026.6 (ARNnc), G17941.1 (baculoviral IAP repeat-containing protein 7-B), G19039.2 (Kelch-type beta propeller), G19758.4 (uncharacterized protein), y G34043.1 (ARNnc).

En base a los resultados de la Figura 22, se puede observar que la isoforma G26146.4, que codifica a una histona H3, se encuentra expresada diferencialmente y con metilaciones m⁶A en los estadios de desarrollo de blástula y larva-D. Además, se destaca la presencia de isoformas de transcritos correspondientes a ARNnc con niveles de expresión y metilación m⁶A diferencial producto del mantenimiento de embriones y larvas en condiciones agua de mar acidificada, existiendo una isoforma en el estadio de desarrollo de trocófora (G18218.1) y dos isoformas de transcritos en el estadio de desarrollo de larva-D (G7026.6 y G34043.1). Sin embargo, actualmente no se tienen registros de los genes objetivos de estos ARNnc.

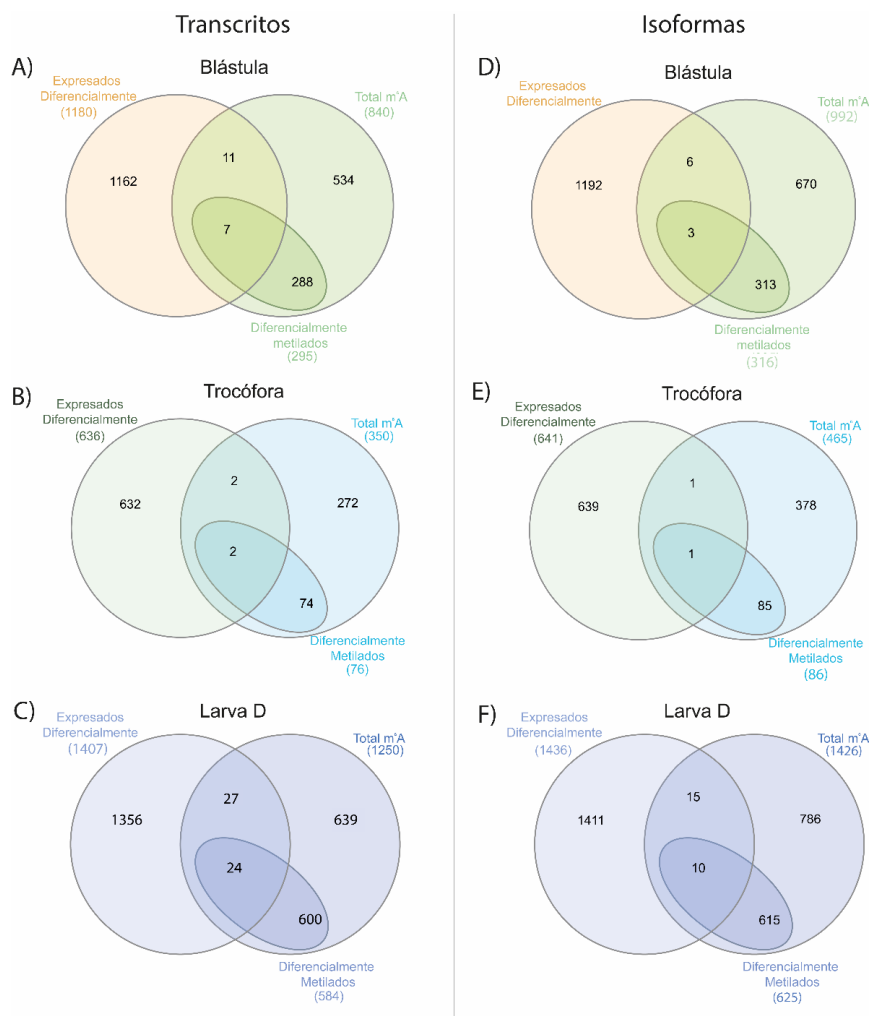


Figura 22. Relación de los estados de metilación m⁶A y expresión diferencial de los transcritos e isoformas en los diferentes estadios de desarrollo de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) analizados en esta tesis, producto del mantenimiento de embriones y larvas en condiciones agua de mar acidificada. En **A)**, **B)**, y **C)** se compara el estado de los transcritos con metilaciones m⁶A detectadas con los transcritos con niveles de metilación y/o expresión diferencial producto del desarrollo en agua de mar acidificada. Similarmente en **D)**, **E)** y **F)**, se compara el estado de las isoformas de transcritos con metilaciones m⁶A detectadas con las isoformas con niveles de metilación y/o expresión diferencial producto del desarrollo en agua de mar acidifica

Nuestros resultados indican que un número relativamente bajo de transcritos e isoformas se expresan diferencialmente y tienen modificaciones químicas del tipo m⁶A, así como niveles diferenciales de metilación m⁶A en los diferentes estadios de desarrollo analizados. Interesantemente, los transcritos expresados diferencialmente y los niveles de m⁶A difieren en el número de isoformas producidas para los mismos transcritos, lo que

resulta en cantidades desiguales de transcritos e isoformas compartidas (Figura 22). Además, el uso de isoformas por transcrito/gen varía según el estadio de desarrollo. Por ello, se filtraron los transcritos/genes que poseen múltiples isoformas de transcritos y que cumplen con las siguientes condiciones: i) poseer dominios funcionales asociados a la formación de la concha en moluscos, y ii) las isoformas deben presentar expresión diferencial de isoformas, metilaciones m⁶A y/o niveles diferenciales de m⁶A.

Para este filtrado, se revisaron y compararon los resultados obtenidos previamente respecto a los niveles de expresión de transcritos, la tasa de metilación, y el porcentaje de uso de isoformas de transcritos. Como resultado de este análisis, se identificaron 11 transcritos que poseen dominios funcionales asociados a la biomineralización en moluscos. Estos, además, cuentan con diferentes isoformas de transcritos que se encuentran metiladas y/o diferencialmente metiladas y/o expresadas de manera diferencial durante la ontogenia de *Crassostrea gigas*.

En la Figura 23 se observan transcritos, y su correspondiente uso de isoformas, que codifican para proteínas con dominios funcionales asociados al proceso de formación de la concha en moluscos (Marin, 2020) y su estado de expresión y metilación en cada estadio del desarrollo evaluado en esta tesis (Tabla S5). Por ejemplo, el transcrito G339 tiene las isoformas G339.4, G339.2, y G339.1. De estas, la isoforma G339.4 muestra metilación m⁶A en los estadios de desarrollo de blástula y trocófora, mientras que, la isoforma G339.2, muestra metilación m⁶A en el estadio de desarrollo de larva-D, y la isoforma G339.1, muestra metilación m⁶A en el estadio de desarrollo de trocófora. No obstante, todas estas isoformas contienen el dominio funcional asociado a uniones de calcio EF-hand y Linker de histonas H1-H5. Este resultado sugiere que las diferentes isoformas de transcritos de un mismo transcrito pueden tener diferentes patrones de metilación m⁶A asociado puntualmente a un uso de isoformas proteicas particular (Figura 23). Otros transcritos como G3290, G2857, G10885, G28384, G25087, G24022, G23989, G23988, G23042, y G22502 también tienen múltiples isoformas con variaciones en la metilación m⁶A y diferentes dominios funcionales asociados al proceso de formación de concha. De estos, los transcritos G25087, G24022, G10885, y G22502 presentan una disminución en el uso de algunas de sus isoformas frente

a condiciones de mantenimiento de embriones y larvas en condiciones de acidificación del agua de mar (Figura 22).

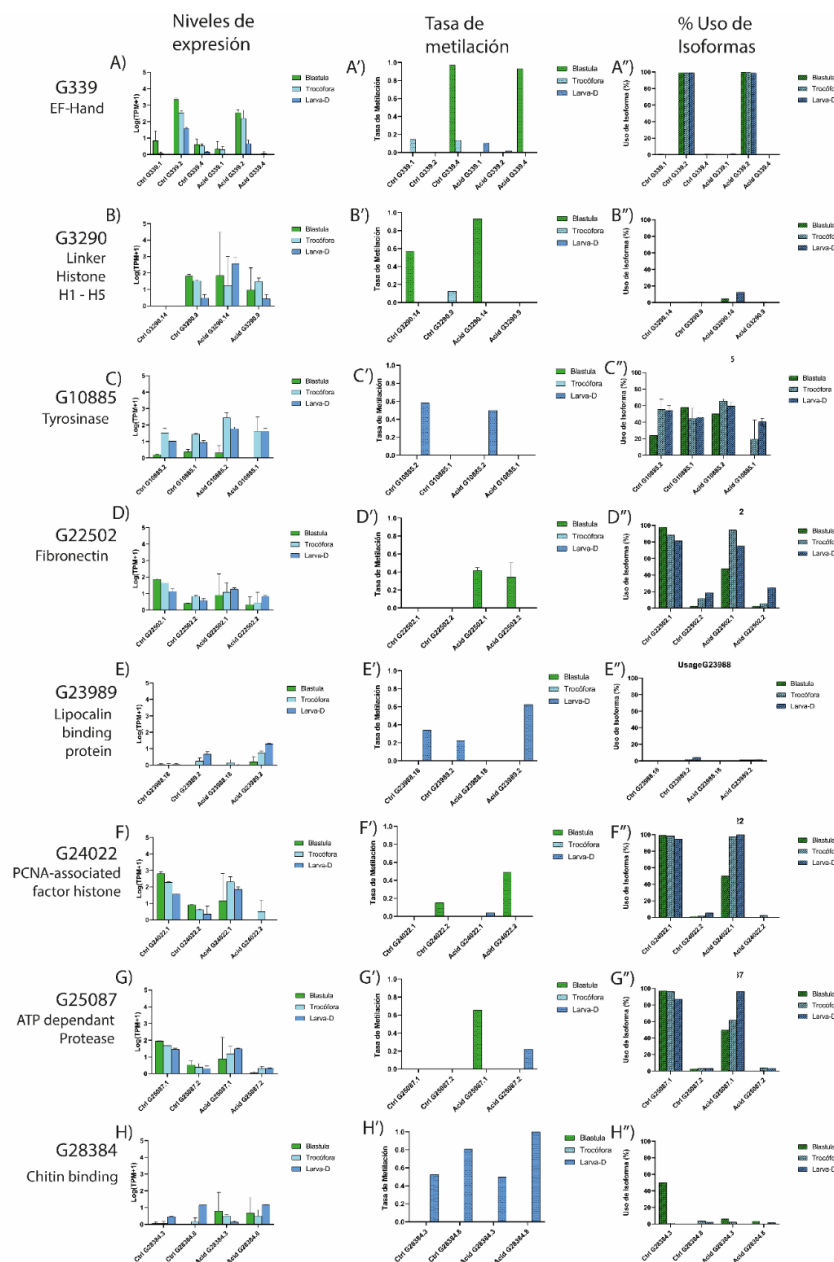


Figura 23. Niveles de expresión de transcritos/isoformas en embriones y larvas de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) mantenidas en condiciones de acidificación del agua de mar. En los paneles se muestran transcritos (G339, G3290, G2857, G28384, G25087, G24022, G23989, G23988, G23042, G22502, y G10885) con patrones de metilación m⁶A, expresión diferencial, y uso de isoformas de transcritos vinculados al proceso de formación de concha en moluscos. En la primera columna se muestran los niveles de expresión en TPM

normalizados mediante $\log_{10}(\text{TPM}+1)$. En la segunda columna se muestra la tasa de metilaciones m⁶A en regiones DRACHs presentes en los transcritos. En la tercera columna se muestra el porcentaje de uso de las isoformas correspondientes a cada transcrito.

Para comprender y visualizar los efectos del mantenimiento de embriones y larvas en condiciones de acidificación del agua de mar en el transcriptoma y metiloma (m⁶A) de *C. gigas*, y posibles alteraciones del proceso de formación de concha larval, recopilamos y co-visualizamos los patrones de expresión y metilación m⁶A de un total de 138 isoformas de transcritos identificadas a lo largo de esta tesis. Estas isoformas presentan dominios funcionales vinculados al proceso de formación de concha larval y denotan las diferencias en los niveles de expresión de las isoformas durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*C. gigas*), producto del mantenimiento de embriones y larvas en condiciones de acidificación del agua de mar (Figura 24). Interesantemente, existe una mayor variación de los niveles de metilación m⁶A en las isoformas expresadas diferencialmente en el estadio de desarrollo de larva-D, potencialmente debido a la respuesta de los embriones y larvas a desarrollarse en agua de mar acidificada, algo que coincide con otros estudios ambientales realizados (Zhou et al., 2022, Rudy et al., 2023, Hou et al., 2023, Lei et al., 2023).

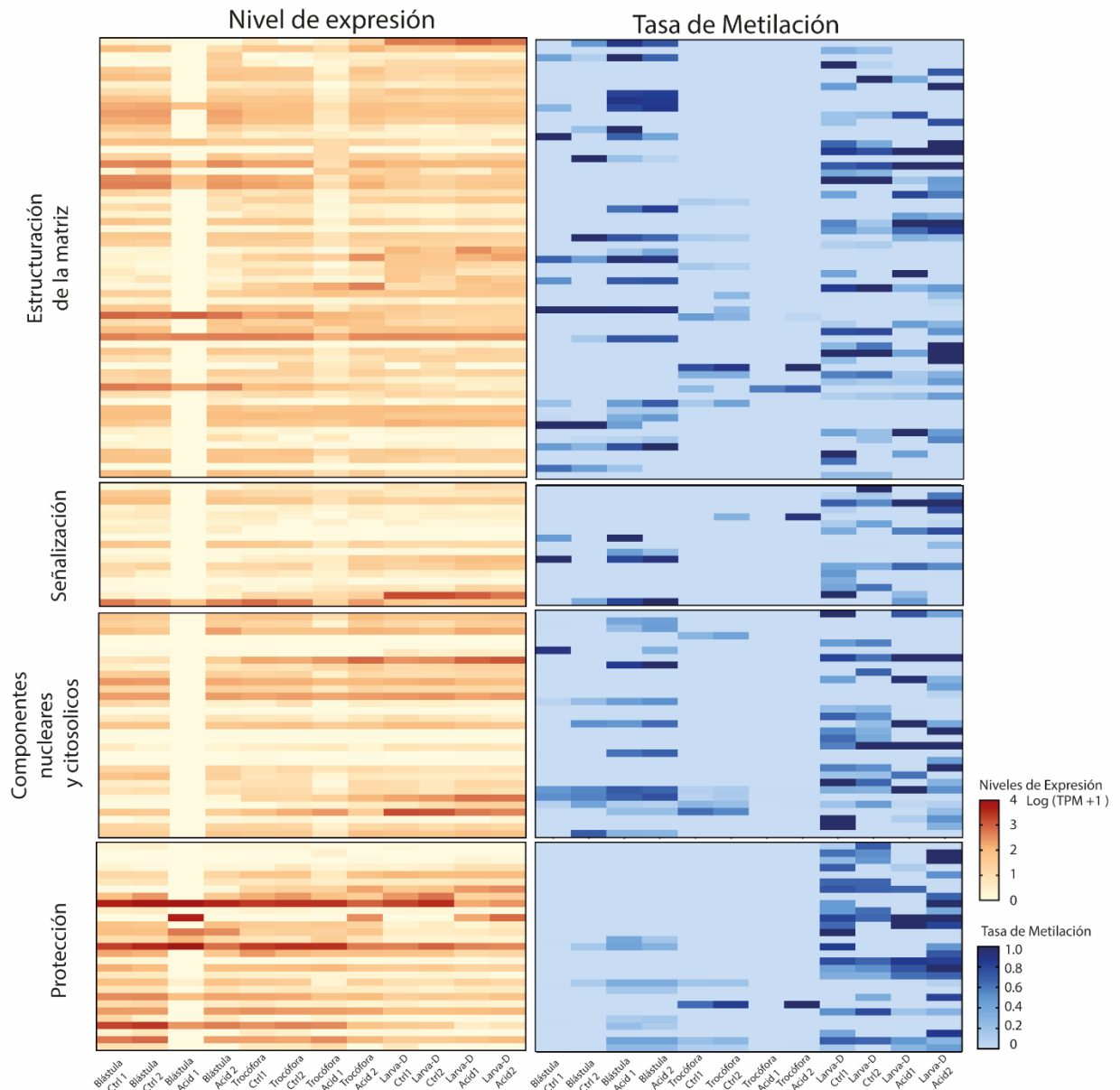


Figura 24. Perfiles expresión y metilación m⁶A de isoformas vinculadas al proceso de formación de concha durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) producto del desarrollo de embriones y larvas en agua de mar acidificada. A la izquierda de la figura se muestran las isoformas metiladas y/o diferencialmente expresadas con dominios funcionales vinculados al proceso de fabricación de la concha en moluscos (n=138). Los niveles de expresión de los transcritos se encuentran en TPM normalizados mediante $\log_{10}(\text{TPM}+1)$.

DISCUSIÓN

La acidificación de los océanos genera efectos nocivos para diversas especies marinas (Gattuso et al., 2015), viéndose afectada negativamente la sobrevivencia, crecimiento, y descendencia de estas especies producto del impacto energético que produce la disminución del pH en la mantención de procesos biológicos y celulares (Gazeau et al., 2013; Kroeker et al., 2014; Gattuso et al., 2015; Sulpis et al., 2018; Tan and Zheng, 2020; Auzoux-Bordenave et al. 2020; Figuerola et al., 2021). Sumado a un conocimiento muy limitado de los mecanismos moleculares y repertorios proteicos que podrían estar participando en la formación de la concha embrionaria y larval (Jackson et al., 2007; Zhao et al., 2018; Batzel et al., 2022), existe la necesidad de comprender los mecanismos y redes regulatorias de procesos vitales, como la formación de concha, en los estadios larvales de moluscos como la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*.

El abrupto auge en estudios epitranscriptómicos ha proporcionado una visión más amplia sobre el rol regulatorio de estas modificaciones químicas del ADN y ARN en respuesta a estresores ambientales. (Hu & Manduzio, 2019; Huber et al., 2019; Shoaib & Usman, 2022; Zhou et al., 2022). Lamentablemente, estos han sido realizados principalmente en especies de vertebrados y plantas (Vandivier & Gregory, 2018; Kumar & Mohapatra, 2021; Tang et al., 2021; Ma et al., 2022; Ramakrishnan et al., 2022; Wagner & Schosserer, 2022; Xin et al., 2022; Shen et al., 2023), existiendo escasa información en especies de invertebrados. En moluscos, actualmente existen dos estudios que se han enfocado en la transición materno-cigoto y la relevancia de la modificación química m⁶A (Le Franc et al., 2021) y el estadio de mórula (Le Franc et al., 2022).

Preferencia en la metilación de motivos DRACHs durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y modificaciones debido a la acidificación del agua de mar

En esta tesis se llevó a cabo un análisis comparativo sobre el uso de motivos DRACHs en los patrones de metilación m⁶A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*C. gigas*) en condiciones de pH normal y pH acidificado del agua de mar. Para ello, se determinaron los patrones DRACHs fuertemente y débilmente metilados basados en el número de regiones metiladas por estadio de desarrollo; es decir, blástula, trocófora, y larva-D. En dichos estadios de desarrollo, se detectaron distintos niveles de metilación para cada patrón dentro del motivo

DRACH, con ciertos patrones siendo consistentemente más metilados que otros en las diferentes réplicas biológicas por cada estadio de desarrollo. Por ejemplo, los patrones AAACU, GGACA, AAACA, GAACA, y AGACA se identificaron como motivos DRACHs “fuertemente” metilados en todos los estadios de desarrollo evaluados, comprendiendo una proporción significativa de las regiones metiladas detectadas en los transcritos e isoformas que se expresan en dichos estadios de desarrollo. Estos resultados tienen semejanzas con otros motivos DRACHs “fuertes” en estudios realizados en mamíferos (Rücklé et al., 2023). Estos patrones también mantuvieron altos niveles de metilación diferencial entre estadios de desarrollo con pH normal y pH acidificado del agua de mar, lo que sugiere que estos motivos DRACH serían preferidos para la aparición de modificaciones del tipo N⁶-metiladenosina en transcritos e isoformas durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico. Estos resultados también sugieren que la metilación m⁶A puede verse afectada por factores ambientales, como la acidificación del agua de mar.

Por otro lado, las regiones DRACHs “débilmente” metiladas representan un motivo poco frecuente para el marcaje químico de las metilaciones m⁶A (Rücklé et al., 2023). En nuestros resultados, en el estadio de desarrollo de blástula se presentaron los patrones AGACC, GAACC, UGACA, UAACC, y UGACC como “débilmente” metilados, representando solo el 13,84% del total de regiones metiladas en dicho estadio de desarrollo; mientras que en el estadio de desarrollo de trocófora, los patrones UGACA, UAACU, UAACC, UGACC, y UGACU fueron identificados como “débilmente” metilados, constituyendo solo el 10,47% de las regiones metiladas. En el mismo contexto, en el estadio de desarrollo de larva-D, los patrones GGACU, UGACU, AGACC, UAACC, y UGACC se clasificaron como “débilmente” metilados, representando el 13,69% de las regiones metiladas. Estos patrones débilmente metilados mostraron cierta variabilidad entre los estadios de desarrollo, aunque los patrones UAACC y UGACC se mantuvieron consistentemente como “débilmente” metilados en todos los estadios de desarrollo analizados en esta tesis.

A diferencia de los motivos DRACHs “fuertemente” metilados, los patrones débilmente metilados mostraron diferencias en los niveles de metilación entre los embriones/larvas mantenidas en pH normal y pH acidificado, aunque UAACC y UGACC se

mantuvieron débilmente metilados en ambas condiciones. Aunque existe una preferencia general por los motivos DRACHs “fuertemente” metilados, tales como AAACU, GGACA, AAACA, GAACA, y AGACA, se observaron diversos motivos DRACHs con niveles de metilación menos frecuentes y variabilidad entre condiciones de pH y estadios de desarrollo. Lo anterior se describe en la Figura 9 donde se muestra el número de motivos DRACHs metilados en embriones/larvas mantenidas bajo condiciones de pH normal y pH acidificado, destacando la preferencia por los motivos DRACH “fuertemente” metilados y la escasez de metilaciones en los motivos DRACH “débilmente” metilados, tales como UAACC y UGACC. Nuestros resultados sugieren que, aunque hay preferencias por ciertos motivos DRACHs, los patrones de metilación m⁶A son diversos y dinámicos durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico y en respuesta a cambios ambientales, como la acidificación del agua de mar.

Caracterización del metiloma m⁶A durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y su rol en la formación de la concha larval

La metilación m⁶A participa en la regulación de la expresión génica en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, pero también desempeña roles importantes la regulación de procesos del desarrollo, reproducción, y destino celular (Arcidiacono et al., 2020; Dieterich et al., 2021; Konno et al., 2021). En nuestros resultados, se ha observado que procesos similares se encuentran enriquecidos en los transcritos e isoformas con metilaciones presentes en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D. Estos resultados están en concordancia con otros estudios epitranscriptómicos en *C. gigas* donde la maquinaria proteica asociada a la modificación química m⁶A es crucial en procesos de empalme alternativo (alternative splicing), traducción, diferenciación celular, clivaje, y la transición materno-cigótica (Le Franc et al., 2021, Le Franc et al., 2023).

Al respecto de las isoformas de transcritos con metilaciones m⁶A, se detectaron una gran variedad de dominios funcionales, los cuales están asociados a diversas funciones involucradas en el proceso de formación de la concha en moluscos. El dominio funcional WD (tryptophan-aspartic acid) está mayormente representado en las isoformas de proteínas cuyos transcritos poseen metilaciones m⁶A en los estadios de desarrollo de blástula,

trocófora, y larva-D. Los dominios WD corresponden a dominios presentes en proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, transducción de señales, y la organización del citoesqueleto (Jain & Pandey., 2018). La función de los dominios WD ocurre mediante interacciones proteína-proteína o proteína-ligando, al igual que los dominios de repeticiones de Tetratricopéptido, repeticiones de Ankyrin, repeticiones similares a Armadillo/beta-catenin, PDZ, KH, y asociados a la familia Ras (Huber et al., 1997; Michaely et al., 2002; Zeytuni & Zarivach, 2012). Del mismo modo, también se detectaron isoformas de transcritos que codifican en su secuencia de aminoácidos para proteínas con dominios G-beta repeat, los cuales podrían estar involucrados en la transducción de señales a través de la membrana celular y unión a ligandos pequeños, al igual que los dominios IQ de motivos de unión a calmodulina, motivos Kelch, y repeticiones de espectrina (Marin, 2020). Otros dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas con metilación m⁶A corresponden a dominios de unión a ácidos nucleicos, dedos de Zinc, tipo C2H2 y C3HC4, repeticiones ricas en leucinas, y motivos de reconocimiento de ARN. Similarmente, se detectaron un considerable número de dominios funcionales que están relacionados con actividad enzimática, tales como dominios proteína quinasa, receptores de tirosina quinasa tipo A/B, subunidades C de ATP sintasa, familia ubiquitina, dominios GTPasa de la familia tubulina/FtsZ, dominios de unión a homólogos de calponina, y dominios receptores de lipoproteínas de baja densidad clase A.

En moluscos, las proteínas que conforman la concha son bastante variables entre especies y poseen diferentes dominios funcionales asociados a distintas funciones que cumple la concha (Marin, 2020). Por ejemplo, las proteínas de matriz, que corresponden al componente principal de la concha, son las responsables de la organización de los cristales de carbonato de calcio formando una matriz que mantiene los cristales en su lugar otorgando rigidez a la concha (Le Roy et al., 2014; Herlitze et al., 2014; Marin, 2020). En este contexto, los dominios funcionales identificados en el metiloma m⁶A identificado en embriones/larvas en el estadio de desarrollo de blástula, trocófora, y larva D desempeñan diversas funciones que podrían estar relacionadas con el proceso de formación de concha en moluscos. Entre ellos, existen dominios funcionales implicados en el reconocimiento y unión de iones y moléculas de calcio, como el dominio EF hand y el dominio de anhidrasa carbónica (Marin, 2020). Además, los dominios asociados con la unión a lípidos y membranas celulares, como el Lipocalin/cytosolic fatty-acid binding protein family, podrían estar involucrados en el

transporte y el metabolismo de lípidos necesarios para la formación de la concha (Arivalagan et al., 2016, Marin, 2020). Mientras que los dominios implicados en la interacción con la matriz extracelular, como por ejemplo, Fibronectin type III domain, Laminin Domains, y EGF domains, podrían participar en la adhesión de las células que secretan la matriz de la concha a la matriz extracelular circundante (Lemmon et al., 2009, Zhang et al., 2012; Arivalagan et al., 2016; Marin, 2020).

Expresión diferencial de transcritos e isoformas durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) producto del mantenimiento de embriones y larvas en condiciones de acidificación del agua de mar

Mientras que en el estadio de desarrollo de blástula no se encontraron términos GO enriquecidos en los transcritos e isoformas expresadas diferencialmente, en el estadio de desarrollo de trocófora se identificaron términos GO relacionados con la mantención de la mitocondria, reparación de ácidos nucleicos, y reproducción, lo que sugiere una respuesta adaptativa de las larvas a las condiciones de estrés ambiental. Estos resultados son congruentes con estudios previos en larvas trocóforas de *C. gigas* expuestas a niveles similares de pH (De Wit et al., 2018). En el estadio de larva-D, se observaron múltiples términos GO enriquecidos asociados a procesos biológicos, como la respuesta inmunitaria. Estos hallazgos indican que la exposición de las larvas a agentes estresantes como la acidificación del agua de mar coinciden con lo reportado en otros estudios también en larvas de *C. gigas* y células inmunes (Wang et al., 2016; Dineshram et al., 2021; Wang et al., 2020). Además, se identificaron términos GO enriquecidos relacionados con funciones moleculares, como la unión de moléculas y iones, así como la actividad motora de microtúbulos y peptidasas. Estos resultados también coinciden con lo visto anteriormente por efecto de la acidificación del agua de mar en larvas trocóforas (De Wit et al., 2018) y organismos adultos en la misma especie (Zúñiga-Soto et al., 2023). Lo anterior, sugiere una alteración en funciones asociadas al proceso de formación de concha larval, lo que subraya la importancia de investigar los dominios funcionales asociados a la biomineralización en los transcritos, pero también en las isoformas expresadas diferencialmente en respuesta a la acidificación del agua de mar.

La disminuida cantidad de dominios funcionales asociados a la formación de concha en el estadio de desarrollo de blástula se podría explicar por la ausencia del proceso de biomineralización en este estadio de desarrollo (Marin, et al., 2012; Jackson et al., 2016). En su conjunto, esto sugiere que los dominios funcionales detectados en el estadio de blástula formarían parte de otros procesos biológicos o funciones moleculares que se expresan diferencialmente producto del mantenimiento de embriones en agua de mar acidificada. En el caso de la alta cantidad de dominios de Laminina contenidos en las isoformas de transcritos expresados diferencialmente en el estadio de desarrollo de trocófora, este dominio está presente principalmente en glicoproteínas del mismo nombre, asociándose a fibras de colágeno tipo IV y a la membrana celular, mediante la unión con fibronectina e integrinas asociadas a la membrana celular (Marin, 2020). Interesantemente, encontramos dominios funcionales vinculados directamente al proceso de biomineralización en el estadio de desarrollo de larva-D. Dentro de los dominios funcionales detectados encontramos dominios de anhidrasas carbónicas, dominios de unión a calcio del tipo EF-hand, y peroxidasas (Le Roy et al., 2014; Herlitze et al., 2014; Marin, 2020). Otras proteínas relevantes en la formación de concha son las proteínas adhesivas, las cuales son responsables de mantener la concha a su tejido responsable de fabricarla; es decir, la glándula de la concha en etapa embrionaria/larval y el manto en etapa de adultez, además de mantener conjunta y unidas las diferentes capas de carbonato de calcio que componen la concha (Agbaje et al., 2018, Marin, 2020). Algunos de los dominios funcionales que han sido identificados en las isoformas de transcritos expresadas diferencialmente en larva-D corresponden a dominios de unión a colágeno y fibrinógeno.

Efecto de la acidificación del agua de mar en los patrones de metilación m⁶A asociados a la formación de la concha larval durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*)

Mientras que existe una gran carencia de información acerca del rol de las metilaciones del tipo N⁶-metiladenosina en la regulación de la expresión de transcritos e isoformas en especies de moluscos frente a estresores ambientales, estudios en plantas destacan las dinámicas epitranscripcionales como una capa adicional en el entendimiento de

procesos del desarrollo y cómo estas modificaciones regulan la respuesta frente al estrés ambiental (Hu & Manduzio, 2019; Huber et al., 2019; Shoaib & Usman, 2022; Zhou et al., 2022). En esta tesis, los análisis de dominios funcionales extienden una gran variedad de dominios. Por otro lado, los transcritos de isoformas proteicas diferencialmente metiladas presentan una gran variedad de dominios funcionales, los cuales potencialmente participarían en procesos de regulación de vías metabólicas, ciclo celular, y regulación de la expresión génica. Estos dominios funcionales fueron identificados principalmente en transcritos de isoformas proteicas expresadas diferencialmente en los estadios de desarrollo de blástula y larva-D. Específicamente, estos dominios funcionales están asociados a reconocimiento a ARN, reguladores de la condensación de cromosomas, inhibidores de apoptosis, y están en concordancia con procesos del ciclo celular regulados mediante metilaciones del tipo m⁶A en otros estudios (Arcidiacono et al., 2020; Dieterich et al., 2021; Konno et al., 2021). Estas modificaciones podrían afectar la capacidad para adaptarse a estresores ambientales, posiblemente modulando la velocidad de ciclo celular priorizando rutas metabólicas.

Asimismo, varios dominios funcionales detectados en los transcritos de isoformas proteicas diferencialmente metiladas en los estadios de desarrollo de blástula, trocófora, y larva-D denotan la amplitud de procesos biológicos que estarían potencialmente afectados por el desarrollo de embriones y larvas en agua de mar acidificada. Por ejemplo, procesos biológicos relacionados con la generación de energía celular, evidenciado en dominios de transportadores ABC y ATP subunidad C sintetasa. Del mismo modo, dominios funcionales asociados a unión proteica, quitina, y colágenos en el estadio de desarrollo de trocófora, pero principalmente en el estadio de desarrollo de larva-D estarían contribuyendo a la formación y estabilidad de estructuras celulares, así como a la interacción con otras moléculas en el entorno celular asociado a la matriz de la concha larval (Agbaje et al., 2018, Zhao et al., 2018, De Wit et al., 2018, Marin, 2020). Esto es de gran relevancia en la formación de la concha en moluscos, ya que dichos dominios funcionales han sido descritos como responsables de la estructuración y organización de la matriz de la concha (Agbaje et al., 2018, Marin, 2020). También, dominios funcionales asociados a repeticiones triple hélices de colágeno, dominios de laminina, repeticiones de ankirina, repeticiones similares a armadillo/beta-catenina, motivos de Kelch, repeticiones ricas en leucina, dominios PDZ, repeticiones de espectrina, y dominios trombospodina tipo I han sido descritos como parte del “kit” molecular de las

conchas en moluscos (Sun et al., 2020, Marin, 2020). En el mismo sentido, también se detectaron dominios funcionales de unión a calcio del tipo EF-hand y peroxidasas en transcritos de isoformas proteicas expresadas diferencialmente y con niveles de metilación diferencial en el estadio de desarrollo de larva-D. Todo lo anterior indicaría una alteración en el efecto final, es decir, la formación de la concha embrionaria y larval en *C. gigas* producto de la presencia/ausencia de la metilación m⁶A en transcritos y/o isoformas que alteraría directamente el proceso de biomineralización. Sin embargo, los efectos finales de estas metilaciones m⁶A presentes en estas isoformas diferencialmente metiladas son aún desconocidos, dilucidar el posible efecto final permitirá comprender íntegramente el rol y la relevancia de la metilación m⁶A en el contexto de la acidificación del agua de mar y la formación de estructuras mineralizadas en moluscos.

Efectos de la acidificación del agua de mar en el transcriptoma y el epitranscriptoma m⁶A en la formación de la concha larval de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*)

Recientemente, se ha evidenciado cómo la acidificación del agua de mar afecta significativamente tanto los procesos epigenómicos como transcripcionales en distintas especies de ostras (Goncalves et al., 2017, Lim et al., 2021, Venkataraman et al., 2022, Dang et al., 2023, Zúñiga-Soto et al., 2023), siendo un estresor ambiental que también podría influir directamente en la formación de la concha larval. Bajo este contexto, la metilación m⁶A podría actuar como un modulador clave en la regulación de la expresión génica en respuesta a este estrés ambiental, coincidiendo con estudios realizados anteriormente (Zhou et al., 2022; Rudy et al., 2023; Hou et al., 2023; Lei et al., 2023). En el ámbito epitranscripcional, los resultados presentados en esta tesis sugieren que la metilación m⁶A podría estar ajustando la respuesta celular para enfrentar el entorno acidificado durante el desarrollo (Figura 12 y Figura 24). Aunque en el estadio de desarrollo de blástula no se encontraron términos GO enriquecidos para los transcritos metilados diferencialmente (Figura 12), en estadios de desarrollo posteriores, como la larva-D, los transcritos de isoformas proteicas metiladas presentan una variedad de dominios funcionales (Figuras 13-15). Estos dominios están asociados a la regulación del ciclo celular, el reconocimiento de ARN, y la inhibición de la apoptosis, sugiriendo que la metilación m⁶A podría estar priorizando rutas metabólicas y

ajustando la velocidad del ciclo celular en respuesta al estrés ambiental, algo que coincide con estudios previos (Arcidiacono et al., 2020; Dieterich et al., 2021; Konno et al., 2021). Sin embargo, en este estudio no se realizaron estudios funcionales sobre el efecto concreto de las metilaciones m⁶A en los transcritos/isoformas producto de la acidificación del agua de mar.

Los transcritos/isoformas estadio-específico que se encuentran expresados diferencialmente en el estadio de desarrollo de larva trocófora están relacionados con la regulación del desarrollo, crecimiento y el potencial de acción de células musculares (Figura 19A). Esto coincide con reportes previos, donde la acidificación del océano aumenta las tasas de biomineralización en la estrella de mar *Amphiura filiformis* y la Ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*, pero a costa de un decrecimiento del tamaño de la masa muscular y su tasa metabólica (Wood et al., 2008, Lannig et al., 2010, Rajan et al., 2021). En conjunto, estos procesos biológicos relacionados a metabolismo que se encuentran expresados diferencialmente podrían apuntar a una preferencia sobre una alteración en la regulación del metabolismo al hacer frente a un contexto de estrés ambiental como lo es la acidificación del agua de mar, algo que también se ha descrito en moluscos y equinodermos (Wood et al., 2008, Lannig et al., 2010, Venkataraman et al., 2020; Rajan et al., 2021; Venkataraman et al., 2022; Dang et al., 2022).

En los transcritos/isoformas estadio-específicos expresados en el estadio de desarrollo de larva-D (Figura 19) destacan términos GO enriquecidos asociados a procesos biológicos como proteólisis, ensamblaje de miofibrillas, y respuesta inmune (Figura 19B), lo cual coincide con lo reportado en otros trabajos sobre bivalvos (Venkataraman et al., 2020; Rajan et al., 2021; Venkataraman et al., 2022; Dang et al., 2022). Además, se observan términos GO enriquecidos en funciones moleculares asociadas a unión a diversos iones metálicos, en conjunto a la unión de iones de calcio y zinc (Figura 19B). Estos precursores iónicos son claves no solo en la mantención de la homeostasis larval, sino que también en la regulación del proceso de biomineralización, así como ha sido descrito anteriormente (Arivalagan et al., 2017, Marin, 2020, Wang et al., 2020, Yarra et al., 2021, Hanif et al., 2023). En conjunto, estos resultados son consecuentes con los dominios funcionales de aquellos transcritos/isoformas que se encuentran metilados diferencialmente

En esta tesis, se observaron un número reducido de transcritos e isoformas que presentan conjuntamente niveles de expresión y metilación diferenciales, y que a su vez estén relacionados a procesos biológicos y/o funciones moleculares asociadas al proceso de biomineralización en moluscos. A pesar de eso, nuestros resultados muestran transcritos con un uso dinámico de isoformas a lo largo de la ontogenia de *C. gigas*. Por ejemplo, los transcritos G25087, G24022, G10885, y G22502 codifican para dominios funcionales asociados a la biomineralización en moluscos y presentan una disminución en el uso de algunas de sus isoformas frente a condiciones de acidificación del agua de mar. Esto puede ser factible dentro de las funciones del lector de m⁶A nuclear YTHDC1, el cual es capaz de regular el empalme alternativo de isoformas de transcritos (Cesaro et al., 2023). Además, las diferentes isoformas de un mismo transcrito pueden tener diferentes patrones de metilación asociado puntualmente a un uso de isoformas, como ocurre con los transcritos G3290, G2857, G10885, G28384, G25087, G24022, G23989, G23988, G23042, y G22502. Estos transcritos muestran isoformas con variaciones en los niveles de metilación, pero cuyas secuencias codificantes poseen dominios funcionales asociados al proceso de formación de concha. Por otro lado, es importante destacar la variación en el uso de isoformas que se puede observar en los transcritos G25087, G24022, G10885, y G22502, los cuales presentan una disminución en el uso de algunas de sus isoformas frente a condiciones de acidificación del agua de mar.

Basado en nuestros resultados, pareciera ser que la metilación m⁶A y los cambios en la expresión génica trabajan en paralelo para modular la respuesta de *C. gigas* a la acidificación del agua de mar. Bajo este contexto, la metilación m⁶A, podría modificar el uso de intrones/exones, alternando el uso de transcritos hacia isoformas puntuales y/o regulando la traducibilidad de los transcritos sin necesidad de realizar cambios en el nivel de expresión de los transcritos (Vandivier & Gregory, 2018; Kumar & Mohapatra, 2021; Tang et al., 2021; Bayoumi & Munir, 2021; Murakami & Jaffrey, 2022; Rückle et al., 2022; Wilinski et al., 2023; Guca et al., 2024; Song, 2024). Por lo que es necesario realizar análisis que determinen la distribución de estas metilaciones en el cuerpo de los transcritos que podrían dilucidar el posible rol de las metilaciones detectadas.

El catálogo de transcritos de isoformas proteicas expresadas y metiladas diferencialmente asociadas al proceso de biomineralización durante el desarrollo larval de *C. gigas* generados en esta tesis, proporcionan un vistazo a los procesos biológicos y funciones moleculares potencialmente alterados en la formación de la concha en moluscos, asegurando la activación de mecanismos críticos para la biomineralización y la adaptación a las condiciones adversas. En conjunto, esta tesis establece a la metilación del tipo m⁶A como una nueva capa de complejidad en la formación de la concha en moluscos.

CONCLUSIONES

La disminución del pH del agua de mar afecta negativamente la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de diversas especies marinas (Gazeau et al., 2013; Kroeker et al., 2014; Gattuso et al., 2015; Sulpis et al., 2018; Tan and Zheng, 2020; Auzoux-Bordenave et al. 2020; Figuerola et al., 2021). En moluscos como la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, este problema se agrava debido al conocimiento limitado sobre los mecanismos moleculares y proteicos involucrados en la formación de la concha durante los estadios embrionarios y larvales. (Jackson et al., 2007; Zhao et al., 2018; Batzel et al., 2022). Aunque los avances en estudios epitranscriptómicos han explorado el papel de las modificaciones químicas en el ADN y ARN frente a estresores ambientales, la mayoría de estas investigaciones se han centrado en vertebrados y plantas, dejando una gran brecha en el estudio de invertebrados (Hu & Manduzio, 2019; Huber et al., 2019; Shoaib & Usman, 2022; Zhou et al., 2022). En el caso de los moluscos, los pocos estudios disponibles se han enfocado en etapas específicas del desarrollo temprano, como la transición materno-cigoto (Le Franc et al., 2021) y ciertas modificaciones químicas durante el estadio de mórula (Le Franc et al., 2022).

Esta tesis proporciona un vistazo al epitranscriptoma m⁶A en estadios embrionarios (blástula) y larvales (trocófora y larva-D) de la Ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, determinando preferencias sobre la metilación m⁶A en motivos DRACHs puntuales, además de los procesos biológicos y funciones moleculares que se encuentran regulados bajo esta modificación química. Los resultados indican que efectivamente la metilación m⁶A es un proceso altamente dinámico durante la ontogenia larval y que los niveles de esta modificación química efectivamente varían frente a la disminución del pH del agua de mar, planteándose como una vía que responde dinámicamente frente al estresor ambiental. Además, estas metilaciones se presentan en genes asociados a la regulación de procesos del desarrollo, reproducción, y destino celular se encuentran entre los más afectados, coincidiendo con resultados previos en otras especies de animales (Arcidiacono et al., 2020; Dieterich et al., 2021; Konno et al., 2021). Dentro de los diversos dominios funcionales en las secuencias codificantes de los transcritos de isoformas proteicas metiladas, así como dominios funcionales involucrados en la formación de concha en moluscos, se destacan aquellos

asociados a estructuración de la matriz de la concha, actividad enzimática, unión de iones y calcio, los cuales se encuentran directamente vinculados al proceso de biomineralización de la concha en moluscos (De Wit et al., 2018; Marin 2020).

Los efectos de la acidificación del agua de mar sobre el transcriptoma y el epitranscriptoma m⁶A revelan un reducido número de transcritos/isoformas que presentan conjuntamente niveles de expresión y metilación diferenciales. Estos transcritos/isoformas están principalmente asociados a eventos de control del ciclo celular o eventos de diferenciación celular, complementario a lo reportado por Le Franc et al., 2022. Sin embargo, los resultados de esta tesis indicarían que la acidificación del agua de mar sí es capaz de inducir cambios sobre los niveles de expresión génica y/o niveles de metilación m⁶A, estableciendo escenarios paralelos de regulación (transcripcional o epitranscripcional), durante el desarrollo embrionario y larval de *C. gigas*, observándose transcritos e isoformas de transcritos expresadas diferencialmente sin cambios en sus niveles de metilación, así como otros transcritos/isoformas que poseen niveles de metilación m⁶A diferencial sin alterar sus niveles de expresión.

Las diferencias en los niveles de expresión de las isoformas de transcritos durante el desarrollo larval de *C. gigas* producto del mantenimiento de embriones y larvas en condiciones de acidificación del agua de mar, denotan una mayor variación de los niveles de metilación, variaciones altamente dinámicas de los niveles de metilación m⁶A para el conjunto de transcritos de isoformas proteicas que en sus secuencias codificantes tienen dominios funcionales asociados a la biomineralización de la concha, potencialmente en respuesta al desarrollo en agua de mar acidificada; algo que coincide con lo reportado en otros estudios ambientales realizados (Zhou et al., 2022, Rudy et al., 2023, Hou et al., 2023, Lei et al., 2023).

Los estudios realizados en esta tesis describen un catálogo epitranscriptómico m⁶A altamente dinámico durante la ontogenia larval y que se modifica en respuesta a estresores ambientales como la acidificación del agua de mar, y que funciona en paralelo a las variaciones sobre la expresión de transcritos. Además de proporcionar un vistazo a los procesos biológicos y funciones moleculares influenciados por la m⁶A durante la ontogenia de *C. gigas*, junto a su potencial implicancia en la formación de concha en esta especie y sus

alteraciones producto del desarrollo de embriones y larvas en agua de mar acidificada, enmarcando a la metilación m⁶A como un nuevo nivel de complejidad en la enmarañada red de regulación de la biomineralización en moluscos.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Genómica Marina, Desarrollo y Evolución (LGMDE), y a todos los integrantes que han integrado e integran el laboratorio desde sus inicios, con sus consejos y apoyo transité durante este proceso de desarrollar no solo mi tesis de Magister, si no que también mi tesis de pregrado y gran parte de mi formación académica-profesional. También y particularmente al Dr. Felipe Aguilera por su mentoría y guía, todos sus encarecidos consejos, precisas recomendaciones, invaluable lecciones y todo el apoyo que me han permitido desarrollarme como profesional culminando en el desarrollo de esta tesis.

A mi familia, abuelos, tíos y sobre todos, a mis padres Claudio y Ana. Con sus invaluable sacrificios y tremenda entrega con coraje, valor y mucho esfuerzo me han permitido llegar hasta donde estoy, y que gracias a ellos mis hermanas y yo, aprendimos el privilegio y responsabilidad de soñar. Agradezco enseñarme la perseverancia y pasión de recorrer una carrera como la que elegí y plasmo en esta tesis.

A mi pareja, Montserrat, la cual no solo ha formado parte desde el principio de mi carrera universitaria hasta la fecha de esta Tesis. Ha formado gran parte de mi infancia, adolescencia y juventud, siendo siempre y en especial en el último tiempo, un pilar fundamental de apoyo en cada desafío que se ha cruzado. Agradezco todo el camino que hemos recorrido juntos, tu compañía y apoyo han sido esenciales en el desarrollo de esta tesis.

También, a mi grupo más íntimo y cercano de amistades, con el privilegio de tan larga amistad y camaradería, me han acompañado durante todos estos años de carrera entregándome invaluable compañía y confianza. En memoria y representación, agradezco a Carlos Alberto Jaque Rodríguez, que en paz descansa, por la certeza en tus palabras en los momentos más difíciles de mi carrera universitaria, me han permitido realizar esta tesis.

Finalmente, agradecimientos también a los proyectos Fondecyt Iniciación 11180084, Fondecyt 1220708, eLife-MESOCOSM, y Fondecyt EQM200056, por financiar esta tesis.

REFERENCIAS

- Adhikari, S., Xiao, W., Zhao, Y.-L., & Yang, Y.-G. (2016). m⁶A: Signaling for mRNA splicing. *RNA Biology*, 13:756–759.
- Alexa A, Rahnenfuhrer J (2022). topGO: Enrichment analysis for gene ontology. R package version 2.48.0.
- Agbaje, O. B. A., ben Shir, I., Zax, D. B., Schmidt, A., & Jacob, D. E. (2018). Biomacromolecules within bivalve shells: Is chitin abundant? *Acta Biomaterialia*, 80:176–187.
- Aguilera, F., McDougall, C., & Degnan, B. M. (2014). Evolution of the tyrosinase gene family in bivalve molluscs: Independent expansion of the mantle gene repertoire. *Acta Biomaterialia*, 10:3855-3865.
- Aguilera, F., McDougall, C., & Degnan, B. M. (2017). Co-option and de novo gene evolution underlie molluscan shell diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 34:779–792.
- Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura 2023 [Internet]. 2023 September 02, 2024]. Available from: <http://www.sernapesca.cl/informacion-utilidad/anuarios-estadisticos-de-pesca-y-acuicultura#>
- Aranishi, F., & Okimoto, T. (2004). Genetic relationship between cultured populations of Pacific oyster revealed by RAPD analysis. *Journal of Applied Genetics*, 45:435–443.
- Arcidiacono, O. A., Krejčí, J., Legartová, S., Stixova, L., & Bártová, E. (2020). Epigenetic processes and DNA repair in embryonic stem cells. In *Stem Cell Epigenetics* (pp. 1–23). Elsevier.
- Arivalagan, J., Marie, B., Sleight, V. A., Clark, M. S., Berland, S., & Marie, A. (2016). Shell matrix proteins of the clam, *Mya truncata*: Roles beyond shell formation through proteomic study. *Marine Genomics*, 27:69–74.

Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V. A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M. S., Marie, A., & Berland, S. (2017). Insights from the shell proteome: Biomineralization to adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, 34:66–77.

Auzoux-Bordenave, S., Wessel, N., Badou, A., Martin, S., M’Zoudi, S., Avignon, S., Roussel, S., Huchette, S., & Dubois, P. (2020). Ocean acidification impacts growth and shell mineralization in juvenile abalone (*Haliotis tuberculata*). *Marine Biology*, 167:11.

Babraham Bioinformatics - FastQC A quality control tool for high throughput sequence data [WWW Document], URL <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 31.8.24)

Barclay, K. M., Gingras, M. K., Packer, S. T., & Leighton, L. R. (2020). The role of gastropod shell composition and microstructure in resisting dissolution caused by ocean acidification. *Marine Environmental Research*, 162:105105.

Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chícharo, L., & Matias, D. (2013). Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 440:200–206.

Batzel, G. O., Moreno, B. K., Lopez, L. S., Nguyen, C. K., Livingston, B. T., Joester, D., & Lyons, D. C. (2022). Proteomic and transcriptomic analyses in the slipper snail *Crepidula fornicata* uncover shell matrix genes expressed during adult and larval biomineralization. *Integrative Organismal Biology*, 4:obac023.

Bayoumi, M., & Munir, M. (2021). Evolutionary conservation of the DRACH signatures of potential. *Scientific Reports*, 11:45-48.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30:2114–2120.

Bots, P., Benning, L. G., Rodriguez-Blanco, J.-D., Roncal-Herrero, T., & Shaw, S. (2012). Mechanistic insights into the crystallization of amorphous calcium carbonate (ACC). *Crystal Growth & Design*, 12:3806–3814.

Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12:59–60.

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10:421.
- Campos, J. H. C., Alves, G. v, Maricato, J. T., Braconi, C. T., Antoneli, F. M., Janini, L. M. R., & Briones, M. R. S. (2022). The epitranscriptome of Vero cells infected with SARS-CoV-2 assessed by direct RNA sequencing reveals m⁶A pattern changes and DRACH motif biases in viral and cellular RNAs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12:906578.
- Cesaro, B., Tarullo, M., & Fatica, A. (2023). Regulation of gene expression by m⁶A mRNA modification. *International Journal of Molecular Sciences*, 24:2277.
- Chandra Rajan, K., Meng, Y., Yu, Z., Roberts, S. B., & Vengatesen, T. (2021). Oyster biomineralization under ocean acidification: From genes to shell. *Global Change Biology*, 27:3779–3797.
- Chokkalla, A. K., Mehta, S. L., & Vemuganti, R. (2022). Epitranscriptomic modifications modulate normal and pathological functions in CNS. *Translational Stroke Research*, 13:1–11.
- Cun, Y., Guo, W., Ma, B., Okuno, Y., & Wang, J. (2024). Decoding the specificity of m⁶A RNA methylation and its implication in cancer therapy. *Molecular Therapy*, 32(8), 2461–2469.
- Dang, X., Lim, Y.-K., Li, Y., Roberts, S. B., Li, L., & Thiagarajan, V. (2023). Epigenetic-associated phenotypic plasticity of the ocean acidification-acclimated edible oyster in the mariculture environment. *Molecular Ecology*, 32:412–427.
- de Wit, P., Durland, E., Ventura, A., & Langdon, C. J. (2018). Gene expression correlated with delay in shell formation in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to experimental ocean acidification provides insights into shell formation mechanisms. *BMC Genomics*, 19:160.
- Dieterich, C., & Völkers, M. (2021). RNA modifications in cardiovascular disease - An experimental and computational perspective. In *Epigenetics in Cardiovascular Disease* (pp. 113–125). Elsevier.

- Dineshram, R., Q., Q., Sharma, R., Chandramouli, K., Yalamanchili, H. K., Chu, I., & Thiagarajan, V. (2015). Comparative and quantitative proteomics reveal the adaptive strategies of oyster larvae to ocean acidification. *Proteomics*, 15:4120–4134.
- Dineshram, R., Xiao, S., Ko, G. W. K., Li, J., Smrithi, K., Thiagarajan, V., Zhang, Y., & Yu, Z. (2021). Ocean acidification triggers cell signaling, suppress immune and calcification in the Pacific oyster larvae. *Frontiers in Marine Science*, 8:782583.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-Seq aligner. *Bioinformatics*, 29:15–21.
- Downey-Wall, A. M., Cameron, L. P., Ford, B. M., McNally, E. M., Venkataraman, Y. R., Roberts, S. B., Ries, J. B., & Lotterhos, K. E. (2020). Ocean acidification induces subtle shifts in gene expression and DNA methylation in mantle tissue of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Frontiers in Marine Science*, 7:566419.
- Du, H., & Amstad, E. (2020). Water: How does it influence the CaCO₃ formation? *Angewandte Chemie*, 59:1798–1816.
- Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., & Addadi, L. (1996). Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 271:67–69.
- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nature Reviews. Genetics*, 13:97–109.
- Figuerola, B., Hancock, A. M., Bax, N., Cummings, V. J., Downey, R., Griffiths, H. J., Smith, J., & Stark, J. S. (2021). A review and meta-analysis of potential impacts of ocean acidification on marine calcifiers from the Southern Ocean. *Frontiers in Marine Science*, 8:584445.
- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39:W29-37.
- Fitzer, S. C., Phoenix, V. R., Cusack, M., & Kamenos, N. A. (2014). Ocean acidification impacts mussel control on biomineralisation. *Scientific Reports*, 4:6218.

- Fuhrmann, M., Richard, G., Quéré, C., Petton, B., & Pernet, F. (2019). Low pH reduced survival of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the Ostreid herpesvirus 1 by altering the metabolic response of the host. *Aquaculture*, 503:167–174.
- Gattuso, J.-P., Magnan, A., Billé, R., Cheung, W. W. L., Howes, E. L., Joos, F., Allemand, D., Bopp, L., Cooley, S. R., Eakin, C. M., Hoegh-Guldberg, O., Kelly, R. P., Pörtner, H.-O., Rogers, A. D., Baxter, J. M., Laffoley, D., Osborn, D., Rankovic, A., Rochette, J., ... Turley, C. (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science*, 349:aac4722.
- Gazeau, F., Gattuso, J.-P., Greaves, M., Elderfield, H., Peene, J., Heip, C. H. R., & Middelburg, J. J. (2011). Effect of carbonate chemistry alteration on the early embryonic development of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *PLoS ONE*, 6:e23010.
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J.-P., O'Connor, W. A., Martin, S., Pörtner, H.-O., & Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160:2207–2245.
- Gilbert, P. U. P. A., Bergmann, K. D., Boekelheide, N., Tambutté, S., Mass, T., Marin, F., Adkins, J. F., Erez, J., Gilbert, B., Knutson, V., Cantine, M., Hernández, J. O., & Knoll, A. H. (2022). Biomineralization: Integrating mechanism and evolutionary history. *Science Advances*, 8:eabl9653.
- Gilbert, S. F. (2005). Mechanisms for the environmental regulation of gene expression: Ecological aspects of animal development. *Journal of Biosciences*, 30:65–74.
- Glazier, A., Herrera, S., Winnig, A., Kurman, M., Gómez, C. E., & Cordes, E. (2020). Regulation of ion transport and energy metabolism enables certain coral genotypes to maintain calcification under experimental ocean acidification. *Molecular Ecology*, 29:1657–1673.
- Goncalves, P., Anderson, K., Thompson, E. L., Melwani, A., Parker, L. m, Ross, P. M., & Raftos, D. A. (2016). Rapid transcriptional acclimation following transgenerational exposure of oysters to ocean acidification. *Molecular Ecology*, 25:4836–4849.

- Goncalves, P., Jones, D. B., Thompson, E. L., Parker, L. M., Ross, P. M., & Raftos, D. A. (2017). Transcriptomic profiling of adaptive responses to ocean acidification. *Molecular Ecology*, 26:5974–5988.
- Gruber, N., Bakker, D. C. E., DeVries, T., Gregor, L., Hauck, J., Landschützer, P., McKinley, G. A., & Müller, J. D. (2023). Trends and variability in the ocean carbon sink. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4:119-134.
- Gu, Z., & Hübschmann, D. (2023). SimplifyEnrichment: A bioconductor package for clustering and visualizing functional enrichment results. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 21:190–202.
- Guca, E., Alarcon, R., Palo, M. Z., Santos, L., Alonso-Gil, S., Davyt, M., de Lima, L. H. F., Boissier, F., Das, S., Zagrovic, B., Puglisi, J. D., Hashem, Y., & Ignatova, Z. (2024). N6-methyladenosine in 5' UTR does not promote translation initiation. *Molecular Cell*, 84(3), 584-595.e6.
- Haines, A. (2003). Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of working group 1 to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *International Journal of Epidemiology*, 32:321.
- Hanif, M. A., Han, J. do, Kim, S. C., Hossen, S., & Kho, K. H. (2023). EF-hand-binding secreted protein Hdh-SMP5 regulates shell biomineralization and responses to stress in Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Current Issues in Molecular Biology*, 45:10079–10096.
- Hart, A. J., Ginzburg, S., Xu, M. S., Fisher, C. R., Rahmatpour, N., Mitton, J. B., Paul, R., & Wegrzyn, J. L. (2020). EnTAP: Bringing faster and smarter functional annotation to non-model eukaryotic transcriptomes. *Molecular Ecology Resources*, 20:591–604.
- Hausmann, I. U., Bodi, Z., Sanchez-Moran, E., Mongan, N. P., Archer, N., Fray, R. G., & Soller, M. (2016). m⁶A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination. *Nature*, 540:301–304.

- Havenhand, J. N., & Schlegel, P. (2009). Near-future levels of ocean acidification do not affect sperm motility and fertilization kinetics in the oyster *Crassostrea gigas*. *Biogeosciences*, 6:3009–3015.
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16:169.
- Hou, L., Li, S., Li, S., Wang, R., Zhao, M., & Liu, X. (2023). FTO inhibits oxidative stress by mediating m⁶A demethylation of Nrf2 to alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 79:133–146.
- Hu, J., Manduzio, S., & Kang, H. (2019). Epitranscriptomic RNA methylation in plant development and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10:500.
- Huang, J., & Zhang, R. (2022). The mineralization of molluscan shells: Some unsolved problems and special considerations. *Frontiers in Marine Science*, 9:874534.
- Huber, A. H., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell*, 90:871–882.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D. R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2016). eggNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research*, 44:D286-93.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47:D309–D314.
- Hüning, A. K., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M. A., Krämer, L., Frickenhaus, S., Rosenstiel, P., Pörtner, H.-O., Philipp, E. E. R., & Lucassen, M. (2013). Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: Implications for shell formation and energy metabolism. *Marine Biology*, 160:1845–1861.

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. In. Geneva, Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change

Ivanina, A. V., Falfushynska, H. I., Beniash, E., Piontkivska, H., & Sokolova, I. M. (2017). Biomineralization-related specialization of hemocytes and mantle tissues of the Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *The Journal of Experimental Biology*, 220:3209–3221.

Jackson, D. J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., & Degnan, B. M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology*, 4:40.

Jackson, D. J., McDougall, C., Woodcroft, B., Moase, P., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D. S., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal, D., & Degnan, B. M. (2010). Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs. *Molecular Biology and Evolution*, 27:591–608.

Jackson, D. J., Wörheide, G., & Degnan, B. M. (2007). Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evolutionary Biology*, 7:160.

Jain, B. P., & Pandey, S. (2018). WD40 repeat proteins: Signalling scaffold with diverse functions. *The Protein Journal*, 37:391–406.

Jiang, L.-Q., Kozyr, A., Relph, J. M., Ronje, E. I., Kamb, L., Burger, E., Myer, J., Nguyen, L., Arzayus, K. M., Boyer, T., Cross, S., Garcia, H., Hogan, P., Larsen, K., & Parsons, A. R. (2023). The ocean carbon and acidification data system. *Scientific Data*, 10:136.

Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cléon, I., Cochenne-Laureau, N., Gueguen, Y., & Montagnani, C. (2010). Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: Focus on biomineralization. *BMC Genomics*, 11:613.

Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37:907–915.

Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry*, 79:213–231.

- Kocot, K. M., Aguilera, F., McDougall, C., Jackson, D. J., & Degnan, B. M. (2016). Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: Insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in Zoology*, 13:23.
- Konno, M., Asai, A., Hirotsu, T., & Ishii, H. (2021). Ribonucleotide base-modifying enzymes and diseases. In *Epigenetic Regulation in Overcoming Chemoresistance* (pp. 69–83). Elsevier.
- Kroeker, K. J., Sanford, E., Jellison, B. M., & Gaylord, B. (2014). Predicting the effects of ocean acidification on predator-prey interactions: a conceptual framework based on coastal molluscs. *The Biological Bulletin*, 226:211–222.
- Kumar, S., & Mohapatra, T. (2021). Deciphering epitranscriptome: Modification of mRNA bases provides a new perspective for post-transcriptional regulation of gene expression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:628415.
- Kurihara, H., Kato, S., & Ishimatsu, A. (2007). Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Biology*, 1:91–98.
- Le Franc, L., Bernay, B., Petton, B., Since, M., Favrel, P., & Rivière, G. (2021). A functional m⁶A-RNA methylation pathway in the oyster *Crassostrea gigas* assumes epitranscriptomic regulation of lophotrochozoan development. *The FEBS Journal*, 288:1696–1711.
- Le Franc, L., Petton, B., Favrel, P., & Rivière, G. (2023). m⁶A profile dynamics indicates regulation of oyster development by m⁶A-RNA epitranscriptomes. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 21:742–755.
- Lee, Y. H., Kim, M.-S., Wang, M., Bhandari, R. K., Park, H. G., Wu, R. S.-S., & Lee, J.-S. (2022). Epigenetic plasticity enables copepods to cope with ocean acidification. *Nature Climate Change*, 12:918–927.
- Lei, K., Lin, S., & Yuan, Q. (2023). N6-methyladenosine (m⁶A) modification of ribosomal RNAs (rRNAs): Critical roles in mRNA translation and diseases. *Genes & Diseases*, 10:126–134.
- Lemmon, C. A., Chen, C. S., & Romer, L. H. (2009). Cell traction forces direct fibronectin matrix assembly. *Biophysical Journal*, 96:729–738.

- Lence, T., Akhtar, J., Bayer, M., Schmid, K., Spindler, L., Ho, C. H., Kreim, N., Andrade-Navarro, M. A., Poeck, B., Helm, M., & Roignant, J.-Y. (2016). m⁶A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature*, 540:242–247.
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12:323.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30:923–930.
- Lim, Y.-K., Cheung, K., Dang, X., Roberts, S. B., Wang, X., & Thiagarajan, V. (2021a). DNA methylation changes in response to ocean acidification at the time of larval metamorphosis in the edible oyster, *Crassostrea hongkongensis*. *Marine Environmental Research*, 163:105217.
- Lim, Y.-K., Cheung, K., Dang, X., Roberts, S. B., Wang, X., & Thiagarajan, V. (2021b). DNA methylation changes in response to ocean acidification at the time of larval metamorphosis in the edible oyster, *Crassostrea hongkongensis*. *Marine Environmental Research*, 163:105214.
- Liu, Z., Zhang, Y., Zhou, Z., Zong, Y., Zheng, Y., Liu, C., Kong, N., Gao, Q., Wang, L., & Song, L. (2020). Metabolomic and transcriptomic profiling reveals the alteration of energy metabolism in oyster larvae during initial shell formation and under experimental ocean acidification. *Scientific Reports*, 10:6111.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15:550.
- Lowenstam, H. A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science*, 211:1126–1131.
- Lowenstam, H. A., & Weiner, S. (1989). *On Biomineralization*. Oxford University Press.
- Ma, J., Song, B., Wei, Z., Huang, D., Zhang, Y., Su, J., de Magalhães, J. P., Rigden, D. J., Meng, J., & Chen, K. (2022). m⁵C-Atlas: A comprehensive database for decoding and annotating the 5-methylcytosine (m⁵C) epitranscriptome. *Nucleic Acids Research*, 50:D196–D203.

Marie, B., Zanella-Cléon, I., Guichard, N., Becchi, M., & Marin, F. (2011). Novel proteins from the calcifying shell matrix of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 13:1159–1168.

Marin, F. (2020). Mollusc shellomes: Past, present and future. *Journal of Structural Biology*, 212:107583.

Marin, F., Le Roy, N., Marie, B., Ramos-Silva, P., Bundelewa, I., Guichard, N., & Immel, F. (2014). Metazoan calcium carbonate biomineralizations: Macroevolutionary trends – challenges for the coming decade. *Bulletin de la Société Géologique de France*, 185:217-232.

Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2007). Molluscan shell proteins: Primary structure, origin, and evolution. In *Current Topics in Developmental Biology* (pp. 209–276). Elsevier.

Marshall, C. R. (2006). Explaining the Cambrian “explosion” of animals. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 34:355–384.

McDougall, C., Aguilera, F., & Degnan, B. M. (2013). Rapid evolution of pearl oyster shell matrix proteins with repetitive, low-complexity domains. *Journal of the Royal Society, Interface*, 10:20130041.

Michaely, P., Tomchick, D. R., Machius, M., & Anderson, R. G. W. (2002). Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *The EMBO Journal*, 21:6387–6396.

Murakami, S., & Jaffrey, S. R. (2022). Hidden codes in mRNA: Control of gene expression by m6A. *Molecular Cell*, 82(12), 2236–2251.

O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44:D733-D745.

Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G.-K., Rodgers, K. B., ... Yool, A. (2005).

Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437:681–686.

Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A., Pörtner, H. O., Scanes, E., & Wright, J. M. (2013). Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology*, 2:651–692.

Peñaloza, C., Gutierrez, A. P., Eöry, L., Wang, S., Guo, X., Archibald, A. L., Bean, T. P., & Houston, R. D. (2021). A chromosome-level genome assembly for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *GigaScience*, 10:giab020.

Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-Seq reads. *Nature Biotechnology*, 33:290–295.

Ponder, W., & Lindberg, D. R. (2008). *Phylogeny and evolution of the Mollusca*. University of California Press.

Pratanwanich, P. N., Yao, F., Chen, Y., Koh, C. W. Q., Wan, Y. K., Hendra, C., Poon, P., Goh, Y. T., Yap, P. M. L., Chooi, J. Y., Chng, W. J., Ng, S. B., Thiery, A., Goh, W. S. S., & Göke, J. (2021). Identification of differential RNA modifications from nanopore direct RNA sequencing with xPore. *Nature Biotechnology*, 39:1394–1402.

Punzi, G., Bharadwaj, R., & Ursini, G. (2018). Neuroepigenetics of Schizophrenia. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (pp. 195–226). Elsevier.

Ramakrishnan, M., Rajan, K. S., Mullasser, S., Palakkal, S., Kalpana, K., Sharma, A., Zhou, M., Vinod, K. K., Ramasamy, S., & Wei, Q. (2022). The plant epitranscriptome: Revisiting pseudouridine and 2'-O-methyl RNA modifications. *Plant Biotechnology Journal*, 20:1241–1256.

Rico-Villa, B., le Coz, J. R., Mingant, C., & Robert, R. (2006). Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 256:377–388.

Rivera-Perez, C., Flores-Sánchez, I. A., Ojeda Ramírez de Areyano, J. J., Rojas Posadas, D. I., & Hernández-Saavedra, N. Y. (2020). A shell matrix protein of *Pinctada mazatlanica* produces nacre platelets in vitro. *Scientific Reports*, 10:20201.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26:139–140.

Rücklé, C., Körtel, N., Basilicata, M. F., Busch, A., Zhou, Y., Hoch-Kraft, P., Tretow, K., Kielisch, F., Bertin, M., Pradhan, M., Musheev, M., Schweiger, S., Niehrs, C., Rausch, O., Zarnack, K., Keller Valsecchi, C. I., & König, J. (2023). RNA stability controlled by m⁶A methylation contributes to X-to-autosome dosage compensation in mammals. *Nature Structural & Molecular Biology*, 30:1207–1215.

Rudy, E., Grabsztunowicz, M., Arasimowicz-Jelonek, M., Tanwar, U. K., Maciorowska, J., & Sobieszczuk-Nowicka, E. (2022). N6-methyladenosine (m⁶A) RNA modification as a metabolic switch between plant cell survival and death in leaf senescence. *Frontiers in Plant Science*, 13:1064131.

Ryu, T., Veilleux, H. D., Donelson, J. M., Munday, P. L., & Ravasi, T. (2018). The epigenetic landscape of transgenerational acclimation to ocean warming. *Nature Climate Change*, 8:504–509.

Salamanca-Díaz, D. A., Ritschard, E. A., Schmidbaur, H., & Wanninger, A. (2022). Comparative single-cell transcriptomics reveals novel genes involved in bivalve embryonic shell formation and questions ontogenetic homology of molluscan shell types. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:883755.

Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, Å., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., & Hajnóczky, G. (2008). Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:20728–20733.

Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2022).

Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 50:D20–D26.

Schönitzer, V., & Weiss, I. M. (2007). The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitin synthase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC Structural Biology*, 7:71.

Shen, L., Ma, J., Li, P., Wu, Y., & Yu, H. (2023). Recent advances in the plant epitranscriptome. *Genome Biology*, 24:43.

Shimizu, K., Takeuchi, T., Negishi, L., Kurumizaka, H., Kuriyama, I., Endo, K., & Suzuki, M. (2022). Evolution of epidermal growth factor (EGF)-like and zona pellucida domains containing shell matrix proteins in mollusks. *Molecular Biology and Evolution*, 39:msac148.

Shoaib, Y., Usman, B., Kang, H., & Jung, K.-H. (2022). Epitranscriptomics: An additional regulatory layer in plants' development and stress response. *Plants*, 11:1033.

Simpson, J. T., Workman, R. E., Zuzarte, P. C., David, M., Dursi, L. J., & Timp, W. (2017). Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nature Methods*, 14:407–410.

Song, Y. (2023). mRNA methylation de-mystified. *Nature Chemical Biology*, 19(3), 252–252.

Song, X., Liu, Z., Wang, L., & Song, L. (2019). Recent advances of shell matrix proteins and cellular orchestration in marine molluscan shell biomineralization. *Frontiers in Marine Science*, 6:41.

Stoiber, M., Quick, J., Egan, R., Eun Lee, J., Celniker, S., Neely, R. K., Loman, N., Pennacchio, L. A., & Brown, J. (2016). De novo identification of DNA modifications enabled by genome-guided nanopore signal processing. *BioRxiv*, 094672.

Strader, M. E., Wong, J. M., & Hofmann, G. E. (2020). Ocean acidification promotes broad transcriptomic responses in marine metazoans: A literature survey. *Frontiers in Zoology*, 17:7.

- Sulpis, O., Boudreau, B. P., Mucci, A., Jenkins, C., Trossman, D. S., Arbic, B. K., & Key, R. M. (2018). Current CaCO_3 dissolution at the seafloor caused by anthropogenic CO_2 . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115:11700–11705.
- Sun, Q., Jiang, Y., Yan, X., Fan, M., Zhang, X., Xu, H., & Liao, Z. (2020). Molecular characterization of a novel shell matrix protein with PDZ domain from *Mytilus coruscus*. *Frontiers in Physiology*, 11:543758.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6:e21800.
- Suzuki, M., & Nagasawa, H. (2013). Mollusk shell structures and their formation mechanism. *Canadian Journal of Zoology*, 91:349–366.
- Tan, K., & Zheng, H. (2020). Ocean acidification and adaptive bivalve farming. *The Science of the Total Environment*, 701:134794.
- Tang, Y., Chen, K., Song, B., Ma, J., Wu, X., Xu, Q., Wei, Z., Su, J., Liu, G., Rong, R., Lu, Z., de Magalhães, J. P., Rigden, D. J., & Meng, J. (2021). m⁶A-Atlas: A comprehensive knowledgebase for unraveling the N⁶-methyladenosine (m⁶A) epitranscriptome. *Nucleic Acids Research*, 49:D134–D143.
- Tester, C. C., Wu, C.-H., Weigand, S., & Joester, D. (2012). Precipitation of ACC in liposomes—a model for biomineralization in confined volumes. *Faraday Discussions*, 159:345.
- Timmins-Schiffman, E., Coffey, W. D., Hua, W., Nunn, B. L., Dickinson, G. H., & Roberts, S. B. (2014). Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. *BMC Genomics*, 15:951.
- Timmins-Schiffman, E., O'Donnell, M. J., Friedman, C. S., & Roberts, S. B. (2013). Elevated p CO_2 causes developmental delay in early larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 160:1973–1982.
- Vandivier, L. E., & Gregory, B. D. (2018). New insights into the plant epitranscriptome. *Journal of Experimental Botany*, 69:4659–4665.

Vendrasco, M. J., Checa, A. G., & Kouchinsky, A. V. (2011). Shell microstructure of the early bivalve *Pojetaia* and the independent origin of nacre within the mollusca. *Palaeontology*, 54:825–850.

Venkataraman, Y. R., Downey-Wall, A. M., Ries, J., Westfield, I., White, S. J., Roberts, S. B., & Lotterhos, K. E. (2020). General DNA methylation patterns and environmentally induced differential methylation in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Frontiers in Marine Science*, 7:225.

Venkataraman, Y. R., White, S. J., & Roberts, S. B. (2022). Differential DNA methylation in Pacific oyster reproductive tissue in response to ocean acidification. *BMC Genomics*, 23:556.

Wagner, A., & Schosserer, M. (2022). The epitranscriptome in ageing and stress resistance: A systematic review. *Ageing Research Reviews*, 81:101700.

Wang, Q., Cao, R., Ning, X., You, L., Mu, C., Wang, C., Wei, L., Cong, M., Wu, H., & Zhao, J. (2016). Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49:24–33.

Wang, X., Wang, M., Wang, W., Liu, Z., Xu, J., Jia, Z., Chen, H., Qiu, L., Lv, Z., Wang, L., & Song, L. (2020). Transcriptional changes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reveal essential role of calcium signal pathway in response to CO₂-driven acidification. *Science of The Total Environment*, 741:140177.

Wanninger, A., & Wollesen, T. (2019). The evolution of molluscs. *Biological Reviews*, 94:102–115.

Wilinski, D., & Dus, M. (2023). N6-adenosine methylation controls the translation of insulin mRNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 30(9), 1260–1264.

Wood, H. L., Spicer, J. I., & Widdicombe, S. (2008). Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proceedings of the Royal Society B*, 275:1767–1773.

Wright-LaGreca, M., Mackenzie, C., & Green, T. J. (2022). Ocean acidification alters developmental timing and gene expression of ion transport proteins during larval

development in resilient and susceptible lineages of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Biotechnology*, 24:116–124.

Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Sun, H.-Y., Li, A., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., Wang, X., Ma, H.-L., Huang, C.-M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G.-B., Wang, H.-L., Zhou, Q., Wang, X.-J., ... Yang, Y.-G. (2016). Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Molecular Cell*, 61:507–519.

Xin, Y., He, Q., Liang, H., Zhang, K., Guo, J., Zhong, Q., Chen, D., Li, J., Liu, Y., & Chen, S. (2022). m⁶A epitranscriptomic modification regulates neural progenitor-to-glia cell transition in the retina. *eLife*, 11:e79994.

Yarra, T., Blaxter, M., & Clark, M. S. (2021). A bivalve biomineralization toolbox. *Molecular Biology and Evolution*, 38:4043–4055.

Yates, A. D., Allen, J., Amode, R. M., Azov, A. G., Barba, M., Becerra, A., Bhai, J., Campbell, L. I., Carbajo Martinez, M., Chakiachvili, M., Chougule, K., Christensen, M., Contreras-Moreira, B., Cuzick, A., Da Rin Fioretto, L., Davis, P., De Silva, N. H., Diamantakis, S., Dyer, S., ... Flicek, P. (2022). Ensembl Genomes 2022: An expanding genome resource for non-vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 50:D996–D1003.

Yurchenko, O. v, Skiteva, O. I., Voronezhskaya, E. E., & Dyachuk, V. A. (2018). Nervous system development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). *Frontiers in Zoology*, 15:10.

Zebral, Y. D., da Silva Fonseca, J., Marques, J. A., & Bianchini, A. (2019). Carbonic anhydrase as a biomarker of global and local impacts: Insights from calcifying animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:3092.

Zeytuni, N., & Zarivach, R. (2012). Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure*, 20:397–405.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., ... Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490:49–54.

- Zhang, G., Li, L., Meng, J., Qi, H., Qu, T., Xu, F., & Zhang, L. (2016). Molecular basis for adaptation of oysters to stressful marine intertidal environments. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4:357–381.
- Zhao, B. S., Wang, X., Beadell, A. v, Lu, Z., Shi, H., Kuuspalu, A., Ho, R. K., & He, C. (2017). m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 542:475–478.
- Zhao, R., Takeuchi, T., Luo, Y.-J., Ishikawa, A., Kobayashi, T., Koyanagi, R., Villar-Briones, A., Yamada, L., Sawada, H., Iwanaga, S., Nagai, K., Satoh, N., & Endo, K. (2018). Dual gene repertoires for larval and adult shells reveal molecules essential for molluscan shell formation. *Molecular Biology and Evolution*, 35:2751–2761.
- Zhou, L., Gao, G., Tang, R., Wang, W., Wang, Y., Tian, S., & Qin, G. (2022). m⁶A-mediated regulation of crop development and stress responses. *Plant Biotechnology Journal*, 20:1447–1455.
- Zhu, Z.-M., Huo, F.-C., Zhang, J., Shan, H.-J., & Pei, D.-S. (2023). Crosstalk between m⁶A modification and alternative splicing during cancer progression. *Clinical and Translational Medicine*, 13:e1460.
- Zúñiga-Soto, N., Pinto-Borguero, I., Quevedo, C., & Aguilera, F. (2023). Secretory and transcriptomic responses of mantle cells to low pH in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Frontiers in Marine Science*, 10:1156831.

ANEXOS

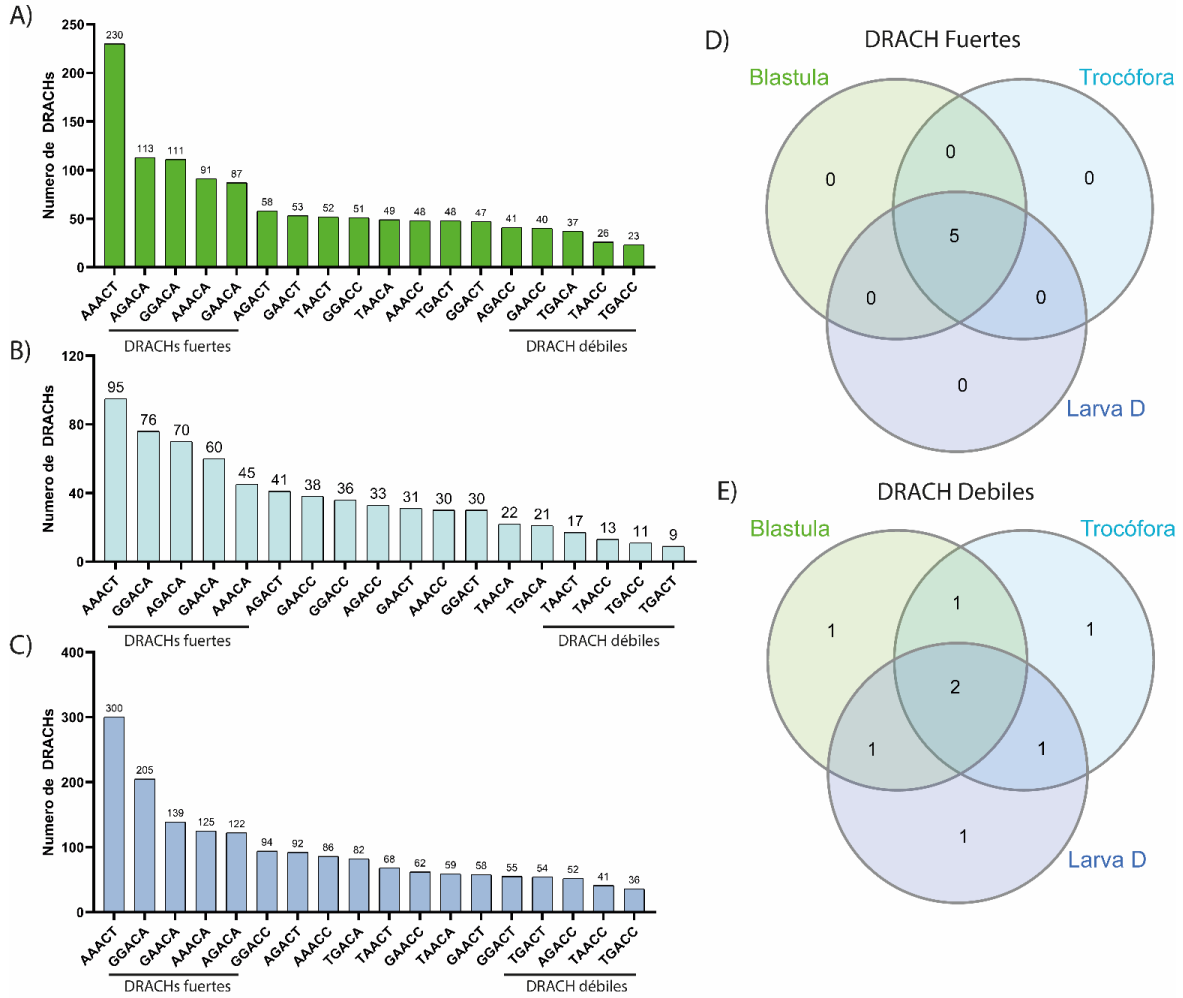


Figura S1. Preferencia de metilación m⁶A en motivos DRACHs detectadas en las secuencias de ARN durante en los estadios de desarrollo de bástula, trocófora, y larva-D de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Los patrones DRACHs corresponden a las regiones metiladas con un valor-p menor a 0.00001. En (A) se muestran los patrones DRACHs presentes en los embriones de estadio de blástula, mientras que en (B) se muestran los patrones DRACHs presentes en las larvas trocóforas. Por otro lado, en (C) se muestran los patrones DRACHs presentes en las muestras correspondientes a larvas-D. El diagrama de Venn en (D) muestra el número de dominios DRACHs catalogados como “fuertes” presentes en cada estadio de desarrollo mostrados en (A), (B), y (C), mientras que en el diagrama de Venn en (E) se muestra el número de dominios DRACHs catalogados como “débiles” para cada estadio de desarrollos mostrados en (A), (B), y (C).

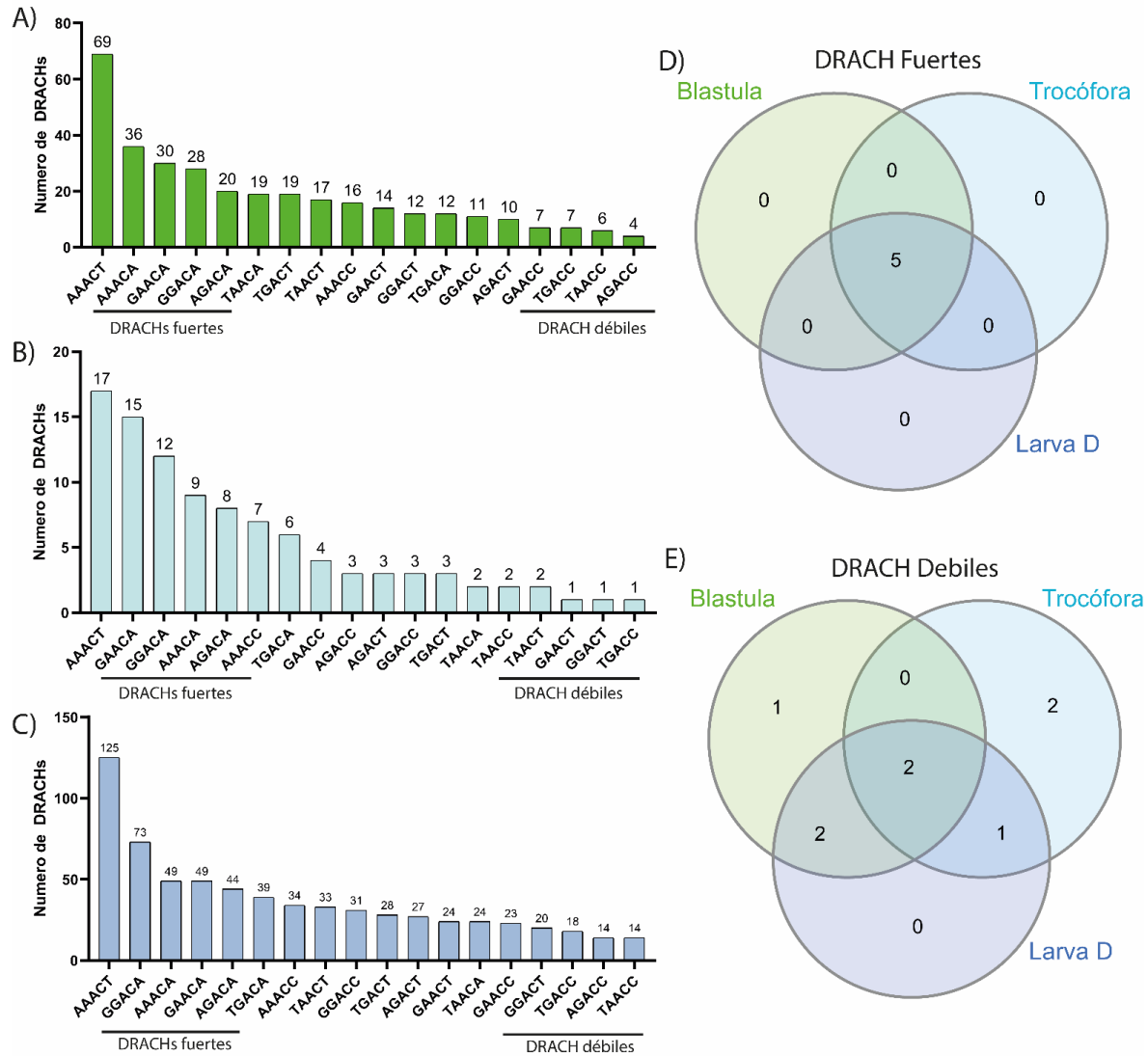


Figura S2. Preferencia de metilación m⁶A en motivos DRACHs diferencialmente metilados, detectados en las secuencias de ARN durante en los estadios de desarrollo de bástula, trocófora, y larva-D de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Los patrones DRACHs corresponden a las regiones metiladas con un p-value menor a 0.00001 y con DMR de 0.5 entre los embriones/larvas mantenidas en condición de pH normal (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1). En (A) se muestran los patrones DRACHs presentes en los embriones de estadio de blástula, mientras que en (B) se muestran los patrones DRACHs presentes en las larvas trocóforas. Por otro lado, en (C) se muestran los patrones DRACHs presentes en las muestras correspondientes a larvas-D. El diagrama de Venn en (D) muestra el número de dominios DRACHs catalogados como “fuertes” presentes en cada estadio de desarrollo mostrados en (A), (B), y (C), mientras que en el diagrama de Venn en (E) se muestra el número de dominios DRACHs catalogados como “débiles” para cada estadio de desarrollos mostrados en (A), (B), y (C).



Figura S3. Términos GO enriquecidos en transcritos/isoformas con metilaciones m⁶A y asociados a procesos biológicos en embriones en el estadio de desarrollo de bástula (A), en larvas en estadio de desarrollo de trocófora (B), y en larvas en estadio de desarrollo de larva-D (C).

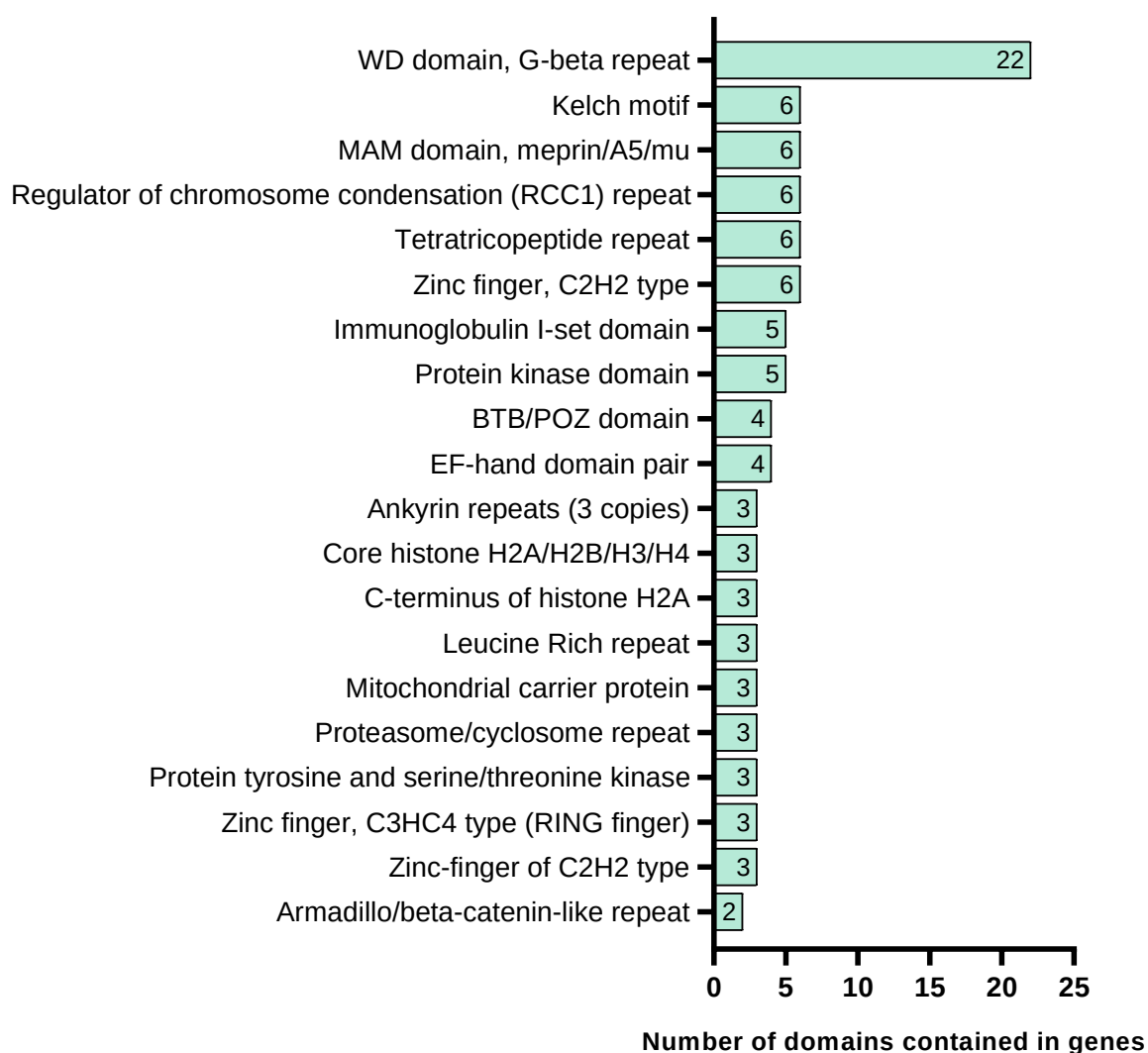


Figura S4. Los top 20 dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas con niveles de metilación m⁶A diferenciales en embriones en estadio de desarrollo de blástula mantenidos en condición de pH acidificado. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

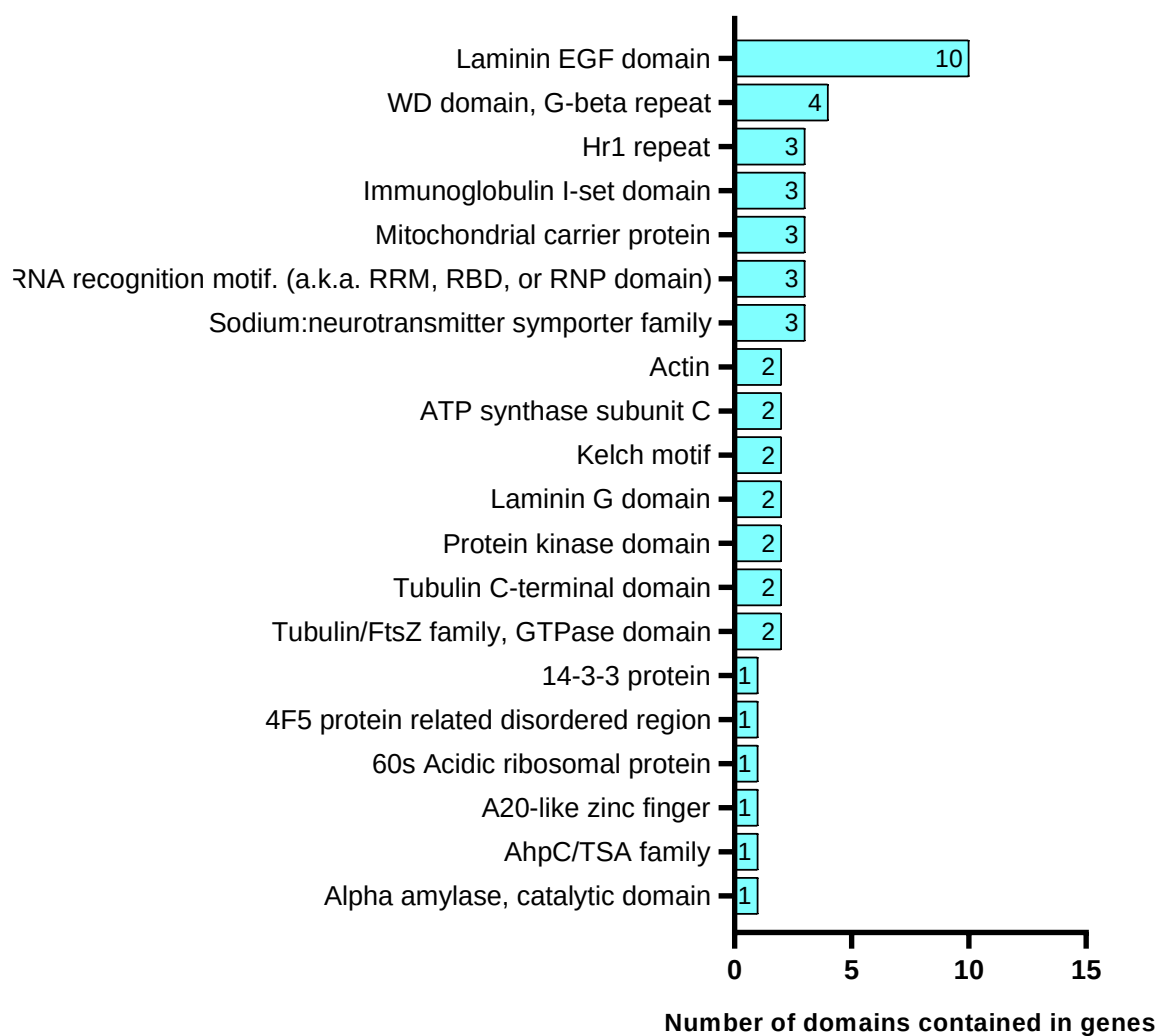


Figura S5. Los top 20 dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas con niveles de metilación m⁶A diferenciales en larvas en estadio de desarrollo de trocóforas mantenidas en condiciones de pH acidificado. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

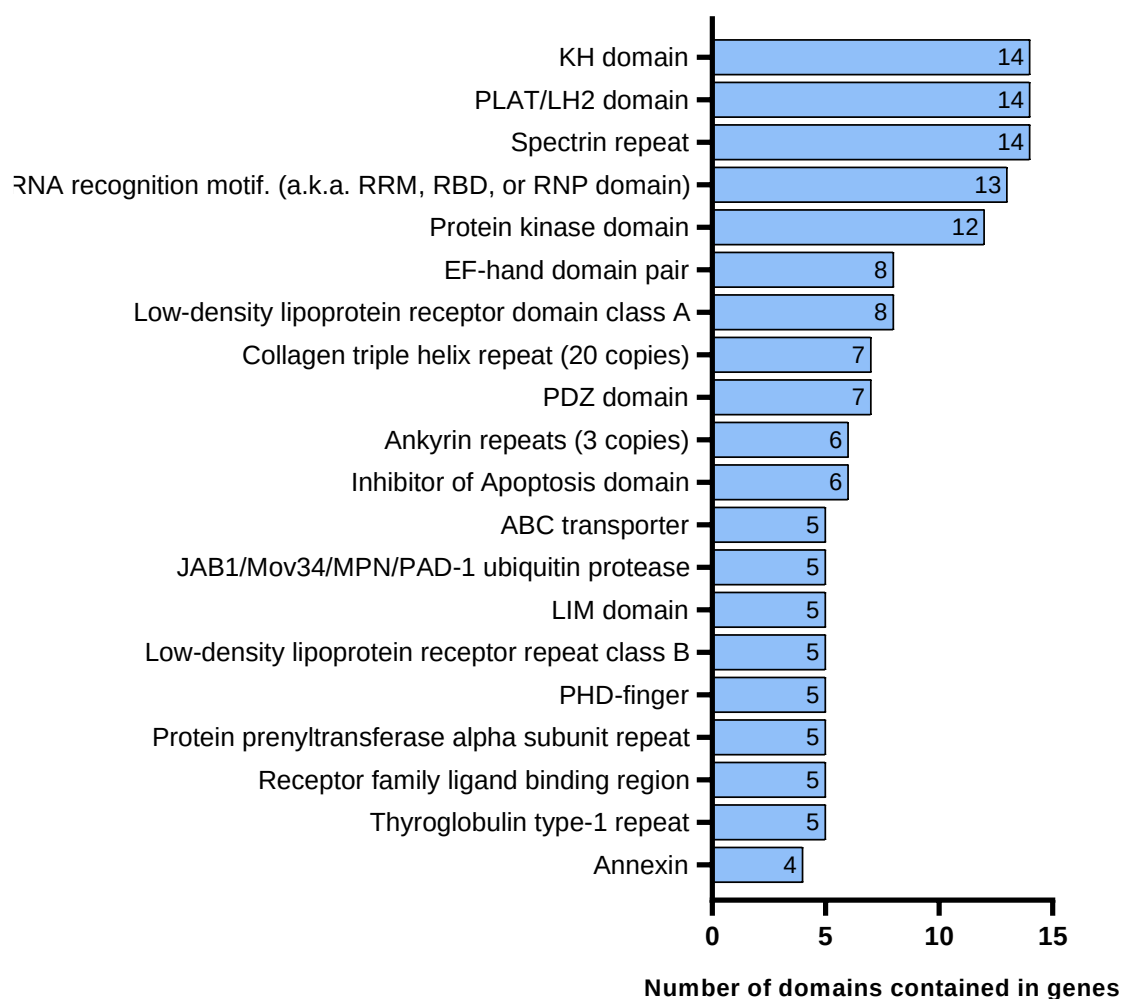


Figura S6. Los top 20 dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas con niveles de metilación m^6A diferenciales en larvas en estadio de desarrollo de larva-D mantenidas en condiciones de pH acidificado. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

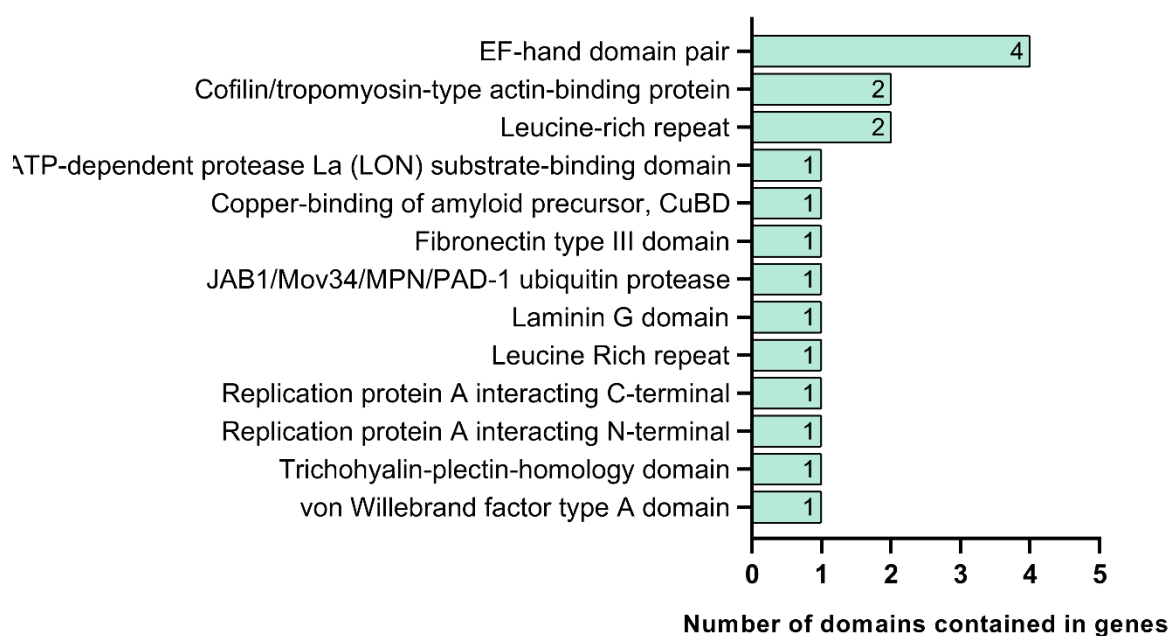


Figura S7. Dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas con niveles de metilación m⁶A diferenciales en embriones en estadio de desarrollo de blástula producto de mantenerlos en condiciones de pH acidificado. Las barras muestran los diferentes dominios funcionales que han sido vinculados al proceso de formación de concha en moluscos, según Marin., 2020. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

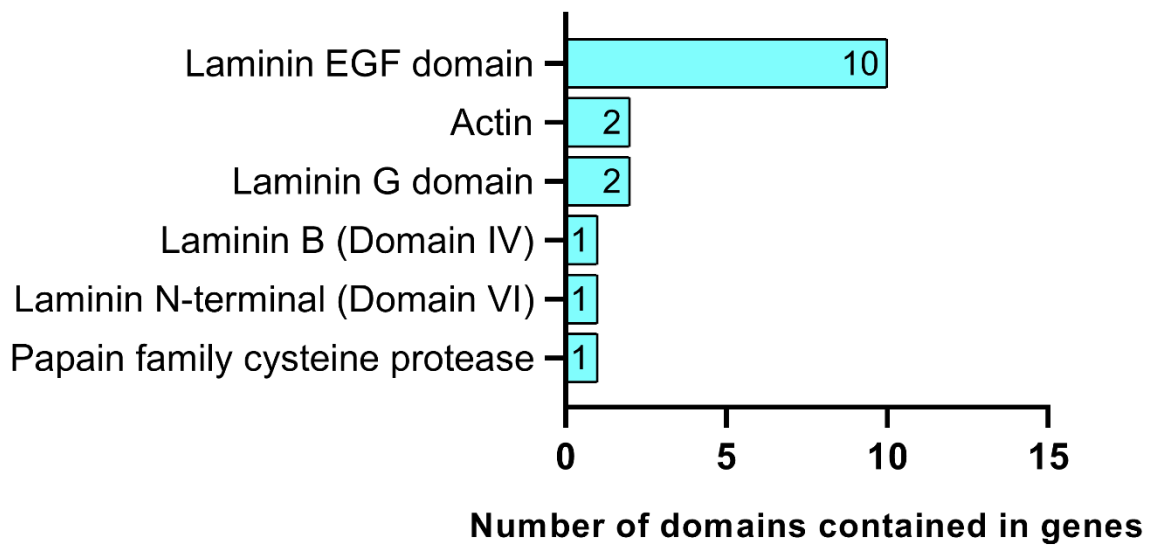


Figura S8. Dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas con niveles de metilación m^6A diferenciales en larvas en estadio de desarrollo de trocófora producto de mantenerlas en condiciones de pH acidificado. Las barras muestran los diferentes dominios funcionales que han sido vinculados al proceso de formación de concha en moluscos, según Marin, 2020. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

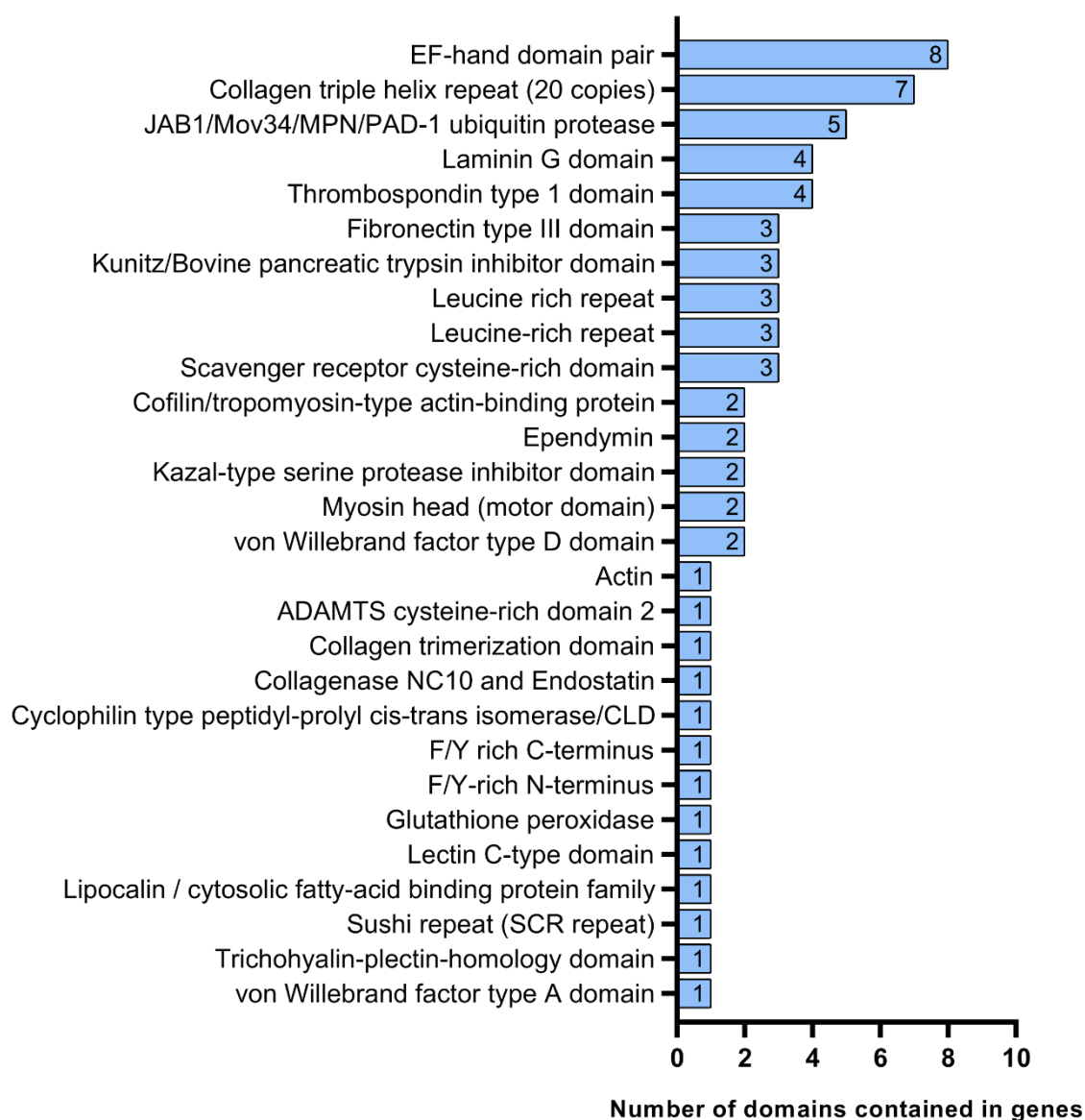


Figura S9. Dominios funcionales presentes en transcritos/isoformas con niveles de metilación m^6A diferenciales en larvas en estadio de desarrollo de larva-D producto de mantenerlas en condiciones de pH acidificado. Las barras muestran los diferentes dominios funcionales que han sido vinculados al proceso de formación de concha en moluscos, según Marin, 2020. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

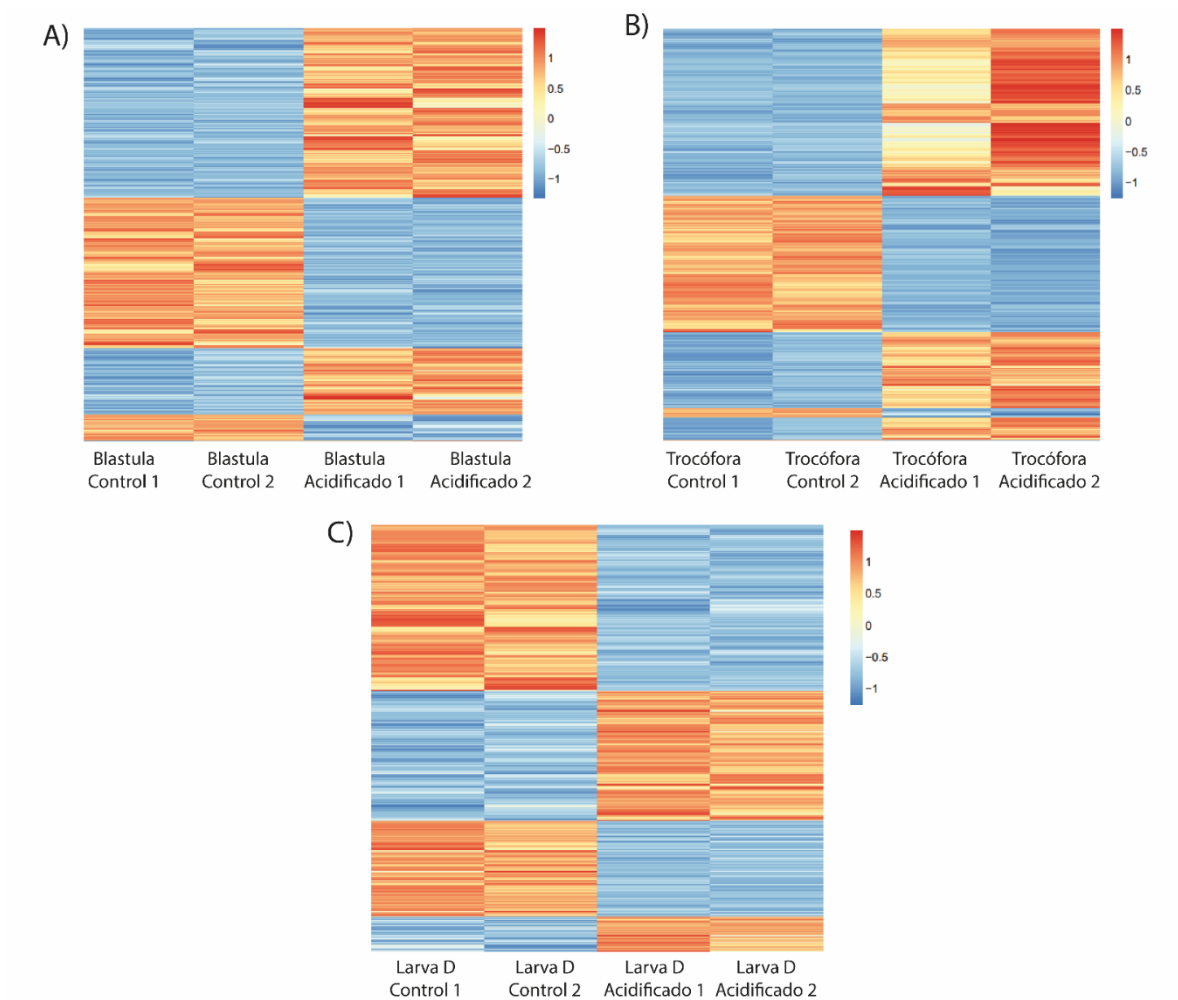


Figura S10. Mapas de calor mostrando transcritos/isoformas expresados diferencialmente durante la ontogenia de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) producto de la acidificación del agua de mar. En **(A)** se observan los transcritos/isoformas expresados diferencialmente en el estadio de desarrollo de blástula. En **(B)** se observan los transcritos/isoformas expresados diferencialmente en el estadio de desarrollo de trocófora. En **(C)** se observan los transcritos/isoformas expresados diferencialmente en el estadio de desarrollo de larva-D. En la parte inferior de los mapas de calor se indican los estadios de desarrollo y las condiciones de pH del agua de mar, donde control significa pH normal (8.0 ± 0.1) y acidificado significa pH acidificado (7.6 ± 0.1). Los transcritos/isoformas se muestran como filas horizontales y se agrupan por similitud de perfiles de expresión. La tonalidad rojo/anaranjada indica una mayor expresión, mientras que la tonalidad azul/celeste una menor expresión.

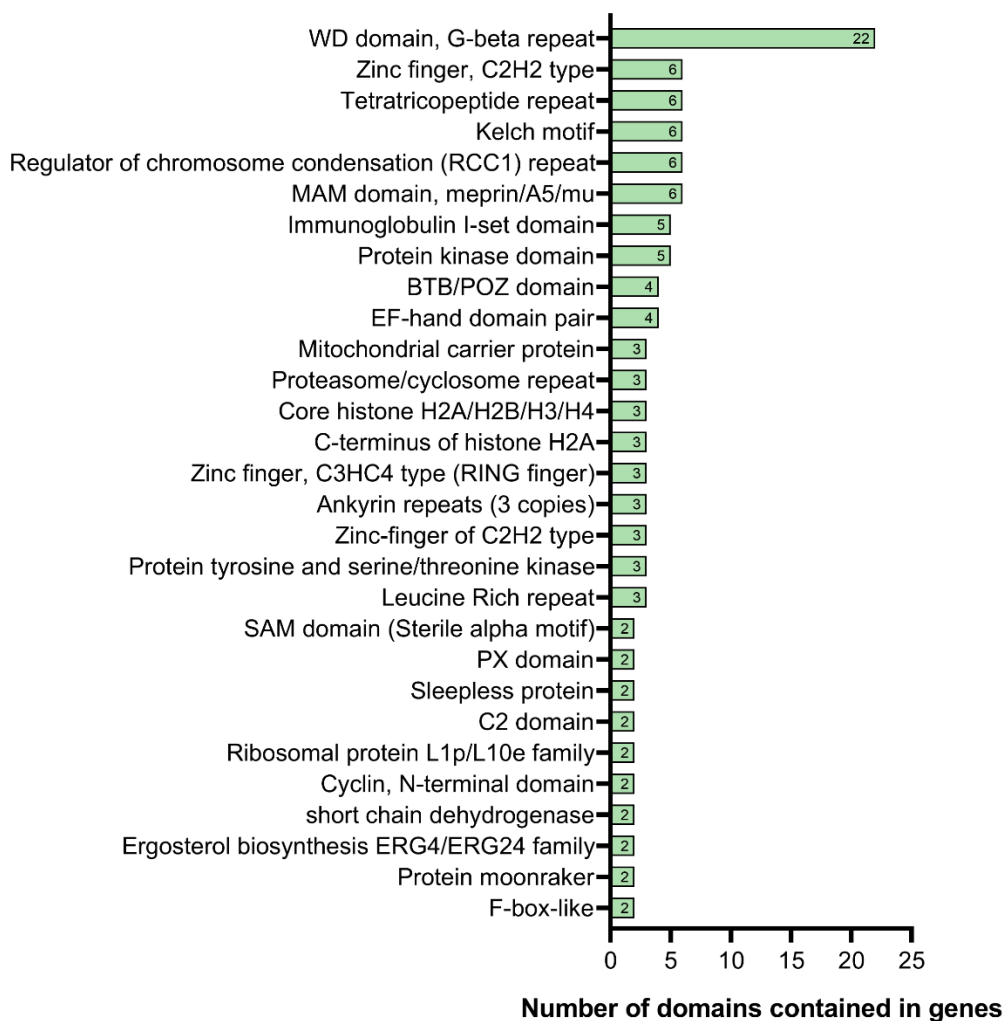


Figura S11. Los top 29 dominios funcionales presentes en transcritos expresados diferencialmente en embriones en el estadio de desarrollo de blástula mantenidas en condiciones de pH acidificado. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

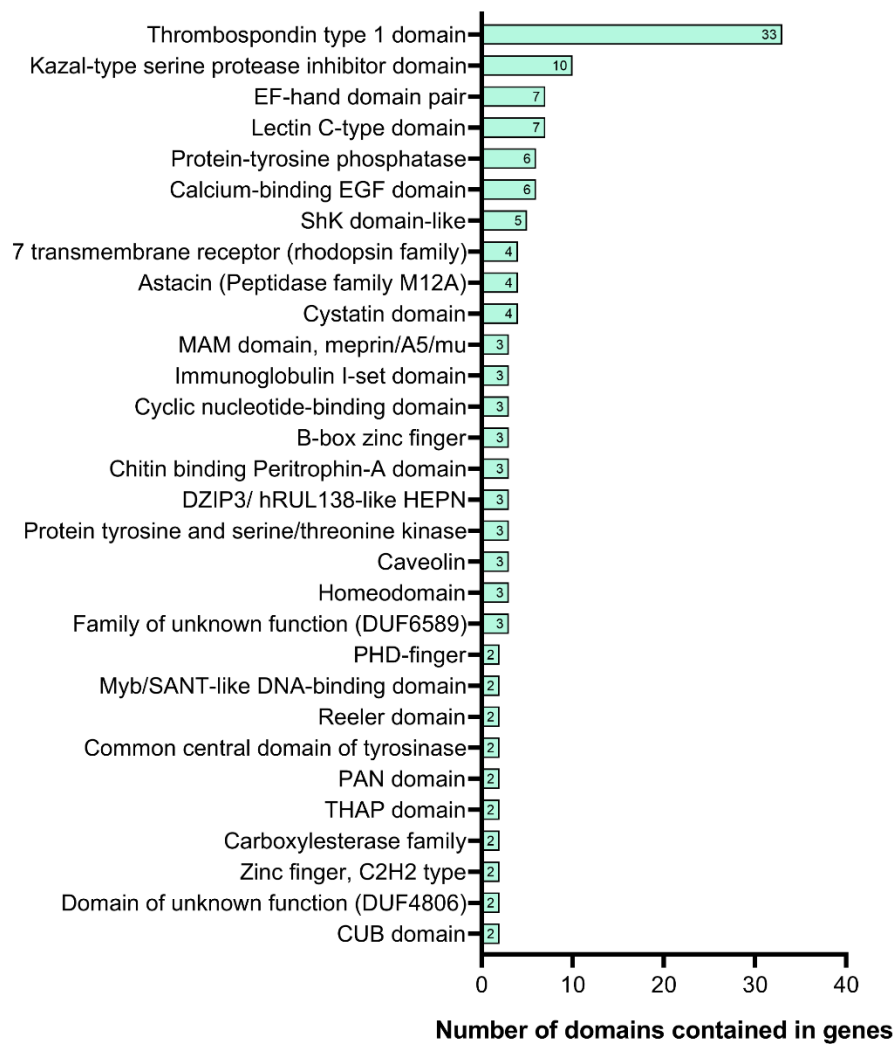


Figura S12. Los top 30 dominios funcionales presentes en transcritos expresados diferencialmente en larvas en el estadio de desarrollo de trocófora mantenidas en condiciones de pH acidificado. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

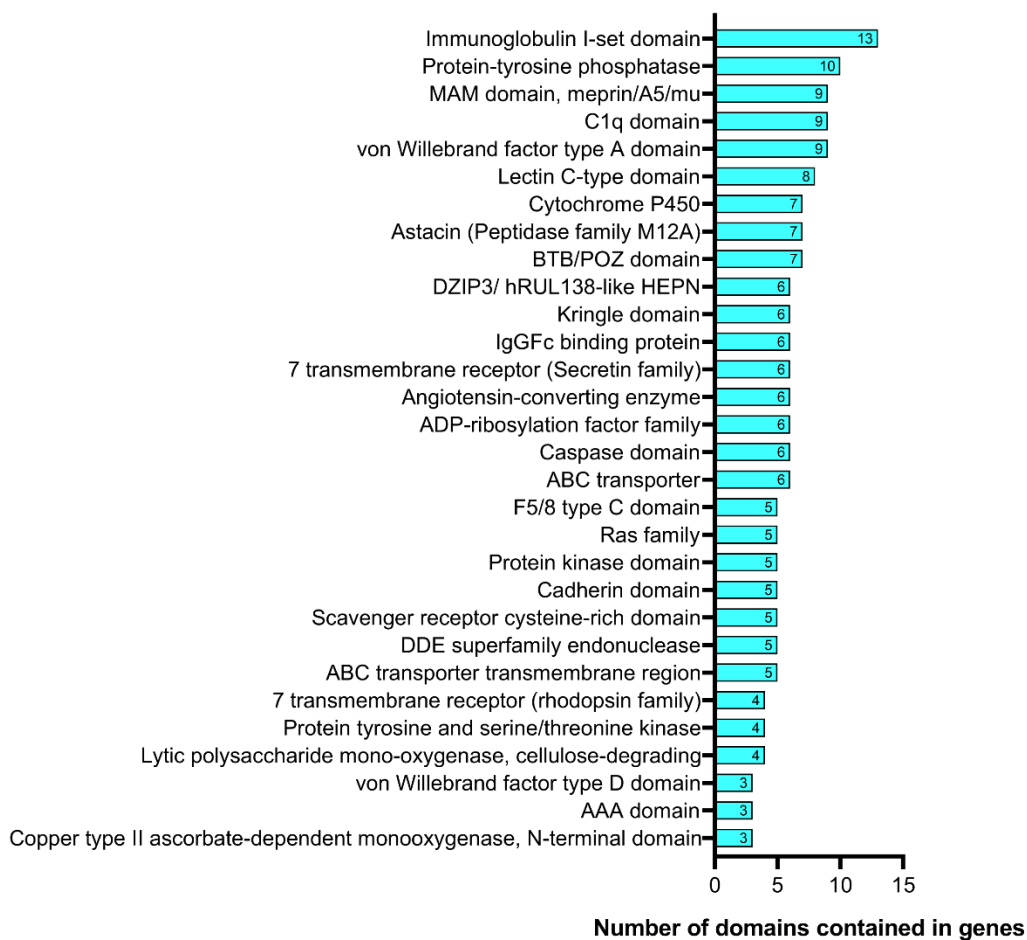


Figura S13. Los top 30 dominios funcionales presentes en transcritos expresados diferencialmente en larvas en el estadio de desarrollo de larva-D mantenidas en condiciones de pH acidificado. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

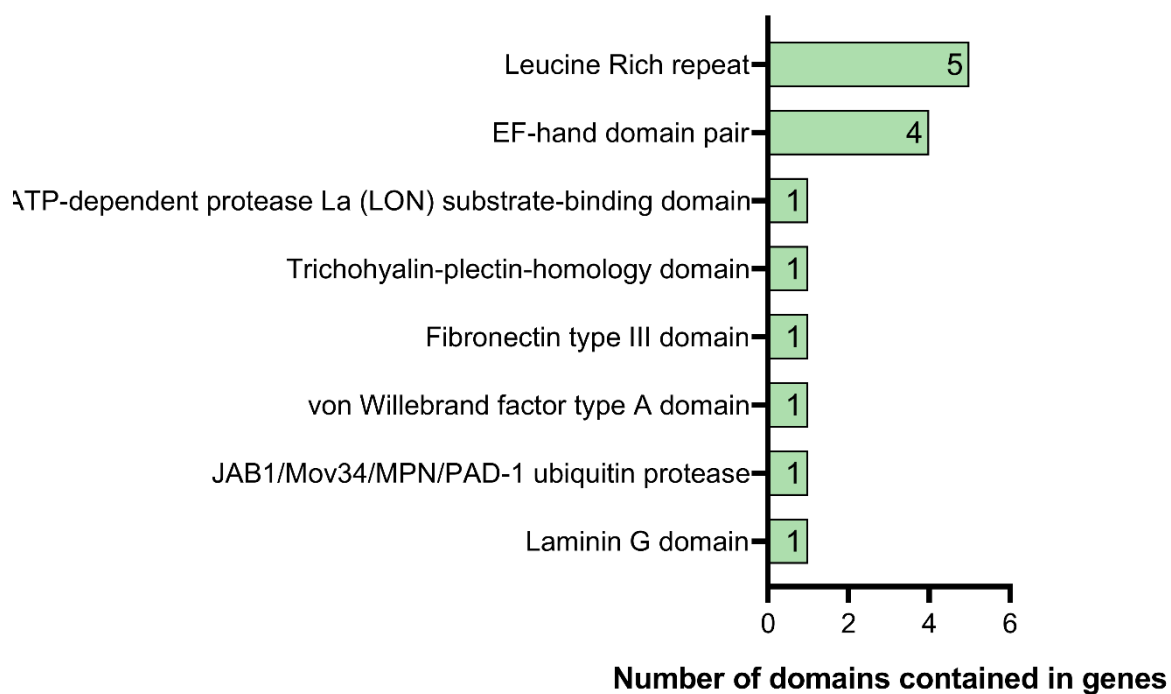


Figura S14. Dominios funcionales presentes en isoformas con expresión diferencial en embriones en estadio de desarrollo de blástula producto de mantenerlos en condiciones de pH acidificado. Las barras muestran los diferentes dominios funcionales que han sido vinculados al proceso de formación de concha en moluscos, según Marin 2020. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

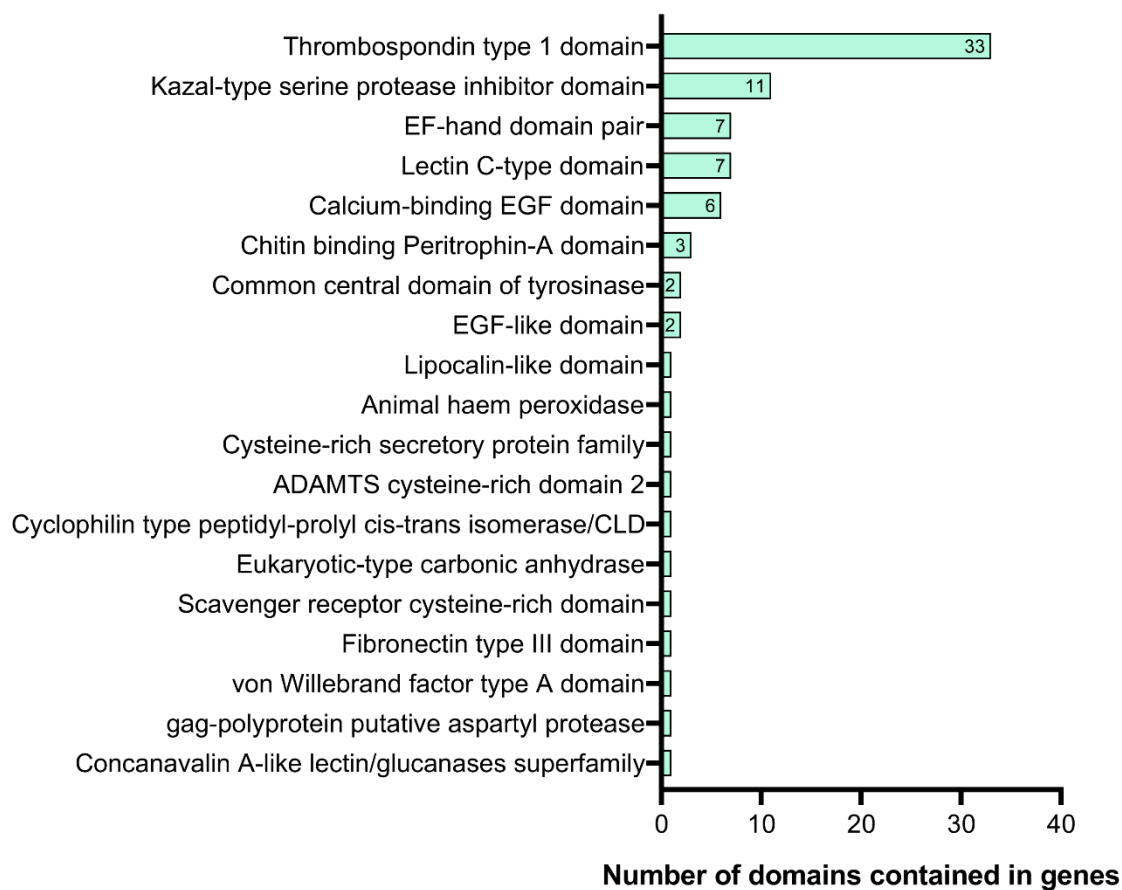


Figura S15. Dominios funcionales presentes en isoformas con expresión diferencial en larvas en estadio de desarrollo de trocófora producto de mantenerlas en condiciones de pH acidificado. Las barras muestran los diferentes dominios funcionales que han sido vinculados al proceso de formación de concha en moluscos, según Marin 2020. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

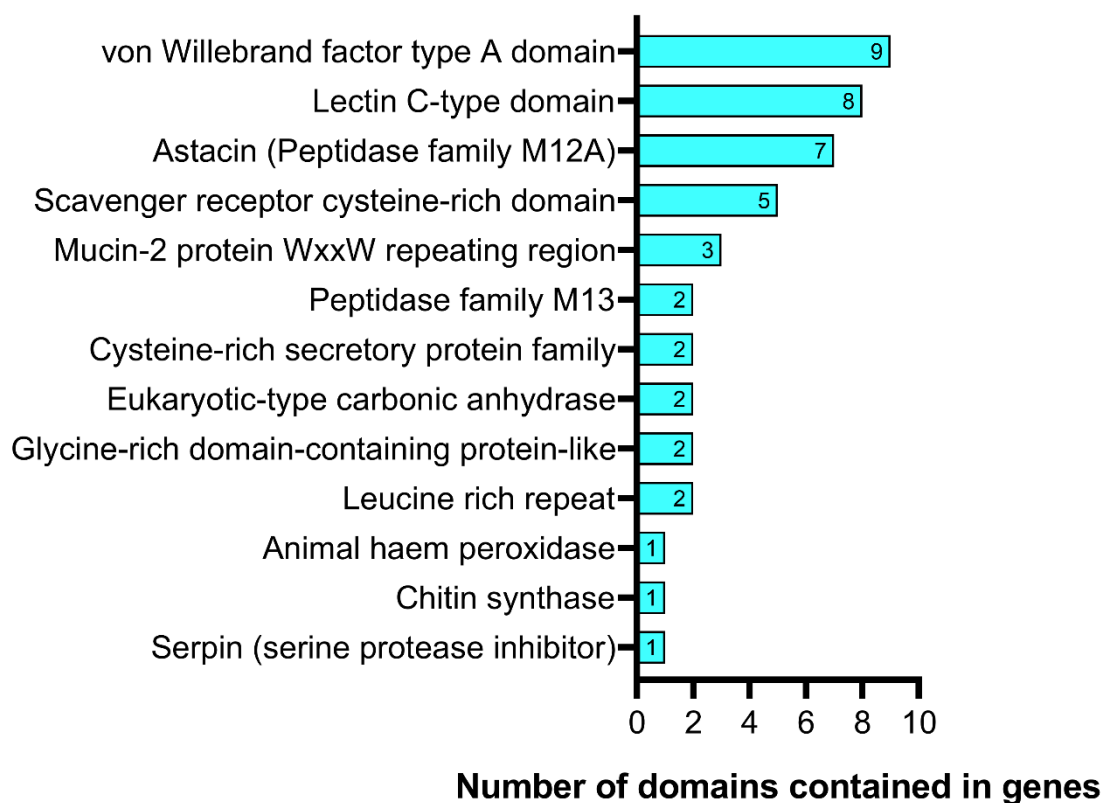


Figura S16. Dominios funcionales presentes en isoformas con expresión diferencial en larvas en estadio de desarrollo de larva-D producto de mantenerlas en condiciones de pH acidificado. Las barras muestran los diferentes dominios funcionales que han sido vinculados al proceso de formación de concha en moluscos, según Marin 2020. Los dominios funcionales fueron identificados utilizando el programa InterProScan y la base de datos de Pfam.

Tabla S1. Número de motivos DRACHs (regiones metiladas) en los distintos estadios de desarrollo (blástula, trocófora, y larva-D) de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y en condiciones de pH normal (8.0 ± 0.1) y pH acidificado (7.6 ± 0.1).

Motivos DRACHs	Blástula		Trocófora		Larva D	
	pH normal	pH acidificado	pH normal	pH acidificado	pH normal	pH acidificado
AAACA	12	19	4	5	24	25
AAACC	4	9	5	2	22	12
AAACU	19	38	12	5	63	62
AGACA	9	9	5	3	23	21
AGACC	0	4	2	1	10	4
AGACU	3	6	2	1	12	15
GAACA	15	10	6	9	27	22
GAACC	1	5	4	0	8	15
GAACU	5	7	1	0	11	13
GGACA	9	13	5	7	49	24
GGACC	5	5	1	2	13	18
GGACU	4	7	0	1	11	9
UAACA	7	11	2	0	15	9
UAACC	1	4	0	2	5	9
UAACU	6	9	0	2	17	16
UGACA	7	3	5	1	25	14
UGACC	3	3	1	0	9	9
UGACU	5	12	2	1	14	14

Tabla S2. Número de regiones metiladas m⁶A en transcritos e isoformas en embriones en el estadio de desarrollo de blástula mantenidas en condiciones de pH normal y pH acidificado.

Gen/Transcrito	Nº regiones metiladas	Nº isoformas	Isoformas	Nº regiones metiladas por isoforma
G22067	7	3	c78b68f1-b41c-4346-b8b8-085a11078d9a-0	5
			G22067.7	1
			G22067.10	1
G24600	7	3	G24600.6	3
			G24600.12	2
			G24600.2	2
G11501	7	4	a7a37899-e606-4cf8-b379-6b5f54638b30-0	2
			G11501.6	2
			G11501.1	2
			G11501.20	1
G550	6	5	b1f6d02a-e6f1-41c8-9a5a-b93d03d5643a-0	2
			G550.6	1
			G550.7	1
			G550.1	1
			G550.5	1
G26685	6	3	G26685.2	3
			b18b4aa7-9912-4a8f-a82f-b2b867fbefaa-0	2
			G26685.3	1
G16233	6	4	G16233.7	2
			bebb4506-a770-4bab-8723-2f8bdaa16f31-0	2
			30963340-a2ea-4d57-a791-b7ca9831839e-0	1
			G16233.4	1
G6720	5	3	G6720.4	3
			a72a0557-76db-4a14-a462-f61904a46e58-0	1
			G6720.3	1
MZ497416.1:11544..12255	5	1	MZ497416.1:11544..12255	5
G33755	5	1	G33755.1	5
LR761634.1:30526000	5	1	7d2c1d63-3fd5-4e80-b170-df21bda4f870-0	5
G3843	5	3	G3843.7	3
			G3843.3	1
			G3843.4	1
G27831	5	2	G27831.7	3
			G27831.11	2
G25304	5	5	G25304.18-0	1

			8eeddeb2-370c-47a3-b990-603210abd545-0	1
			G25304.19	1
			G25304.1	1
			G25304.11	1
G25668	5	4	G25668.38	2
			G25668.35	1
			G25668.10	1
			G25668.28	1
G16414	5	3	20d3cb58-c509-4b02-a6d3-1e07f0f2360e-0	2
			G16414.7	2
			G16414.5	1
G11116	5	3	524337a3-af5b-45b8-8018-fd64337621e2-0	2
			c2d12acd-d4c2-4d25-a8c7-7650f659cf09-0	2
			G11116.3	1
G12205	5	4	G12205.8	2
			G12205.7	1
			G12205.2	1
			G12205.3	1
G889	4	1	G889.5	4
G32187	4	1	G32187.1	4
LR761638.1:60639000	4	1	cd85863d-b94c-4b7c-b6fd-68c9d1ff00cd-0	4
G24409	4	2	G24409.6	3
			G24409.3	1
G24374	4	2	G24374.2	3
			G24374.3	1
G31074	4	4	G31074.7	1
			G31074.5	1
			G31074.14	1
			G31074.16	1
G237	4	1	G237.1	4
G28188	4	3	G28188.4	2
			G28188.5	1
			G28188.16	1
G14952	4	1	G14952.2	4
G16419	4	3	G16419.4	2
			G16419.7	1
			G16419.1	1
G2085	4	3	G2085.6	2
			G2085.16	1
			G2085.2	1

Tabla S3. Número de regiones metiladas m⁶A en transcritos e isoformas en embriones en el estadio de desarrollo de trocófora mantenidas en condiciones de pH normal y pH acidificado.

Transcrito	N° regiones metiladas	N° isoformas	Isoformas	N° regiones metiladas por isoforma
G14250	17	5	G14250.1	3
			G14250.15	5
			G14250.21	3
			G14250.8	3
			G14250.9	3
G15286	12	5	G15286.68	2
			G15286.72	3
			G15286.77	5
			G15286.79	1
			G15286.90	1
G16233	10	6	30963340-a2ea-4d57-a791-b7ca9831839e-0	1
			bebb4506-a770-4bab-8723-2f8bdaa16f31-0	4
			G16233.10	1
			G16233.11-0	1
			G16233.4	1
			G16233.7	2
G3506	9	2	G3506.1	3
			G3506.16	6
G730	9	6	G730.1	2
			G730.10	3
			G730.11	1
			G730.13	1
			G730.3	1
			G730.9	1
G22083	8	4	G22083.1	1
			G22083.10	2
			G22083.3	1
			G22083.4	4
G35235	7	2	G35235.2	4
			G35235.3	3
G28021	7	6	G28021.1	1
			G28021.10	1
			G28021.13	1
			G28021.14	2

			G28021.18	1
			G28021.23	1
G24405	7	4	G24405.12	2
			G24405.19	2
			G24405.27	1
			G24405.41	2
G550	6	2	G550.2	1
			G550.6	5
G12207	6	2	G12207.11	2
			G12207.4	4
G35096	6	4	G35096.1	1
			G35096.2	2
			G35096.6	1
			G35096.8	2
G32475	6	4	G32475.36	2
			G32475.47	2
			G32475.58	1
			G32475.61	1
G25027	5	2	G25027.13	2
			G25027.35-0	3
G20500	5	1	G20500.23	5
MZ497416.1:11544..12255	5	1	MZ497416.1:11544..12255	5
G16920	5	2	G16920.21	2
			G16920.3	3
G5571	5	2	G5571.1	1
			G5571.15	1
			G5571.2	1
			G5571.3	2
G2186	5	4	G2186.13	1
			G2186.14	2
			G2186.17	1
			G2186.2	1
G34830	5	3	G34830.1	2
			G34830.32	2
			G34830.91	1
G26146	5	3	G26146.1	2
			G26146.2	2
			G26146.4	1
G3061	4	3	G3061.1	1
			G3061.2	1

			G3061.4	2
G12645	4	1	G12645.16	4
G4818	4	2	G4818.56	2
			G4818.77	1
G31051	4	1	G31051.31	4
G6859	4	2	G6859.1	1
			G6859.5	3
G31807	4	2	G31807.1	2
			G31807.2	2
G3888	4	2	G3888.44	3
			G3888.45	1

Tabla S4. Número de regiones metiladas m⁶A en transcritos e isoformas en embriones en el estadio de desarrollo de larva-D mantenidas en condiciones de pH normal y pH acidificado.

Transcrito	Nº regiones metiladas	Nº isoformas	Isoformas	Nº regiones metiladas por isoforma
G14250	9	4	G14250.8	3
			G14250.15	3
			G14250.9	2
			G14250.1	1
G25668	8	3	G25668.8	5
			G25668.28	2
			G25668.26	1
G24405	7	6	G24405.27	2
			G24405.41	1
			G24405.20	1
			G24405.12	1
			9b0702fd-e7ae-450c-8e23-5bda1ed763f4-0	1
			G24405.19	1
G24600	7	4	G24600.6	3
			G24600.12	2
			G24600.5	1
			G24600.2	1
G18614	6	3	G18614.3	6
			G11124.3	5
			ff73117d-446a-4a3b-899e-96d2f177ee5b-0	1
G11124	6	2	G11124.3	5
			ff73117d-446a-4a3b-899e-96d2f177ee5b-0	1
G11116	6	3	c2d12acd-d4c2-4d25-a8c7-7650f659cf09-0	3
			49a3b70e-7cf5-4797-b91e-4e79666be8fd-0	2
			G11116.3	1
MZ497416.1:11544..12255	5	1	MZ497416.1:11544..12255	5
G3054	5	5	G3054.83	1
			G3054.107	1
			G3054.87	1
			G3054.143	1
			G3054.19	1
G27017	5	2	G27017.1	3
			G27017.6	2
G339	5	2	G339.2	4

			G339.1	1
G26146	5	2	G26146.1	3
			G26146.4	2
G11036	5	2	G11036.2	4
			G11036.3	1
G16233	5	4	30963340-a2ea-4d57-a791-b7ca9831839e-0	2
			G16233.11-0	1
			G16233.9	1
			G16233.10	1
G15471	5	2	G15471.2	3
			f27c2f35-253e-486c-bdfa-ff1aa8b69a58-0	2
G10077	5	4	G10077.11	2
			G10077.7	1
			G10077.8	1
			G10077.6	1
G12645	5	1	G12645.16	5
G550	4	2	G550.7	3
			96a38481-cbca-4456-b4f5-bdb414adc8-0	1
G4337	4	2	G4337.7	2
			G4337.3	2
G3773	4	2	G3773.9	2
			G3773.5	2
LR761642.1:36948000	4	2	69394233-e079-431d-97da-7c176d8bef41-0	3
			c20d7ea4-66cf-4fe9-bf5a-bd7e9b925df0-0	1
G29891	4	2	G29891.4	3
			G29891.2	1
G32627	4	3	G32627.5-0	2
			G32627.9	1
			2dc8272d-817c-45c2-a9fd-ca494cd0bba8-0	1
G25027	4	1	G25027.35-0	4
G34830	4	2	G34830.92	2
			G34830.1	2
G20682	4	2	G20682.47	2
			G20682.34	2
G18379	4	3	G18379.1	2
			G18379.19	1
			G18379.18	1
G1851	4	3	G1851.42	2
			G1851.2	1
			G1851.39	1

Tabla S5. Catálogo de transcritos e isoformas con dominios funcionales asociados a la formación de concha en moluscos y que presentan expresión diferencial y diferentes estados de metilación en embriones y larvas de la Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) en condiciones de acidificación de agua de mar. DMR = región con metilación diferencial

ID isoforma	ID transcrito	Blástula			Trocófora			Larva D			Dominio funcional
		Expresión diferencial	Metilación m6A	DMR	Expresión diferencial	Metilación m6A	DMR	Expresión diferencial	Metilación m6A	DMR	
G21656.2	G21656	Si	Si	Si	Si	No	No	No	Si	Si	Leucine Rich repeat
G26146.4	G26146	Si	Si	No	No	Si	No	Si	Si	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G10110.133	G10110	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Tropomyosin
G10885.2	G10885	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Common central domain of tyrosinase
G11008.3	G11008	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Glutathione peroxidase
G11185.1	G11185	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Thrombospondin type 1 domain
G11650.2	G11650	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	IQ calmodulin-binding motif
G12130.1	G12130	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Leucine-rich repeat
G12306.1	G12306	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Ependymin
G12306.2	G12306	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Ependymin
G12448.4	G12448	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Sushi repeat (SCR repeat)

G13592.1	G13592	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Scavenger receptor cysteine-rich domain
G1363.1	G1363	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II association domain
G14061.3	G14061	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF hand
G14061.5	G14061	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	EF hand
G14330.3	G14330	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 ubiquitin protease
G14430.3	G14430	No	Si	Si	No	No	No	No	Si	Si	INTS6/SAGE1/DDX26B/CT45 C-terminus
G1456.20	G1456	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Cytoskeletal-regulatory complex EF hand
G14738.9	G14738	Si	No	No	Si	No	No	No	Si	No	EF-hand domain
G14845.11	G14845	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF-hand domain pair
G1531.24	G1531	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Myosin tail
G15471.2	G15471	No	Si	No	No	Si	No	No	Si	No	Eukaryotic-type carbonic anhydrase
G15721.12	G15721	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 ubiquitin protease
G16325.2	G16325	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	BRICHOS domain
G16819.18	G16819	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	A20-like zinc finger
G16920.21	G16920	No	Si	No	No	Si	Si	No	Si	No	Cathepsin propeptide inhibitor domain (I29)

G17022.3	G17022	No	Si	No	No	Si	No	No	Si	No	WD domain, G-beta repeat
G17434.5	G17434	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Leucine rich repeat
G18109.2	G18109	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Animal haem peroxidase
G18379.1	G18379	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Sperm-tail PG-rich repeat
G189.3	G189	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Laminin G domain
G1940.1	G1940	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No	Complement C1r-like EGF-like
G19480.3	G19480	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Peptidase family M48
G1994.1	G1994	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF-hand domain pair
G20965.1	G20965	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Lipocalin-like domain
G2122.1	G2122	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Leucine-rich repeat
G21249.19	G21249	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	ShK domain-like
G21335.1	G21335	No	No	No	Si	No	No	No	Si	Si	Kazal-type serine protease inhibitor domain
G21656.1	G21656	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Leucine Rich repeat
G22319.2	G22319	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Myosin tail
G22556.1	G22556	No	No	No	No	Si	No	Si	No	No	C-terminus of histone H2A
G23042.10	G23042	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Cofilin/tropomyosin-type actin-binding protein

G23042.7	G23042	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Cofilin/tropomyosin-type actin-binding protein
G23988.18	G23988	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Lipocalin / cytosolic fatty-acid binding protein family
G23989.2	G23989	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Lipocalin / cytosolic fatty-acid binding protein family
G2400.1	G2400	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Tesmin/TSO1-like CXC domain, cysteine-rich domain
G24022.1	G24022	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	PCNA-associated factor histone like domain
G24175.3	G24175	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Chitin binding Peritrophin-A domain
G2442.3	G2442	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	C-terminal region of eIF3h
G24754.1	G24754	No	Si	Si	No	No	No	No	Si	Si	Restriction Enzyme Adenine Methylase Associated
G24845.1	G24845	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	WAP-type (Whey Acidic Protein) 'four-disulfide core'
G24895.1	G24895	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Mitochondrial carrier protein
G24937.3	G24937	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF-hand domain pair
G25087.2	G25087	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
G2552.1	G2552	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No	Glycosyl hydrolases family 18
G25625.3	G25625	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF hand

G25764.2	G25764	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	ADAMTS cysteine-rich domain 2
G26146.1	G26146	No	Si	No	No	Si	No	No	Si	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G26184.1	G26184	No	Si	No	No	Si	Si	No	Si	No	Laminin B (Domain IV)
G26453.1	G26453	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	AMOP domain
G26998.1	G26998	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	EGF-like domain
G27138.3	G27138	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
G27389.1	G27389	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	EF-hand domain pair
G27434.3	G27434	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	KIX domain
G27439.2	G27439	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Leucine-rich repeat
G27516.2	G27516	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Protein-tyrosine phosphatase
G27692.1	G27692	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	PHD-like zinc-binding domain
G27866.14	G27866	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Collagen triple helix repeat (20 copies)

G28384.3	G28384	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Chitin binding Peritrophin-A domain
G28384.8	G28384	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Chitin binding Peritrophin-A domain
G2857.5	G2857	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF-hand domain pair
G2857.8	G2857	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF-hand domain pair
G287.5	G287	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Ependymin
G2907.2	G2907	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Immunoglobulin I-set domain
G30041.1	G30041	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Cofilin/tropomyosin-type actin-binding protein
G30748.8	G30748	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Immunoglobulin domain
G31463.3	G31463	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Trichohyalin-plectin-homology domain
G32545.2	G32545	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF-hand domain pair
G32588.1	G32588	No	Si	No	No	Si	No	No	Si	No	Macroglobulin domain MG3
G32594.1	G32594	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	EF-hand domain pair
G33234.14	G33234	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	von Willebrand factor type D domain
G3343.1	G3343	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/CLD
G339.1	G339	No	No	No	No	Si	No	No	Si	No	linker histone H1 and H5 family
G339.2	G339	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	linker histone H1 and H5 family

G35181.5	G35181	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily
G35224.10	G35224	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	EF-hand domain pair
G5046.2	G5046	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Leucine rich repeat
G5129.9	G5129	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain
G5492.13	G5492	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Spondin-like TSP1 domain
G6498.41	G6498	No	No	No	No	Si	No	No	Si	No	Calponin homology (CH) domain
G661.13	G661	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	C-terminus of histone H2A
G661.5	G661	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	C-terminus of histone H2A
G767.6	G767	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	Mitochondrial calcium uniporter
G7748.1	G7748	No	Si	No	No	No	No	No	Si	No	Neogenin C-terminus
G819.10	G819	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Spectrin repeat
G825.3	G825	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Cop9 signalosome subunit 5 C-terminal domain
G8886.1	G8886	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No	von Willebrand factor type A domain
G1589.1	G1589	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	FIP domain

G26146.2	G26146	No	Si	No	No	Si	No	No	No	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G30550.8	G30550	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	Plasma membrane calcium transporter ATPase C terminal
G3290.9	G3290	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G339.4	G339	No	Si	No	No	Si	No	No	No	No	linker histone H1 and H5 family
G35028.4	G35028	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	Laminin EGF domain
G5794.10	G5794	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/CLD
G6723.1	G6723	No	Si	No	No	Si	No	No	No	No	EGF-like domain
G189.4	G189	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	Laminin G domain
G661.2	G661	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G28071.1	G28071	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Sushi repeat (SCR repeat)
G826.1	G826	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Sec7 domain
G27092.2	G27092	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Leucine Rich repeat
G20231.3	G20231	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Leucine rich repeat
G6723.2	G6723	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Laminin G domain
G16419.1	G16419	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Histone RNA hairpin-binding protein RNA-binding domain
G1565.4	G1565	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Leucine rich repeat
G16419.7	G16419	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Histone RNA hairpin-binding protein RNA-binding domain
G32785.2	G32785	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Animal haem peroxidase
G14430.2	G14430	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	INTS6/SAGE1/DDX26B/CT45 C-terminus
G24022.2	G24022	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	PCNA-associated factor histone like domain

G2012.5	G2012	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	EF-hand
G22502.2	G22502	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Ephrin type-A receptor 2 transmembrane domain
G3339.3	G3339	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Leucine-rich repeat
G3290.14	G3290	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G6765.1	G6765	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Human growth factor-like EGF
G22502.1	G22502	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Ephrin receptor ligand binding domain
G8120.1	G8120	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	Fibronectin type III domain
G2857.3	G2857	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	EF-hand domain pair
G23042.11	G23042	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Cofilin/tropomyosin-type actin-binding protein
G6775.4	G6775	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	EF-hand domain pair
G25087.1	G25087	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	ATP-dependent protease La (LON) substrate-binding domain
G19662.5	G19662	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Histone deacetylase domain
G27649.7	G27649	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G27138.15	G27138	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	EF-hand domain pair
G27358.2	G27358	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Laminin G domain
G4147.1	G4147	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Leucine-rich repeat
G30748.6	G30748	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Immunoglobulin I-set domain
G27891.1	G27891	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	SAM domain (Sterile alpha motif)
G27649.1	G27649	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4
G27649.3	G27649	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Core histone H2A/H2B/H3/H4

G23192.1	G23192	No	Si	Si	No	No	No	No	No	No	Tetratricopeptide repeat
-----------------	--------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	--------------------------

Nota: los dominios funcionales presentes en los transcritos e isoformas se indican en Inglés.