



**Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas**



**Actividades enzimáticas del catabolismo aeróbico y
anaeróbico del nudibranquio *Thecacera darwini* (Pruvot-fol,
1950)**

Jacqueline Alejandra Aravena Reimán

**Seminario de título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**

**Para optar al título de
BIÓLOGA MARINA**

Concepción-Chile 2023

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor(a) Guía

Dr. Renato Quiñones

Profesor(a) Co-Guía

Dr. Rodrigo González

Ha sido aprobada
por la siguiente
Comisión Evaluadora

Dr. Fabian Tapia

Dr. Marcelo Fuentes

Jefe de Carrera

Dr. Ariel Valenzuela

Dedicada a Agustín y Sebastián.

Agradecimientos

Esta tesis debe mucho a mi estimado Profesor Guía Dr. Renato Quiñones Bergeret por confiar en mis ideas y en mí, por brindarme su crucial apoyo científico, orientación, dedicación, criterio, aliento y experiencia en el área; ha hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio contar con su guía y formación académica.

A mi Profesor Co-guía Dr. Rodrigo González Saldía por su sabiduría, consejos y empatía. También deseo agradecerle por sus comentarios, correcciones y sugerencias que me ayudaron a complementar los resultados obtenidos.

Gracias a mi querida Evelyn Martínez, por tu disciplina, tu energía positiva y por entregarme conocimientos fundamentales en el área experimental de laboratorio de esta tesis. Sin ti, este Seminario no habría sido posible. Gracias por tu disposición, compañía y por alentarme a seguir día a día.

A Luis Montecinos, Wilfredo Alarcón, y la Dra. Valeria Anabalón integrantes del Laboratorio de Metabolismo y Ecoalometría del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción, por estar ahí siempre que necesite de su ayuda. Son un gran equipo de trabajo.

Muchas gracias a la Sra. Jessica Cabrera, dueña de la Granja Marina de Coliumo, por permitirnos acceder generosamente a su cultivo, para la obtención de las muestras de *Thecacera darwini* utilizadas en este Seminario de Título.

Quisiera finalmente, agradecer la formación profesional otorgada por los profesores de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas y del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción.

Esta investigación fue financiada por el Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR; Proyecto ANID N°1522A0004)

Índice de contenidos

Resumen	VII
Abstract	VIII
Índice de figuras	IX
Índice de tablas.....	XI
Nomenclatura	XII
1.- Introducción	1
1.1.- Antecedentes generales	1
1.2.- Algunos antecedentes del catabolismo anaeróbico y aeróbico relevante a la presente investigación.....	4
1.3.- Orden nudibranquia	7
1.4.- Objetivos	9
1.5.- Hipótesis	9
2.- Materiales y métodos	10
2.1.- Área de estudio	10
2.2.- Preparación de muestras	10
2.3.- Homogeneización	11
2.4.- Determinación actividad enzimática	11
2.5.- Citrato sintasa (CS)	12
2.6.- Cadena transportadora de electrones (ETS)	13
2.7.- Análisis estadístico	13
3.- Resultados	14
3.1.- Estructura de tallas de las muestras de <i>Thecacera darwini</i>	14
3.2.- Actividad enzimática aeróbica	14

3.3.- Actividad enzimática anaeróbica	14
3.3.1.-Correlación entre las actividades de enzimas vinculadas al metabolismo anaeróbico.....	15
3.4.- Alometría	15
4.- Discusión	16
4.1.- Actividad anaeróbica	17
4.2.- Actividad aeróbica	20
4.4.- Algunas reflexiones sobre la capacidad adaptativa de T. darwini para enfrentar la hipoxia ambiental	21
5.- Conclusión	21
6.- Bibliografía	32

Resumen

Thecacera darwini es un nudibranquio que se encuentra comúnmente en la zona intermareal y submareal en Chile, desde Antofagasta hasta el Estrecho de Magallanes. La distribución geográfica de esta especie sugiere que posee una amplia adaptabilidad fisiológica y bioquímica a la variabilidad ambiental que se observa en los ecosistemas del Sistema de la Corriente de Humboldt, incluyendo la frecuente intrusión de aguas con bajo contenido de oxígeno a la zona costera producida por la surgencia. *T. darwini* es un organismo muy poco estudiado, desconociéndose sus características metabólicas y fisiológicas en cuanto a su tolerancia a la hipoxia ambiental y fisiológica. El principal objetivo abordado en la presente investigación fue determinar la actividad aeróbica potencial y la actividad enzimática anaeróbica de *T. darwini*. La capacidad respiratoria aeróbica se determinó mediante la actividad de la enzima citrato sintasa (CS) y también mediante la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS). La capacidad respiratoria anaeróbica se determinó mediante la actividad de las piruvato oxidoreductasas (Lactato dehidrogenasa, LDH; Opina dehidrogenasa, OPDH; alanopina dehidrogenasa, ALPDH; estrombina dehidrogenasa, STRDH), así como de la actividad de la Etanol dehidrogenasa (EtOHDH) y Malato dehidrogenasa (MDH). Los resultados demuestran la presencia de actividad en todas las enzimas analizadas, además de correlaciones significativas ($p < 0,05$), entre LDH y OPDH, así como entre STRDH y MDH. La MDH presentó también una correlación negativa significativa ($p < 0,05$) con el peso corporal. Los resultados obtenidos indican que *Thecacera darwini* es un organismo que posee la capacidad catabólica para enfrentar eventos de hipoxia ambiental, no obstante, esta disminuye a medida que se incrementa el peso del organismo.

Palabras clave: Nudibranquio, Hipoxia, Piruvato oxidoreductasas, Respiración, Metabolismo anaeróbico.

Abstract

Thecacera darwini is a nudibranch commonly found in the intertidal and subtidal zone in Chile, from Antofagasta to the Strait of Magellan. The geographic distribution of this species suggests that it has a wide physiological and biochemical adaptability to the environmental variability observed in the coastal ecosystems of the Humboldt Current System, including the intrusion of waters with low oxygen content into the coastal zone produced by upwelling. *T. darwini* is an organism scarcely studied; its metabolic and physiological characteristics are unknown in terms of its tolerance to environmental and physiological hypoxia. The main objective of this investigation was to determine the potential aerobic activity and the anaerobic enzymatic activity of *T. darwini*. Aerobic respiratory capacity was determined by the enzymatic activity of citrate synthase (CS) and by the activity of the Electron Transport System (ETS). Anaerobic catabolism capacity was determined by the activity of pyruvate oxidoreductases (Lactate dehydrogenase, LDH; Opine dehydrogenase, OPDH; Alanopine dehydrogenase, ALPDH; Strombin dehydrogenase, STRDH), as well as the activity of Ethanol dehydrogenase (EtOHDH) and Malate dehydrogenase. (MDH). The results demonstrate the presence of activity in all the enzymes analyzed, in addition to significant correlations ($p < 0.05$), between LDH and OPDH, as well as between STRDH and MDH. MDH also had a significantly negative correlation ($p < 0.05$) with body weight. The results indicate that *Thecacera darwini* is an organism that has the catabolic capacity to cope with environmental hypoxia events, however, this capacity decreases with body size.

Keywords: Nudibranch, Hypoxia, Pyruvate oxidoreductases, Respiration, Anaerobic metabolism

Índice de figuras

- Figura 1: Reacciones catalizadas por la actividad de MDH y su unión con las reacciones de transaminación y el equilibrio de NADH entre el citoplasma y la matriz mitocondrial, obtenida de Nelson y Cox, (2000).
- Figura 2: Fotografía de ejemplares de *Thecacera darwini*.
- Figura 3: Ubicación del área de obtención de muestras de *Thecacera darwini* en la Granja Marina de Coliumo (36°32'12.3' S, 72°57'10.2' W). En rojo se indica la zona de recolección.
- Figura 4: Histograma de frecuencia del peso (g) de las muestras de *Thecacera darwini* (n=30).
- Figura 5: Actividades enzimáticas promedio de citrato sintasa (CS = $\mu\text{mol DTNBmin}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$) y actividad potencial promedio del sistema transportador de electrones (ETS = $\mu\text{l O}_2 \text{h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$) en el nudibranquio *Thecacera darwini*. Las barras en el grafico indican la desviación estándar.
- Figura 6: Actividades enzimáticas promedio en el nudibranquio *Thecacera darwini*, Lactato dehidrogenasa (LDH), octopina dehidrogenasa (OPDH), alanopina dehidrogenasa (ALPDH), strombina dehidrogenasa (STRDH), etanol dehidrogenasa (EtOHDH) no se considera la actividad de malato dehidrogenasa (MDH) ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$). Las barras en el gráfico indican la desviación estándar.
- Figura 7: Actividades enzimáticas promedio analizadas en el nudibranquio *Thecacera darwini*, Lactato dehidrogenasa (LDH), octopina dehidrogenasa (OPDH), alanopina dehidrogenasa (ALPDH), strombina dehidrogenasa (STRDH), etanol dehidrogenasa (EtOHDH) y Malato dehidrogenasa (MDH) ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$), las barras de error en el grafico indican la desviación estándar.
- Figura 8: Grafico de dispersión de las regresiones lineales enzimáticas significativas ($p < 0,05$) en el nudibranquio *Thecacera dariwni* en $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$, a) correlación OPDH/LDH ($p < 0,000$), b) correlación

STRDH/LDH ($p < 0,000$), c) correlación MDH/LDH ($p < 0,006$), d) correlación STRDH/OPDH ($p < 0,012$), e) correlación STRDH/ALPDH ($p < 0,008$), f) correlación EtOHDH/ALPDH ($p < 0,000$).

Figura 9: Grafico de dispersión de la regresión lineal significativa de ALPDH/OPDH logarítmica de *Thecacera darwini* ($p < 0,024$) en $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

Figura 10: Grafico de dispersión de la regresión lineal significativa entre MDH/Peso g logarítmico de *Thecacera darwini* ($p < 0,029$) en $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

Figura 11: Grafico de dispersión de la regresión lineal logarítmica MDH-ALPDH/Peso g ($p < 0,015$) de *Thecacera darwini*.

Índice de Tablas

Tabla 1: Relación Malato dehidrogenasa (MDH = $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$) entre las Piruvato oxidorreductasa (POR's = $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$) y el peso g de *Thecacera darwini*.

Nomenclatura

AESS	Aguas ecuatoriales subsuperficiales
ATP-P	Adenosintrifosfato particulado
CS	Citrato sintasa
DTNB	Reactivo de Ellman
ETS	Sistema de transporte de electrones
LDH	Lactato dehidrogenasa
OPDH	Octopina dehidrogenasa
ALPDH	Alanopina dehidrogenasa
STRDH	Strombina dehidrogenasa
EtOHDH	Etanol dehidrogenasa
MDH	Malato dehidrogenasa
NADH	Nicotianamina adenina dinucleótido reducido
SCH	Sistema de la corriente de Humboldt
ZMO	Zonas de mínimo oxígeno
POR's	Piruvato oxidorreductasas

1.- Introducción

1.1 Antecedentes generales

Uno de los temas menos visibilizados del impacto del cambio climático global es la desoxigenación de los océanos. La expansión de las regiones hipóxicas en el océano global ha incrementado notoriamente en las últimas décadas (Díaz y Rosenberg 2008, Stramma *et al.*, 2010), incluyendo los sistemas de borde oriental (Keelin *et al.*, 2010; Laffoley, 2019). Los océanos han perdido alrededor de un 2% de su oxígeno disuelto desde la década de 1950 y se espera que pierdan aproximadamente un 3-4% de oxígeno disuelto para el año 2100, bajo un escenario de evolución sin cambios, aunque la escala de efectos puede variar regionalmente (Laffoley, 2019).

La expansión de las zonas hipóxicas puede deberse a cambios de origen antropogénico como la eutroficación (ej. residuos industriales y domiciliarios, aporte de nutrientes por actividades agrícolas, etc.), de origen natural (ej. aumento de la producción primaria), y por el calentamiento global de los océanos producidos por el efecto invernadero (Laffoley, 2019). La desoxigenación de los océanos puede alterar la función y estructura de los ecosistemas marinos (Grantha *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2008; Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008), viéndose reflejado principalmente en cambios en los ciclos biogeoquímicos, cambios en tasas metabólicas de organismos marinos, alteraciones del acoplamiento bento-pelágico y cambios en la producción pesquera, entre otros (Levin, 2003; Paulmier *et al.*, 2008; Ekau *et al.*, 2010; Keeling *et al.*, 2010; Stramma *et al.*, 2010; Seibel, 2011; Wishner *et al.*, 2013).

Las Zonas de Mínimo Oxígeno (ZMO) se definen como regiones donde las concentraciones de oxígeno son inferiores a 0,5 ml L⁻¹, y normalmente se encuentran en zonas intermedias de la columna de agua, a profundidades entre 100 a 1300m (Levin, 2003). Una importante ZMO existe en el Sistema de la Corriente de Humboldt (SCH) (Fuenzalida *et al.*, 2009), el que ha sido

caracterizado como una de las áreas de mayor productividad primaria en el mundo (Thomas *et al.*, 1994; González *et al.*, 1998; Montecinos *et al.*, 1998; Daneri *et al.*, 2000) y por presentar una amplia zona subsuperficial con muy bajas concentraciones de oxígeno (Sievers y Silva, 1975; Silva y Neshyba, 1979; Quiñones *et al.*, 2010). El alto nivel de productividad es inducido principalmente por la surgencia costera forzada por el viento (e.g. Arcos y Navarro, 1986; Fonseca y Farías, 1987).

En el Sistema de la Corriente de Humboldt, la ZMO se extiende a lo largo de la costa, sobre la plataforma continental y el talud (Alheit y Bernal, 1993) y el agua ecuatorial subsuperficial que la compone, es transportada en dirección sur por la Contracorriente de Günther (Brandhorst, 1971; Silva, 1981; Pizarro-Koch *et al.* 2019). Más precisamente, la información disponible sobre la extensión de la ZMO frente a Chile establece que, en el norte, esta puede ser encontrada a profundidades menores de 50 m (Morales *et al.*, 1996; Valdés *et al.*, 2021) y en el área de Concepción (área centro sur de Chile), ha sido descrita asociada a amplias áreas de la plataforma y próximas al fondo ($< 1 \text{ mL O}_2/\text{L}$), que son estacionalmente expuestas a la condición de bajo oxígeno (Ahumada y Chuecas, 1979; Ahumada, 1989). Hacia el sur, la ZMO se hace más débil, por cuanto aumenta el contenido de oxígeno y se profundiza llegando a los 250 m (Grados, 1989).

La ZMO presente en el sistema de la Corriente de Humboldt constituye una de las más grandes de los océanos (Levin, 2003; Quiñones *et al.*, 2009; Fuenzalida *et al.*, 2009) caracterizándose por ser parte de una de las áreas de mayor productividad primaria en el mundo (Thomas *et al.*, 1994, González *et al.*, 1998; Montecinos *et al.*, 1998) y una barrera importante para la distribución vertical de los organismos marinos (White, 1988; Eissler y Quiñones, 1999; Escribano y Hidalgo, 2000; González y Quiñones 2000, 2002; Ulloa *et al.*, 2001, Gallardo *et*

al., 2004). Generalmente, la aparición de condiciones de bajo oxígeno (<1 ml L⁻¹) más superficiales se incrementa a principios de primavera y disminuye en otoño (Ahumada *et al.*, 1983; Hernández- Miranda *et al.*, 2010).

Los estudios sobre la actividad biológica asociada a la ZMO han estado centrados principalmente en zonas más superficiales sobre la oxiclina. Esta ha sido descrita como un sitio de alta actividad biológica y biogeoquímica; no obstante, se ha mencionado que algunos organismos deben estar adaptados a las condiciones extremas de bajo oxígeno, como las existentes en el núcleo de la ZMO (Wishner *et al.*, 1995). En este contexto, los organismos que permanecen o migran a través de áreas donde existe una ZMO, deben presentar adaptaciones bioquímicas que reflejan metabólicamente la presencia del gradiente ambiental de oxígeno (González y Quiñones, 2002). Estas adaptaciones, en términos energéticos, apuntan hacia el uso de vías catabólicas anaeróbicas (González y Quiñones, 2000).

La biodiversidad que se encuentra asociada de manera permanente o semipermanente a zonas hipóxicas debe estar adaptada a la baja disponibilidad de oxígeno (Childress y Siebel, 1998) utilizando varias estrategias, tales como como: (i) una incorporación de oxígeno más efectiva, (ii) demandas metabólicas reducidas y (iii) uso del metabolismo anaeróbico (Childress y Siebel, 1998). En este último caso los taxa que presentan la capacidad de realizar metabolismo anaeróbico, pueden sobrevivir a condiciones de hipoxia por largos periodos de tiempo (González y Quiñones, 2000).

1.2 Algunos antecedentes del catabolismo anaeróbico y aeróbico relevantes a la presente investigación

La historia y evidencia del estado primigenio de nuestro planeta indican que ocurrió bajo condiciones altamente reducidas (Walker, 1981; Lyons et al., 2014). Esto sugiere, tanto la ausencia de oxígeno molecular en la atmósfera primitiva, así como también, la antigüedad de la aparición del catabolismo anaeróbico para la producción de energía al interior de la célula (Hochachka y Somero, 1984). La conservación de la información en el genoma que codifica para este tipo de catabolismo durante la transición, desde una atmósfera anóxica hasta la actual existencia esencialmente basada en el oxígeno, sugiere la importancia del catabolismo anaeróbico involucrado en la plasticidad metabólica requerida para enfrentar un gradiente redox ambiental y/o fisiológico (Livingstone, 1983). El catabolismo corresponde al eje del flujo energético termodinámicamente favorecido y que se expresa como un valor característico (actividad) de las vías metabólicas que lo conforman (Nelson y Cox, 2000). En términos biogeoquímicos, la actividad enzimática corresponde al proceso iterativo, que cinéticamente es responsable de la distribución de los compuestos orgánicos y de muchos equilibrios redox que involucran elementos traza en el océano (Libes, 1992). Sobre las vías metabólicas que participan en el catabolismo y en particular, con respecto a la actividad enzimática del catabolismo anaeróbico, la vía del lactato y las opinas han sido caracterizadas de manera general, como la actividad de las piruvato oxidorreductasas (POR's). Estas, en conjunto con la actividad de etanol dehidrogenasa (EToHDH), son definidas como las vías fermentativas en procariontes y metazoarios (Gottschalk, 1978; Hochachka y Somero, 1984). La fermentación también define los procesos catabólicos que no involucran cadenas respiratorias con oxígeno, nitrato, sulfato o fumarato como aceptor final de electrones (Hochachka y Somero, 1984; Fenchel y Finlay, 1995; Moat et al. 2002).

Los organismos capaces de utilizar alguno de los elementos de la cadena transportadora de electrones en ausencia de oxígeno molecular, son clasificados como anaerobios facultativos y el proceso se denomina “respiración anaeróbica” (Fenchel y Finlay, 1995). También, como elementos del catabolismo celular, las dos isoenzimas conocidas de la malato dehidrogenasa (MDH) en eucariontes, están involucradas en varias reacciones del metabolismo energético (Lehninger, 1975). Ambas isoenzimas comparten la función de intercambio de electrones desde el citoplasma a la matriz mitocondrial y viceversa. La isoenzima citoplasmática (c-MDH), intercambia equivalentes de electrones desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial, vía reducción de oxalacetato a malato en presencia de NADH. El malato, que puede difundir a través de la membrana mitocondrial, en el interior de la matriz es oxidado nuevamente a oxalacetato por la isoenzima mitocondrial (m-MDH). El retorno del oxalacetato hacia el citoplasma es vía su transformación a aspartato, lo que une la actividad de MDH a las reacciones de transaminación (Figura 1; detalles en Nelson y Cox, 2000). La regulación de este proceso es clave para mantener el balance redox intracelular durante el catabolismo anaeróbico intenso (alta tasa catabólica), de manera similar a la captura de electrones en los productos de las vías fermentativas (Hochachka y Somero, 1984).

En cuanto al catabolismo aeróbico, la actividad de citrato sintasa (CS) se ubica al inicio del ciclo del ácido cítrico. CS cataliza la formación de citrato a partir de acetyl-CoA y oxalacetato. Este es un importante sitio de regulación en el ciclo de Krebs, por lo que su actividad ha sido utilizada como un índice cuantitativo de esta vía metabólica (Lehninger, 1975). Entre las vías del piruvato oxidorreductasa (POR's), la más común en el reino animal es la vía del lactato, caracterizada por el uso de un solo sustrato (piruvato) y la generación de un último producto (lactato) utilizando depósitos endógenos de energía (glucógeno). Además de la

vía del lactato, también existe la vía de las opinas que requiere dos sustratos (piruvato + aminoácido; aminoácido=arginina, alanina o glicina), produciendo un solo producto (octopina, alanopina o estrombina, respectivamente) (Lehninger, 1975). La dependencia de las vías de las opinas de dos sustratos podría generar, teóricamente, un potencial energético menor en comparación con la vía del lactato (Livingstone, 1983). En relación con los productos finales de estas rutas metabólicas, el lactato es 20 veces más ácido que la octopina (Zammit, 1978).

El análisis de enzimas involucradas en la respiración anaeróbica, se utiliza como un enfoque para evaluar el grado de dependencia respecto del metabolismo anaeróbico de especies que habitan zonas expuestas a eventos o periodos de hipoxia (Childress y Seibel, 1998).

Todas las actividades enzimáticas descritas anteriormente, están involucradas en el catabolismo celular, desde la fermentación pura, hasta la utilización de la cadena transportadora de electrones (ETS). La moneda común entre ellas es la utilización como co-sustrato del par redox NADH (especie reducida) /NAD⁺(especie oxidada), el que está íntimamente involucrado en la transformación de energía al interior de la célula. La excepción al uso directo del par redox NADH/NAD⁺ en las reacciones catalizadas por las enzimas antes descritas, corresponde a la reacción catalizada por CS. Esta enzima se relaciona indirectamente con par redox NADH/NAD⁺, a través de uso del oxalacetato que provee parte del esqueleto carbonado para la síntesis de citrato en la matriz mitocondrial (González, 2002). En el Sistema de la Corriente de Humboldt, los estudios relacionados al catabolismo anaeróbico se han centrado en la adaptación de los organismos pelágicos (González y Quiñones, 2002; 2009) y bentónicos (González y Quiñones, 2000) a condiciones de hipoxia. En este contexto, la actividad enzimática anaeróbica en especies del orden nudibranchia presentes en las costas del Sistema de la Corriente de Humboldt no ha sido

previamente estudiado. De hecho, el catabolismo anaeróbico de nudibranchia a nivel mundial, ha sido objeto de escasos estudios (Caldwell y Donovan, 2003).

1.3 Orden Nudibranchia

Los nudibranchios, comúnmente llamados babosas de mar, se agrupan en un único orden del Phylum Mollusca, dentro de la subclase Opisthobranchia de la clase gastropoda (Meléndez, 1982). Conforman el Orden Nudibranchia, el cual agrupa alrededor de 6000 especies (Behrens, 1991; Hermsillo *et al.*, 2005). La principal característica de este Orden, es estar formado por animales que han sufrido un proceso de detorsión, al ir perdiendo la concha y la limitación que supone su abertura, de esta manera han ido adquiriendo una simetría bilateral secundaria (Gosliner, 1994; Mikkelsen, 1998). En el caso de los nudibranchios, la concha llega a desaparecer por completo durante la metamorfosis larvaria y, por tanto, también la cavidad paleal, cuya desaparición implica dejar las branquias sin protección, desnudas, de aquí su nombre “nudibranchios” (branquias al desnudo) (Herrero, 2015). Los nudibranchios se encuentran en todos los ecosistemas marinos y, aunque no suelen ser encontrados normalmente en ambientes extremos, se han descrito varios géneros a profundidades superiores a los 3000 m, y uno de ellos en fuentes hidrotermales (Valdés, 1998).

La capacidad de los nudibranchios de producir sustancias químicas, ha despertado el interés de su uso para fines medicinales desde la época de los romanos. Así, muchos de los productos químicos naturales sintetizados por los opisthobranchios como las prostaglandinas, productos antibacterianos, fungicidas, entre otros, son actualmente utilizados en farmacología y biotecnología (Flam, 1994).

El estudio de los nudibranquios no ha sido prolífico, como es el caso de otros gasterópodos, pero en la última década, gracias a la tecnología, fotografía y buceo submarino, se ha despertado un mayor interés en ellos.

El presente Seminario de Título, busca aportar al conocimiento de este interesante y poco estudiado taxón, mediante la determinación de la capacidad metabólica de la especie *Thecacera darwini* para enfrentar la hipoxia ambiental.

Thecacera darwini (Figura 2) es un nudibranquio que tiene el cuerpo alargado, es de color blanco transparente con puntos negros, en la punta de la cola y las branquias su color es anaranjado (Schroedl, 2003). Presenta un par de proyecciones digitiformes dorsales detrás de las branquias, pliegues de rinoforos lobulados anaranjados, y 5 ramos branquiales. *T. darwini* se distribuye desde Antofagasta (balneario Juan López) hasta el Estrecho de Magallanes, siendo abundante en paredones de roca en la zona intermareal y submareal alcanzando 12 metros de profundidad (Zagal y Hermozilla, 2007). Se alimenta del briozoo *Baenia magallanica*, esta especie se puede encontrar hasta un tamaño de 4,5cm de largo (Schroedl, 2003). La ubicación geográfica de esta especie, sugiere que debería tener una amplia capacidad metabólica para enfrentar las condiciones de hipoxia ambiental que se observan en distintos grados de frecuencia e intensidad en las costas de la zona centro sur de Chile (ej. Hernández- Miranda *et al.*, 2010, 2012; Hernández y Tapia, 2021).

1.4 Objetivos

1.- Determinar la actividad enzimática aeróbica potencial del nudibranquio *Thecacera darwini*.

2.- Determinar la actividad enzimática anaeróbica del nudibranquio *Thecacera darwini*.

1.5 Hipótesis de trabajo

Hipótesis 1: El nudibranquio *Thecacera darwini* posee capacidades de tolerancia a la hipoxia mediante la actividad de enzimas que participan en la respiración anaeróbica.

Hipótesis 2: Debido a la dependencia de la pared corporal para el intercambio gaseoso, la actividad aeróbica específica de *Thecacera darwini* es inferior a la de otros moluscos no nudibranquios.

2.- Materiales y métodos

2.1.- Área de estudio

Los ejemplares de *Thecacera darwini* fueron obtenidos en Bahía Coliumo (36°32'12.3' S, 72°57'10.2 W'; Figura 3), en la zona centro sur de Chile, específicamente en el centro de mitilicultura llamado "Granja Marina Coliumo".

Treinta y dos ejemplares de *T. darwini* fueron recolectados el 11 de noviembre del 2022, en las cajas y cuelgas de la granja, la cual está localizada a unos 200 m de la costa, aproximadamente. Las cuelgas y cajas se removieron del agua y los especímenes se recolectaron manualmente en baldes con agua de mar del lugar, de forma muy cuidadosa y utilizando guantes de nitrilo, debido a la toxicidad de los nudibranchios. Los ejemplares estaban originalmente localizados entre 2 y 4 metros de profundidad.

2.2.- Preparación de muestras

Los ejemplares obtenidos fueron llevados rápidamente a tierra, donde se había habilitado con anterioridad una zona experimental para el registro del peso con balanza analítica (peso en g). Inmediatamente después del pesado, cada espécimen fue almacenado con pinzas en crioviales de 5 ml y mantenidos en nitrógeno líquido (-190°C).

Además, se fijaron especímenes de *Thecacera darwini* con alcohol al 70% en frascos de vidrio de borosilicato de 50ml. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Metabolismo y Ecoalometría del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción, donde se realizó la fase experimental.

2.3.- Homogenización

El tampón de homogenización contenía 400 mM tampón fosfato (K₂HPO₄), pH 7.9, 1 mM ditioneitol (DTT), 0.3% (peso/vol) polivinil pirrolidona (PVP), 5mM EDTA, 0.1% (vol/vol) Triton X-100, 3% (peso/vol) Sero Albúmina de Bovino (BSA) basado de Packard *et al.*,1971. Las muestras fueron homogenizadas mediante un Ultra-Turrax siempre manteniendo la cadena de frío en todo el procedimiento (-20°C). La cantidad de solución tampón que se agregó a cada muestra, se calculó utilizando un factor de dilución de 1:20, se utilizó el organismo completo, realizando tres subreplicas por muestra (i.e. por triplicado). Los homogeneizados se centrifugaron a 5000 x g durante 5 minutos a 4°C. Una parte del sobrenadante se utilizó para la medición del sistema de transporte de electrones (ETS) y el resto para la determinación de la actividad enzimática aeróbica y anaeróbica.

2.4.- Determinación actividad enzimática

Las enzimas analizadas fueron: piruvato oxidoreductasas (POR's): lactato dehidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), octopina dehidrogenasa (OPDH, EC 1.5.1.15), alanopina dehidrogenasa (ALPDH, EC 1.5.1.17), strombina dehidrogenasa (STRDH, EC 1.5.1.22), Etanol dehidrogenasa (EtOHDH, EC 1.1.1.1). Todas las actividades se expresaron como actividades específicas aparentes en $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso húmedo (UI g^{-1} peso húmedo).

Las actividades de las POR's (LDH, OPDH, ALPDH y STRDH) fueron medidas utilizando una mezcla de reacción modificada desde el método de Schiedek (1997). Se utilizó tampón 400mM K₂HPO₄ (pH 7.9 a 20°C), 0.1 mM NADH. Se le agregó 3.2 mM de piruvato para LDH, 3.2 mM piruvato y 27 mM arginina para OPDH, 3.2 mM piruvato y 1250 mM de alanina para ALPDH, y 3.2 mM piruvato y 1250 mM glicina para STRDH. Las reacciones se iniciaron con la adición de una alícuota de sobrenadante (50 μ , 50 μ , 25 μ , 25 μ , 50 μ y 50 μ , respectivamente para

LDH, OPDH, ALPDH, STRDH, EtOHDH y MDH) donde se midió el decaimiento de la absorción de NADH (nicotianamina adenina dinucleótido) a 340 nm en un espectrofotómetro. Todas las actividades fueron corregidas por el coeficiente de extinción del NADH.

La actividad de etanol deshidrogenasa (EtOHDH), se determinó con una mezcla de reacción que contenía 400 mM de tampón K₂HPO₄, pH 7.9 a 20 °C, 0.1 mM NADH y 3.2 mM de acetaldehído. Las reacciones se iniciaron con la adición de una alícuota de sobrenadante (25µ), y se midió el decaimiento de la absorción de NADH a 340nm en el espectrofotómetro. Todas las actividades fueron corregidas por el coeficiente de extinción del NADH.

La actividad de L-malato deshidrogenasa (MDH), se determinó utilizando una modificación del método descrito por Childress y Somero (1979) y Vetter et al. (1994). La mezcla de reacción contenía 400 mM de tampón K₂HPO₄, pH 7.9 a 20 °C, 0.1 mM NADH, 1.5 mM MgCl₂ • 6H₂O, 0.1 mM de NADH y 0.2 mM oxalacetato. Las reacciones se iniciaron con la adición de una alícuota de sobrenadante y se midió el decaimiento de la absorción de NADH a 340 nm. La actividad de MDH fue corregida por el coeficiente de extinción del NADH.

2.5 Citrato sintasa (CS)

La actividad de la enzima citrato sintasa (CS) se determinó utilizando una versión modificada del método de Childress y Somero (1979), y Vetter *et al.* (1994). La mezcla de reacción contenía 500 mM imidazol/HCl (pH 8.0 a 20° C), 1.5 mM MgCl₂ • 6H₂O, 0.1 mM de ácido 5.5 ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), 0,06 mM acetylCoA y 32 mM oxalacetato. El sobrenadante se adicionó al medio de incubación a 20°C por 20min, luego se añadió el oxalacetato 0,2mM y se midió la absorbancia de CS a una longitud de onda de 412 nm en el espectrofotómetro.

Todas las actividades fueron corregidas por el coeficiente de extinción del DTNB. La CS fue expresada en $\mu\text{mol DTNB min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{ww}$.

2.6 Cadena transportadora de electrones (ETS)

La actividad potencial de la cadena transportadora de electrones se determinó mediante la técnica ETS propuesta por Packard (1969, 1985) y Packard *et al.* (1971). Este es un método enzimático indirecto, utilizado para estimar la tasa de consumo de oxígeno como expresión de la máxima actividad potencial del transporte de electrones en la cadena respiratoria a nivel mitocondrial. Cada muestra se analizó por triplicado. Se agregó el sobrenadante (250 μL) para los análisis de control y test y luego se incubó por 20 minutos a 20°C en oscuridad; se agregó solución de paro (125 μL) bajo campana y finalmente se midió la absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro. La unidad utilizada para la actividad de ETS son $\mu\text{L O}_2 \text{h}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ww}$.

2.7 Análisis estadístico

Se utilizó el método de correlación de Pearson (Zar, 1984), y análisis de regresión lineal mediante el programa Minitab statistical software.

3.- Resultados

3.1 Estructura de tallas de las muestras de *Thecacera darwini*

Los especímenes de *Thecacera darwini* se encontraban en buenas condiciones el día de su recolección, permaneciendo activos hasta su crio-preservación. Se recolectó un total de 32 individuos, 30 utilizados en los experimentos para determinar la actividad enzimática y del ETS, y 2 fijados en alcohol al 70% para confirmación taxonómica. El peso corporal varió entre los 0,1136 y 1,127g, la frecuencia más alta con relación al peso, fue de 15 organismos que pesaban entre los 0,200-0,400g (Figura 4, ver Anexo 1).

3.2 Actividad enzimática aeróbica

La actividad de CS varió entre los 0,19 y 1,15 $\mu\text{mol DTNBmin}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$ (Figura 5) y no presentó asociación con el peso corporal, ni con las demás enzimas analizadas ($p > 0,05$).

En cuanto a la ETS, su actividad varió entre los 0,86 y 3,37 $\mu\text{l O}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$, teniendo *T. darwini* una actividad promedio de 2,47 $\mu\text{l O}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$ (Figura 5). ETS presenta una correlación negativa para ETS-ALPDH ($p < 0,005$) y ETS-EtOHDH ($p < 0,05$).

Por otra parte, no se encontró una correlación significativa entre CS y ETS ($p > 0,05$).

3.3 Actividad enzimática anaeróbica

La determinación de actividad enzimática anaeróbica en los ejemplares muestreados desde el ambiente, muestran la existencia de actividad para todas las enzimas del catabolismo anaeróbico ensayadas en *Thecacera darwini*. La actividad de LDH fue significativamente mayor ($p < 0,05$), que el resto de las POR (Figura 6). No obstante, las PORs en su conjunto son al menos un orden de magnitud menor que la actividad de MDH (Figura 7).

3.3.1 Correlación entre las actividades de enzimas vinculadas al metabolismo anaeróbico

Se encontraron correlaciones significativas entre las siguientes enzimas: OPDH/LDH ($p < 0,000$, Figura 8a), STRDH/LDH ($p < 0,000$, Figura 8b), MDH/LDH ($p < 0,006$, Figura 8c), STRDH/OPDH ($p < 0,012$, Figura 8d), STRDH/ALPDH ($p < 0,008$, Figura 8e) y EtOHDH/ALPDH ($p < 0,000$, Figura 8f).

La correlación entre las actividades enzimáticas, calculada previa transformación logarítmica en base 10, evidenció que las actividades de ALPDH y OPDH presentan una correlación positiva significativa ($p = 0,024$) (Figura 9).

3.4 Alometría

No se encontró ninguna correlación entre el tamaño corporal (peso) y la actividad de las enzimas aeróbicas y anaeróbicas analizadas, con excepción de la relación negativa entre la MDH y el peso corporal (Log-Log) ($p < 0,05$; $r^2 = 0,16$; Figura 10). Así también la razón MDH/ALPDH correlaciona negativamente ($r^2 = 0,19$; $p < 0,05$) con el peso (Figura 11).

4.- Discusión

Los grandes sistemas de borde oriental, como es el caso del Sistema de la Corriente de Humboldt frente a las costas de Chile, son afectados de forma natural por hipoxia producida por la surgencia costera (Díaz y Rosenberg, 2008; García-Reyes et al., 2015).

El Sistema de la Corriente de Humboldt, presenta una alta variabilidad costera, en cuanto a temperatura y concentración de oxígeno en la columna de agua, especialmente influenciados por eventos de surgencia que transportan hacia la superficie agua ecuatorial subsuperficial fría, rica en nutrientes, pero pobre en contenido de oxígeno (Thiel et al., 2007; Quiñones et al., 2010). Cabe destacar, que la temperatura regula tasas de procesos ecológicos que son determinantes para el funcionamiento del océano, desde el nivel celular hasta el ecosistémico (Bruno et al. 2015).

Existe evidencia de que la hipoxia puede afectar las tasas de mortalidad y otras variables ecológicas críticas (ej. predación, alimentación) en especies de nudibranchia (Sagasti et al., 2001), así como también la sobrevivencia de huevos (Moran y Woods 2010). Por otra parte, la respuesta de nudibranchia a cambios en la temperatura ambiental puede ser compleja, donde la plasticidad a la tolerancia al calor (“heat tolerance plasticity”) está negativamente correlacionada con la tolerancia inherente al calor (“inherent heat tolerance”) (Armstrong et al., 2009). En consecuencia, se infiere que especies de nudibranchia que habitan en sistemas costeros, que presentan alta variabilidad en cuanto a la temperatura y el contenido de oxígeno en la columna de agua, como es el caso del sistema de surgencia de la costa centro sur de Chile (De La Maza y Farías, 2023), debieran presentar algún tipo de adaptación (ej. metabólica, fisiológica, morfológica o conductual) para poder sobrevivir en este cambiante hábitat.

4.1 Actividad anaeróbica

La presencia de actividad enzimática en todas las POR's ensayadas, más la EtOHDH, indica que *Thecacera darwini* posee varias alternativas catabólicas para resistir condiciones ambientales hipóxicas (Figuras 6 y 7). Este resultado es consistente con el planteamiento general de que, a mayor número de estas enzimas en un organismo acuático, mayor es su capacidad metabólica para enfrentar condiciones de hipoxia (Grieshaber *et al.*, 1994; González y Quiñones, 2000).

Livingstone *et al.* (1983) midió la actividad de las POR's en los nudibranquios *Aeolidia papillosa*, *Jorunna tormentosa* y *Goniodoris nodosa*, donde se detectó actividad de LDH Y MDH para las tres especies, siendo *J. tormentosa* y *G. nodosa* (0,47 UI g⁻¹ww y 0,52 UI g⁻¹ww, respectivamente), un orden de magnitud menor para la actividad de LDH, en comparación con *T. darwini*. No obstante, *Aeolidia papillosa* posee una actividad promedio de LDH de 3.54 UI g⁻¹ww, la que se encuentra en el mismo orden de magnitud que *T. darwini*. Las tres especies anteriores no presentaron actividad de las opinas dehidrogenasas.

Así también, el nudibranquio *Melibe leonina* (Caldwell y Donovan, 2003), a diferencia de lo observado en el presente trabajo con *T. darwini*, no posee actividad de opinas dehidrogenasas. Por otra parte *M. leonina* presentó una actividad de LDH promedio de 0,23 UI g⁻¹ww, que corresponde a un orden de magnitud menor a la actividad determinada en *T. darwini* (1,02 ± 0,49 UI g⁻¹ww). No obstante, se debe considerar que *M. leonina* (10 cm de largo aprox.), presenta un tamaño corporal alrededor de 10 veces mayor que *T. darwini* (1cm de largo aprox.), lo que no sería consistente con el principio alométrico descrito para la LDH que establece que a mayor tamaño mayor actividad de esta enzima (Goolish, 1991). En consecuencia, *T. darwini* podría enfrentar comparativamente

mejor condiciones ambientales hipóxicas que *M. leonina*, ya que no solo tienen una mayor actividad de LDH por gramo de tejido que *M. leonina*, sino que también posee el resto de la “batería” enzimática de las POR's, las cuales no fueron encontradas en *M. leonina*.

La actividad promedio de EtOHDH en *T. darwini*, se encuentra en el mismo orden de magnitud que para el poliqueto bentónico *Hyalinoecia artifex* (Jessen *et al.*, 2009). Si bien la actividad de EtOHDH es baja en ambas especies, esta enzima se suma a la batería de enzimas presentes en *T. darwini* para enfrentar las condiciones de hipoxia ambiental, ya que la presencia de un mayor número de enzimas permitiría una mejor adaptación a las condiciones de hipoxia (Grieshaber *et al.*, 1994).

Con respecto a otros moluscos que habitan en Chile, los valores aquí reportados para LDH, OPDH, ALPDH y STRDH están en el mismo rango a los informados por Grandon *et al.*, (2008) para el bivalvo de agua dulce *Diplodon chilensis*, el que posee una gran adaptación a las condiciones de hipoxia ambiental. En este molusco, también se ha descrito una correlación positiva entre la actividad de la LDH y MDH en organismos expuestos a condiciones de anoxia experimental por más de un mes (Grandon *et al.*, 2008).

La MDH es una enzima que mantiene el balance redox entre el citoplasma y la matriz mitocondrial durante el catabolismo anaeróbico intenso (Hochachka y Somero, 1984). De las dehidrogenasas determinadas en el presente trabajo, MDH es la que presenta la mayor actividad (Figura 7), no obstante, la actividad de MDH es a lo menos un orden de magnitud menor que la determinada en *D. chilensis* (Grandon *et al.*, 2008). A pesar de que ambos organismos pertenecen a la clase molusca, *D. chilensis* es un organismo sésil, en contraste a los nudibranquios que pueden nadar por combinación de ondas musculares y el

desplazamiento de los cilios del pie (Herrero, 2015), lo que implica que puede desplazarse en la columna de agua y buscar condiciones más favorables para enfrentar la hipoxia ambiental.

La relación de la MDH y las POR's ha sido utilizada como un indicador de la adaptación de los organismos a condiciones de mínimo oxígeno (Shapiro y Bobkova, 1975). En el presente estudio, la actividad de las PORs están en el mismo orden de magnitud a las determinadas para *D. chilensis* (Grandón et al., 2008) y a pesar de que la actividad de MDH en *T. darwini* es aproximadamente la mitad que en *D. chilensis*, la relación MDH/PORs en *T. darwini* es mucho mayor a 1 (Tabla 1), valor que se ha establecido como un límite para la adaptación a las condiciones de hipoxia ambiental.

En *T. darwini*, la relación MDH/ALPDH se correlaciona negativa y significativamente con el peso ($p < 0,05$; Figura 11), lo que indicaría que a medida que *T. darwini* crece, esta especie también se haría más sensible a las condiciones de hipoxia ambiental, lo que sería consistente con observaciones del lugar de la toma de muestras del presente estudio (i.e. Granja Marina de Coliumo), que sitúa a los individuos más grandes cerca de la superficie y a los más pequeños en una porción más profunda de la columna de agua, sobre el substrato desde donde fueron obtenidos.

Si bien los resultados obtenidos en este estudio corresponden a una respuesta metabólica a corto plazo de *T. darwini*, la caracterización de la actividad enzimática obtenida corresponde a la condición en estado natural de su metabolismo anaeróbico y representa su estrategia metabólica adaptativa potencial frente a la disminución de oxígeno en el medio. Esta capacidad es crucial en lugares como Bahía Coliumo donde ocurren eventos de hipoxia ambiental severos con cierta frecuencia (ej. Hernández-Miranda *et al.* 2017). Por

ejemplo, en enero del año 2008, Bahía Coliumo registró un intenso evento de hipoxia ambiental, provocando una mortalidad masiva de peces y otros componentes de la comunidad bentónica y pelágica (Hernández-Miranda., *et al.* 2010, 2012).

4.2 Actividad aeróbica

La citrato sintasa es una enzima clave del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. Este ciclo une la glicólisis con la cadena transportadora de electrones (ETS). En el presente trabajo, la actividad de CS fue determinada en el rango entre los 0,19 y los 1,15 $\mu\text{mol DTNBmin}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$, siendo esta actividad en el mismo rango a la descrita por Baldwin *et al.*, (2007) para el molusco abalón *Haliotis asnina* (0,2 $\mu\text{mol DTNBmin}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$). Este abalón también ha sido descrito como un organismo capaz de adaptarse a condiciones de baja concentración de oxígeno ambiental (Baldwin *et al.*, 2007), el que también hace uso de la LDH y otras opinas distintas a las determinadas en el presente estudio.

Con respecto a la ETS, no existe información en la literatura científica acerca de la actividad de ETS en nudibranquios, no obstante, es posible realizar una comparación con otros moluscos como *Dreissena polymorpha* (zebra mussel). Para lo anterior se asumió como base de cálculo un porcentaje de agua del 80% de *T. darwini*, como ha sido reportado por Penney (2002) para nudibranquios con espículas. En este sentido, la actividad de ETS de *T. darwini* es a lo menos un orden de magnitud menor que para *D. polymorppha* (Fanslow *et al.*, 2001), lo que indicaría que *T. darwini*, a pesar de tener intercambio gaseoso de forma cutánea, su consumo potencial de oxígeno es menor al de otros moluscos no nudibranquios.

4.3 Algunas reflexiones sobre la capacidad adaptativa de *T. darwini* para enfrentar la hipoxia ambiental

Si la desoxigenación del océano continúa, como lo predicen diversos modelos de cambio climático (ej. Frolicher et al. 2016), en el futuro se esperaría que individuos de *Thecacera darwini* de menor tamaño sean más exitosos con relación a la capacidad que tienen de utilizar enzimas anaeróbicas, como producto de la relación negativa de la razón MDH/ALPDH y el peso (Figura 11).

La capacidad de los individuos juveniles de *Thecacera darwini* de soportar bajas concentraciones de oxígeno, podría constituir una estrategia evolutiva para enfrentar los frecuentes episodios de bajo oxígeno propios del sistema de surgencia costera de la zona centro-sur de Chile. Este organismo se reproduce en la época donde se desarrollan eventos de surgencia de alta intensidad (octubre-noviembre), lo que se asocia a periodos de bajo oxígeno en la columna de agua de la zona costera de la Bahía Coliumo.

En base a las observaciones en terreno, los organismos juveniles de menor tamaño se encontraron a mayor profundidad, lo que nos permite sugerir que se podría tratar de estrategias de sobrevivencia, debido a que a tallas más pequeñas se evidencia una mayor actividad de enzimas para el metabolismo anaeróbico.

5.- Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que *Thecacera darwini* es un organismo que posee la capacidad catabólica para enfrentar eventos de hipoxia ambiental y/o funcional, no obstante, esta capacidad disminuye a medida que se incrementa el tamaño corporal del organismo.

RELACION MDH/POR's	MDH/LDH	MDH/OPDH	MDH/ALPDH	MDH/STRDH	Peso g
Muestra 1	11,3	12,2	29,9	33,8	0,2887
Muestra 2	7,1	8,3	26,9	21,4	0,1377
Muestra 3	7,5	11,2	21,0	20,0	0,2628
Muestra 4	8,6	15,0	33,2	30,4	0,1526
Muestra 5	14,0	16,3	33,1	39,4	0,1136
Muestra 6	7,1	20,0	28,9	21,7	0,5651
Muestra 7	7,2	28,8	4,8	9,9	1,127
Muestra 8	17,7	41,1	7,8	16,5	0,746
Muestra 9	8,1	6,7	26,2	17,0	0,2891
Muestra 10	22,1	37,0	30,0	28,0	0,2421
Muestra 11	4,8	6,8	7,8	8,2	0,2776
Muestra 12	11,6	18,2	37,2	26,8	0,2802
Muestra 13	3,3	9,2	20,1	24,4	0,906
Muestra 14	10,0	9,2	16,3	8,9	0,5298
Muestra 15	6,2	8,8	19,0	8,1	0,3602
Muestra 16	12,0	40,5	34,0	30,4	0,399
Muestra 17	25,0	61,8	67,7	84,0	0,308
Muestra 18	16,2	38,0	53,2	42,9	0,192
Muestra 19	10,3	23,9	40,5	44,3	0,229
Muestra 20	17,4	18,1	33,7	33,7	0,222
Muestra 21	10,7	68,5	49,2	12,1	0,292
Muestra 22	14,0	23,6	39,7	77,5	0,352
Muestra 23	14,1	52,3	49,8	52,3	0,495
Muestra 24	11,1	61,7	35,7	34,9	1,097
Muestra 25	8,4	30,2	31,4	21,2	0,358
Muestra 26	12,7	70,0	37,5	45,7	0,38
Muestra 27	17,2	50,8	44,7	46,6	0,184
Muestra 28	16,6	44,1	45,9	47,8	0,132
Muestra 29	28,7	58,2	58,2	62,1	0,136
Muestra 30	19,5	33,8	28,0	46,0	0,965

Tabla 1: Relación Malato dehidrogenasa (MDH = $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$) entre las Piruvato oxidorreductasa (POR's = $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$) y el peso g de *Thecacera darwini*.

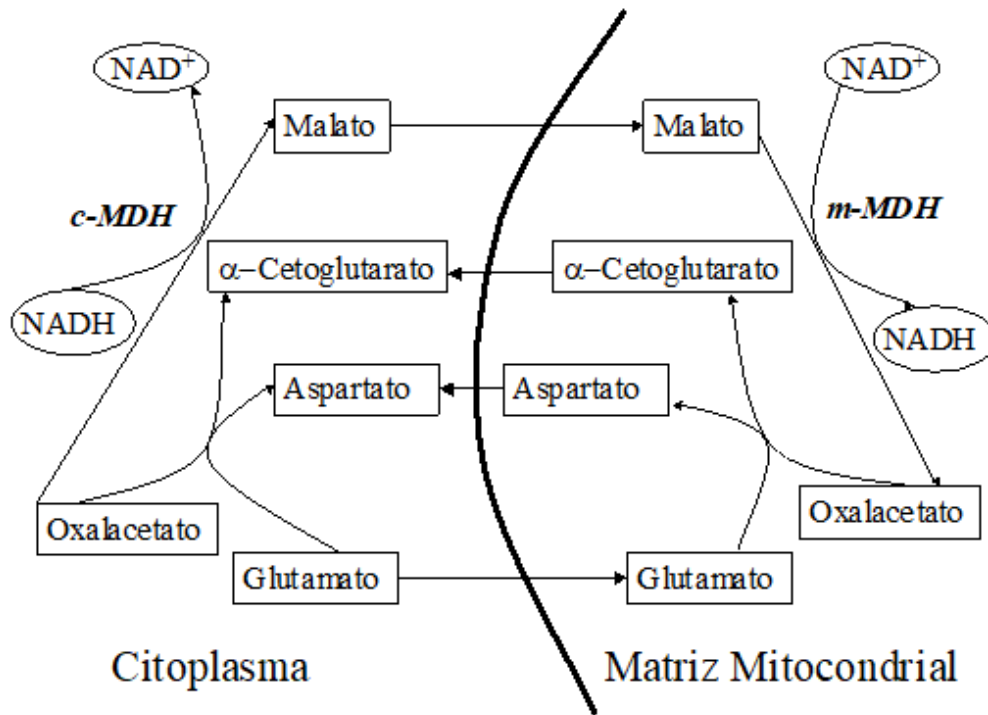


Figura 1: Reacciones catalizadas por la actividad de MDH y su unión con las reacciones de transaminación y el equilibrio de NADH entre el citoplasma y la matriz mitocondrial, obtenida de Nelson y Cox, (2000).



Figura 2: Fotografía de ejemplares de *Thecacera darwini*

Fuente: <https://www.diverkevin.com/South-America/Chile/Valparaiso-Chile-1/i-bJ6Qsw/>

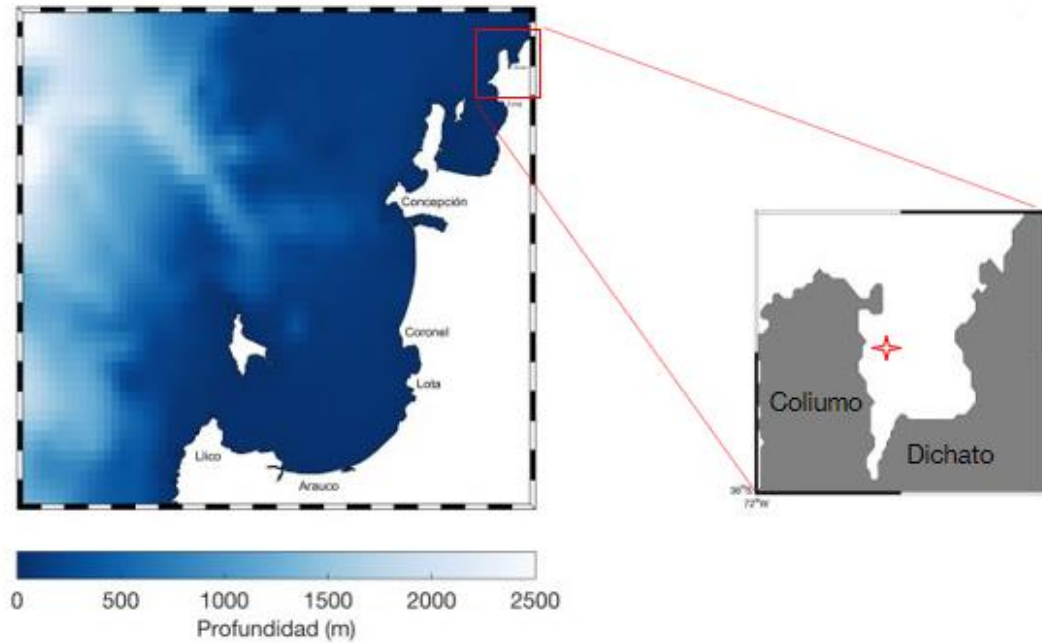


Figura 3: Ubicación del área de obtención de muestras de *Thecacera darwini* en la Granja Marina de Coliumo ($36^{\circ}32'12.3''$ S, $72^{\circ}57'10.2''$ W). En rojo se indica la zona de recolección.

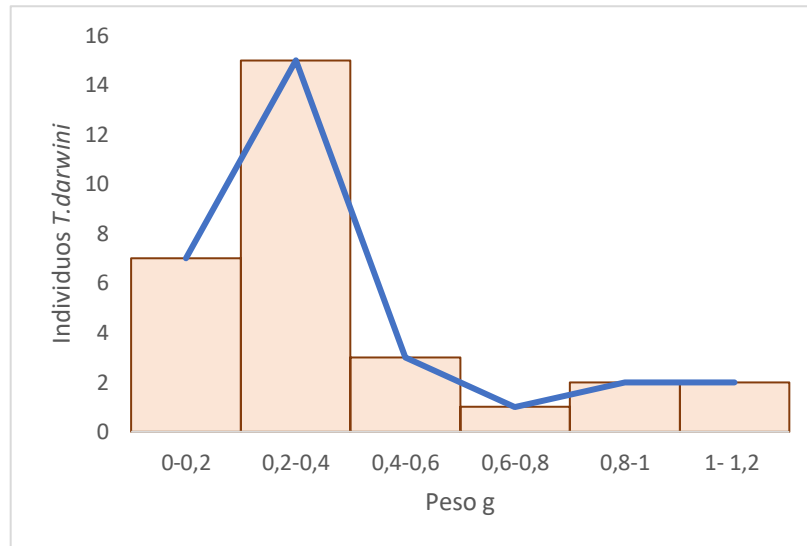


Figura 4: Histograma de frecuencia del peso (g) de las muestras de *Thecacera darwini* (n=30).

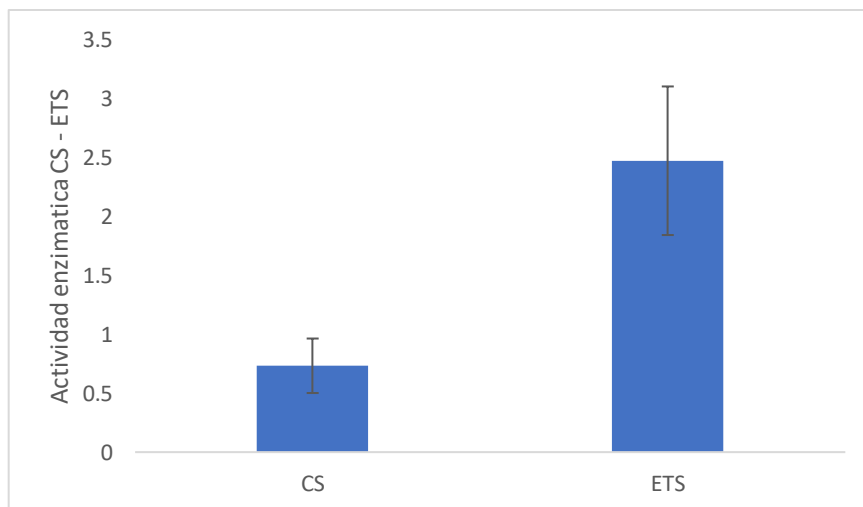


Figura 5: Actividades enzimáticas promedio de citrato sintasa (CS = $\mu\text{mol DTNBmin}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$) y actividad potencial promedio del sistema transportador de electrones (ETS = $\mu\text{l O}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ww}$) en el nudibranquio *Thecacera darwini*. Las barras en el grafico indican la desviación estándar.

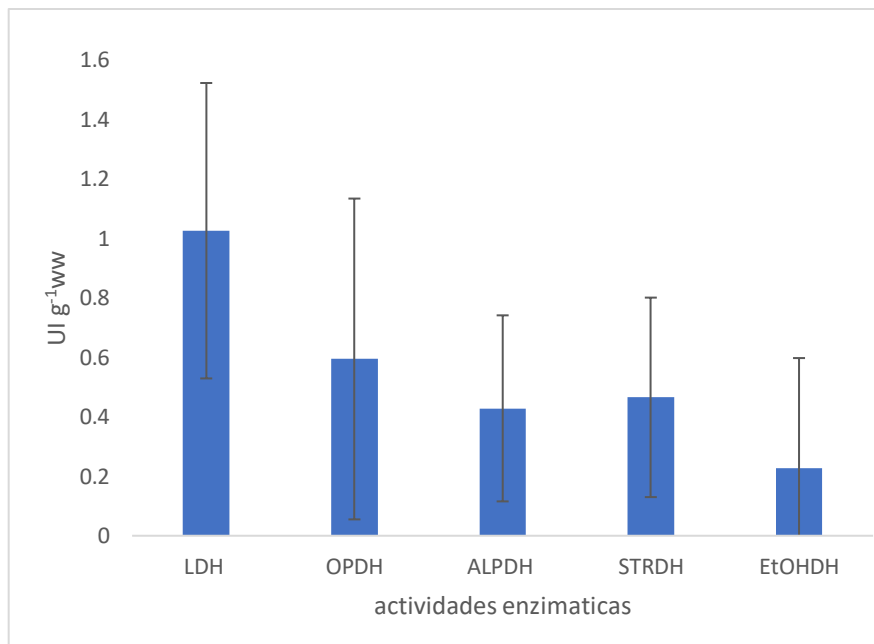


Figura 6: Actividades enzimáticas promedio en el nudibranquio *Thecacera darwini*, Lactato dehidrogenasa (LDH), octopina dehidrogenasa (OPDH), alanopina dehidrogenasa (ALPDH), strombina dehidrogenasa (STRDH), etanol dehidrogenasa (EtOHDH) ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$). No se ha incluido en este gráfico la actividad de malato dehidrogenasa (MDH; ver Figura 7). Las barras en el gráfico indican la desviación estándar.

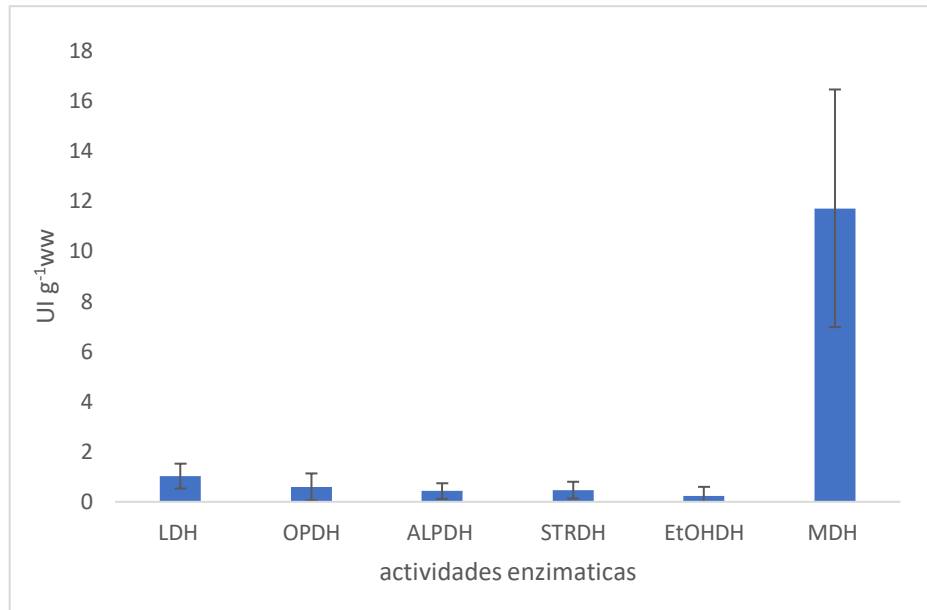


Figura 7: Actividades enzimáticas promedio analizadas en el nudibranquio *Thecacera darwini*, Lactato dehidrogenasa (LDH), octopina dehidrogenasa (OPDH), alanopina dehidrogenasa (ALPDH), strombina dehidrogenasa (STRDH), etanol dehidrogenasa (EtOHDH) y Malato dehidrogenasa (MDH) ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$), las barras de error en el grafico indican la desviación estándar.

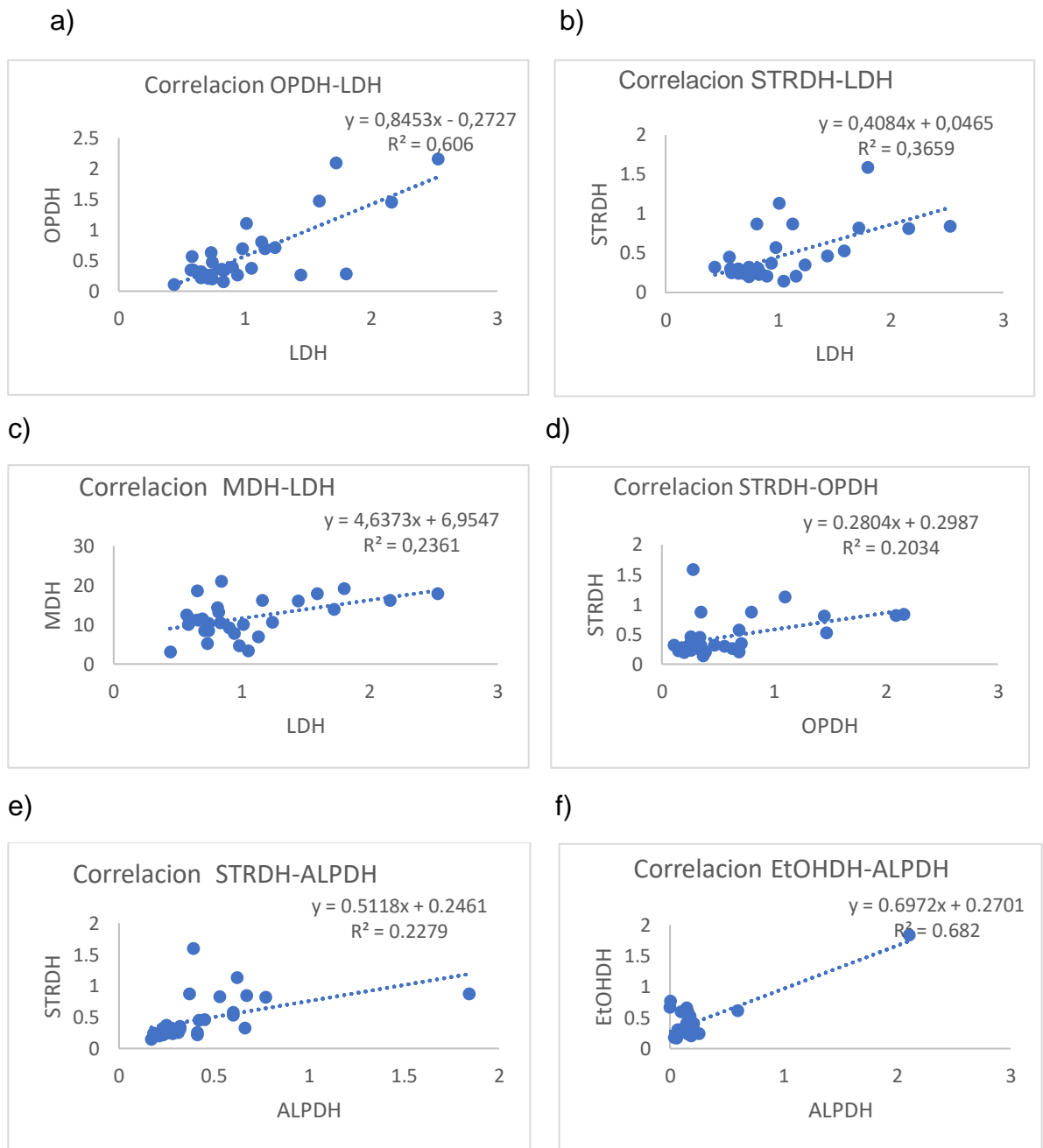


Figura 8: Grafico de dispersión de las regresiones lineales enzimáticas significativas ($p < 0,05$) en el nudibranquio *Thecacera dariwni* en $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$, a) correlación OPDH/LDH ($p < 0,000$), b) correlación STRDH/LDH ($p < 0,000$), c) correlación MDH/LDH ($p < 0,006$), d) correlación STRDH/OPDH ($p < 0,012$), e) correlación STRDH/ALPDH ($p < 0,008$), f) correlación EtOHDH/ALPDH ($p < 0,000$).

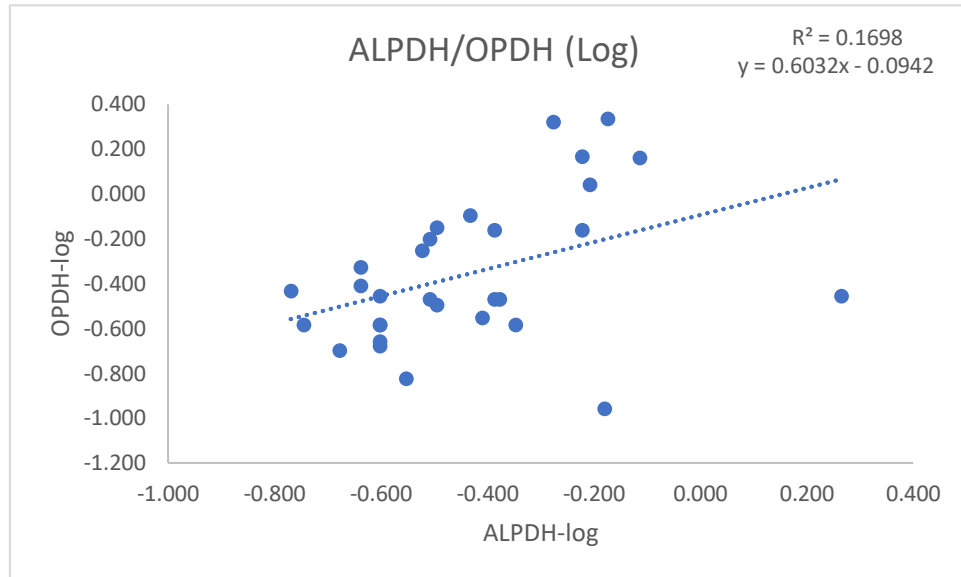


Figura 9: Grafico de dispersión de la regresión lineal significativa de ALPDH/ OPDH logarítmica de *Thecacera darwini* ($p=0,024$) en $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

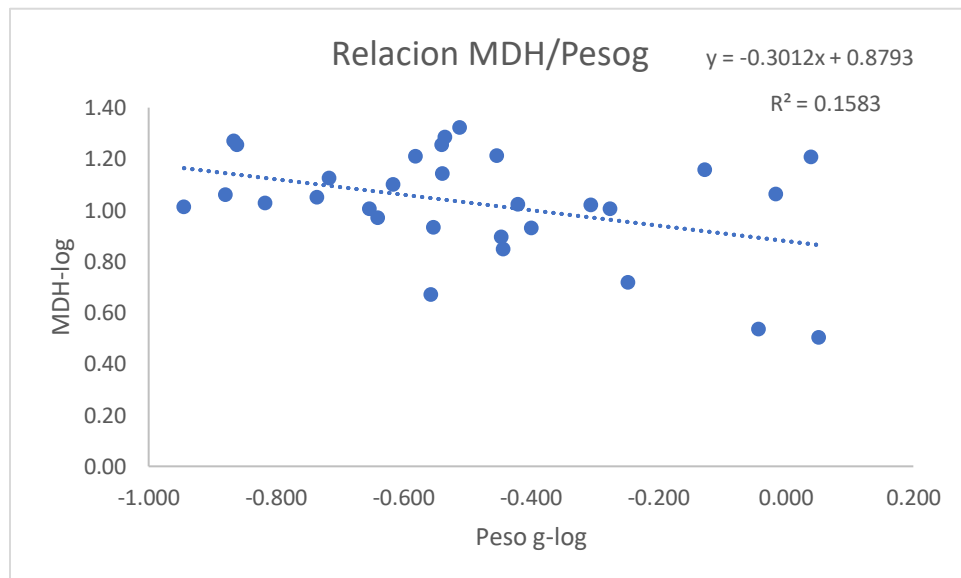


Figura 10: Grafico de dispersión de la regresión lineal significativa entre MDH/Peso g logarítmico de *Thecacera darwini* ($p=0,029$) en $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

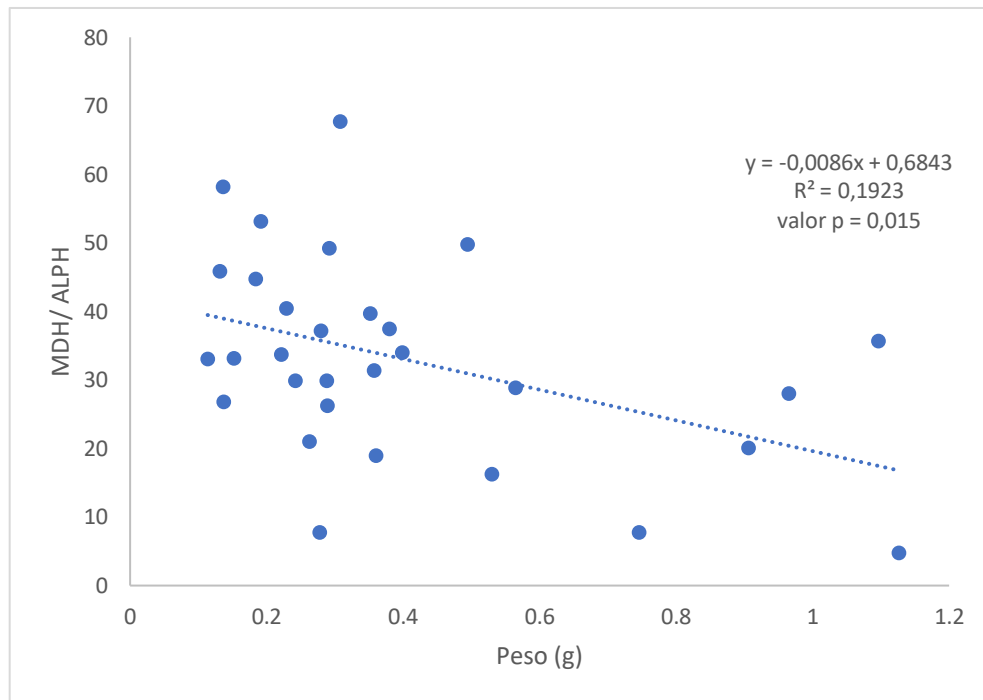


Figura 11: Grafico de dispersión de la regresión líneal logarítmica MDH-ALPDH/Peso g ($p < 0,015$) de *Thecacera darwini*.

6.- Bibliografía

- Ahumada, R. (1989). Producción y destino de la biomasa fitoplanctónica en un sistema de bahías en Chile Central: una hipótesis. *Biol Pesq.*, 18:53-66.
- Ahumada, R., Rudolph, A. y Martinez, V. (1983). Circulation and fertility of water in Concepcion Bay, Chile. *Estuarine and Coastal Shelf Science* 16, 95–105.
- Ahumada, R., y Chuecas, L. (1979). Algunas características hidrográficas de la Bahía Concepción (36°40'S, 73°02'W) y áreas adyacentes (Chile). *Gayana*, 8: 1-56.
- Alheit, J., Bernal, P.A. (1993). Effects and biological changes on biomass yield of Humboldt Current System. En: *Large marine ecosystem* (Sherman K, Alexander LM, Gold BD eds). American Association for the Advancement of Science Press, Washington DC pp: 53-68.
- Arcos, D.F., y Navarro, N. (1986). Analysis of an upwelling index for Talcahuano, Chile (Lat. 37S). *Investigaciones Pesqueras (Chile)*, 33: 91-98.
- Armstrong, E. J., Tanner, R. L., y Stillman, J. H. (2019). High heat tolerance is negatively correlated with heat tolerance plasticity in nudibranch mollusks. *Physiological and Biochemical Zoology*, 92(4), 430-444.
- Behrens, D.W. (1991). Pacific Coast Nudibranchs. A Guide to the Opisthobranchs Alaska to Baja California. Sea Challengers, Monterey, California. 107 p.
- Brandhorst, W. (1971). Condiciones oceanográficas estivales frente a la costa de Chile. *Rev Biol. Mar.*, 14: 45-84.

- Bruno, J., F., Lindsey, A.C., O'Connor M.I. 2015. Exploring the role of temperature in the ocean through metabolic scaling. *Ecology*, 96(12): 3126–3140
- Caldwell, S. L., y Donovan, D. A. (2003). Energetics of swimming and crawling in the lion nudibranch, *Melibe leonina*. *VELIGER-BERKELEY*, 46(4): 355-361.
- Chan, F., Barth J.A., Lubchenco J., Kirincich, A., Weeks, H., Peterson, W.T., y Menge, B.A. (2008). Emergence of anoxia in the California current large marine ecosystem. *Science*, 319: 920.
- Childress, J.J., y Seibel, B.A. (1998). Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *Journal of Experimental Biology. Revista de Biología Experimental*, 201: 1223-1232.
- Childress, J.J., Somero, G.N., (1979). Depth-related enzymatic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleost. *Marine Biology*, 52: 273-283.
- Daneri, G., Dellarossa, V., Quiñones, R.A., Jacob, B., Montero, P., y Ulloa, O. (2000). Primary production and community respiration in the Humboldt Current System off Chile and associated oceanic areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 197: 41-49.
- De La Maza, L. y Farías, L. (2023), The intensification of coastal hypoxia off central Chile: Long term and high frequency variability. *Front. Earth Sci.* 10:929271. doi: 10.3389/feart.2022.929271
- Diaz, R. J., and Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926–929. doi:10.1126/science.1156401

- Eissler, Y., y Quiñones, R.A. (1999). Microplanktonic respiration off northern Chile during El Niño 1997-1998. *Journal of Plankton Research*, 21: 2263-2283.
- Escribano, R., y Hidalgo, P. (2000). Spatial distribution of copepods in the north of the Humboldt Current region off Chile during coastal upwelling. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80: 283-290.
- Ekau, W., Auel, H., Pörtner, H.O., y Gilbert, D. (2010). Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeosciences*, 7: 1669 –1699.
- Fanslow, D. L., Nalepa, T. F., y Johengen, T. H. (2001). Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia*, 448, 61-70.
- Fenchel, T., Finlay, B.J. (1995). *Ecology and evolution in anoxic worlds*. Oxford University Press: 276 pp.
- Flam, F., (1994). Chemical prospectors scour the seas for promising drugs. *Science (New York, N.Y.)* 266(5189): 1324-1325.
- Fonseca, R.T., Farías, M. (1987) Estudio del proceso de surgencia costera en la costa chilena utilizando percepción remota. *Invest. Pesq. (Chile)* 34: 33-46.
- Frölicher, T.L., Rodgers, K.B., Stock, C.A., y Cheung, W.L.W. (2016). Sources of uncertainties in 21st century projections of potential ocean ecosystem stressors. *Global Biological Cycles*, 30, 12241243. <https://doi.org/10.1002/2015GB005338>

- Fuenzalida, R., Schneider, W., Garcés-Vargas, J., Bravo, L., y Lange, C. (2009). Vertical and horizontal extension of the oxygen minimum zone in the Eastern South Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography* 56 (16): 992–1003
- Gallardo, V.A., Palma, M., Carrasco, F., Gutiérrez, D., Levin, L.A., y Cañete, J.I. (2004). Macrobenthic zonation caused by the oxygen minimum zone on the shelf and slope off central Chile *Deep-Sea Research Part II*, 51: 2475-2490.
- García-Reyes, M., Sydeman, W. J., Schoeman, D. S., Rykaczewski, R. R., Black, B. A., Smit, A. J., et al. (2015). Under pressure: Climate change, upwelling, and eastern boundary upwelling ecosystems. *Front. Mar. Sci.* 2, 109. doi:10.3389/fmars.2015.00109
- Goolish, E.M. (1991). Aerobic and anaerobic scaling in fish. *Biol. Rev.*, 66: 33-56.
- González, H., Daneri, G., Figueroa, D., Iriarte, L., Lefevre, N., Pizarro, G., Quiñones, R., Sobarzo, M., Troncoso, A. (1998). Producción primaria y su destino en la trama trófica pelágica y océano profundo e intercambio océano-atmósfera de CO₂ en la zona norte de la corriente de Humboldt (23°S): posibles efectos del evento El Niño 1997-1998. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 71: 429-458.
- González, R.R., y Quiñones, R.A. (2009). Common patterns of catabolic enzymes of a microplankton community in the Humboldt Current System off Northern and Central South, Chile: Malate dehydrogenase activity as an index of water column metabolism in the Oxygen Minimum Zone. *Deep sea Research II*, 56: 1095-1104.
- González, R.R. (2002). Actividad enzimática catabólica en las comunidades planctónicas y bentónicas asociadas a la zona de mínimo oxígeno en

el sistema de la corriente de Humboldt. Tesis de Doctorado en Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, 221 pp.

González, R.R., y Quiñones, R.A. (2002) Ldh activity in *Euphausia mucronata* and *Calanus chilensis*: implications for vertical migration behaviour. *Journal of plankton research*, 24 (12): 1349-1356.

González, R. R., y Quiñones, R. A. (2000) Pyruvate oxidoreductases involved in glycolytic anaerobic metabolism of polychaetes from the continental shelf off central-south Chile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51(4), 507-519.

Gosliner, T.M., (1994). New record of Flabellinidae (Opisthobranchia: Aeolidacea) from the tropical Americas, with descriptions of the two new species. *Proceedings of the California Academy of sciences*, Ser. 4, 48(9):171- 183.

Gottschalk, G. (1978). *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag, NewYork, Heidelberg, Berlin.

Grados, M.C. (1989). Variabilidad del régimen hídrico del codo peruano chileno. *Memorias del Simposio Internacional de los Recursos Vivos y 17 las Pesquerías en el Pacífico Sudeste*. CPPS Revista Pacífico Sur, Número Especial: 95-105.

Grandón, M. A., Barros, J. A., y González, R. R. (2008). Caracterización metabólica de *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia: Hyriidae) expuesto a anoxia experimental. *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(3): 531-537.

Grantham, B.A., Chan, F., Nielsen, K.J., Fox, D.S., Barth, J.A., Huyer, A., Lubchenco, J., Menge, B.A. (2004). Upwelling-driven nearshore

hypoxia signals oceanographic and ecosystem changes in the northeast Pacific. *Nature*, 429 (6993): 749- 754.

Grieshaber, M.K., Hardewing, I., Kreutzer, U., Pörtener, H.-O. (1994) Physiological and metabolic Responses to hypoxia in Invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 125: 44-147.

Herrero-Barrencua, A. (2015). *Biología y ecología de tres especies de nudibranchios de la familia Polyceridae*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de las Palmas de Gran Canarias, España.

Hermosillo, A. y Valdes, A. (2005). Two Species of Dorid Nudibranchs (mollusca, Opisthobranchia) from Bahía de Banderas, Pacific Coast of Mexico. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, Ser. 4(55): 550-560.

Hernández, A., Tapia, F.J. (2021). Connecting spatial structure in subtidal benthic communities with temporal variability in bottom temperature and dissolved oxygen along an upwelling coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 250: 107166.

Hernández-Miranda, E., Quiñones, R. A., Aedo, G., Valenzuela, A., Mermoud, N., Román, C., y Yañez, F. (2010). A major fish stranding caused by a natural hypoxic event in a shallow bay of the eastern South Pacific. *Journal of Fish Biology*, 76: 1543-1564.

Hernández-Miranda, E., Labra, F. A., Salamanca, M. y Quiñones R. A. (2012). Response of the epibenthic macrofaunal community to a strong upwelling-driven hypoxic event in a shallow bay of the southern Humboldt Current System. *Marine Environmental Research*, 79: 16–28.

- Hernández-Miranda, E., Quiñones, R. A., Aedo, G., Díaz-Cabrera, E., y Cisterna, J. (2012). Impacto de un fuerte evento de hipoxia natural sobre el bagre de mar *Aphos porosus* en Bahía Coliumo, centro-sur de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 47(3): 475-487.
- Hernández-Miranda, E., Veas, R., Anabalón, V., Quiñones, R.A. (2017) Short-term alteration of biotic and abiotic components of the pelagic system in a shallow bay produced by a strong natural hypoxia event. *PLoS ONE*, 12(7): e0179023.
- Hochachka, P.W., y Somero, G.N.. (1984). *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*, 538 págs. Princeton University Press, Princeton.
- Jessen, G. L., Quiñones, R. A., y González, R. R. (2009). Aerobic and anaerobic enzymatic activity and allometric scaling of the deep benthic polychaete *Hyalinoecia artifex* (Polychaeta: Onuphidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(6): 1171-1175.
- Keeling, R.F., Körtzinger, A., y Gruber, N. (2010). Ocean deoxygenation in a warming world. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 2: 199-229.
- Laffoley, D., y Baxter, J.M. (2019). *La desoxigenación de los océanos: un problema de todos... resumen para los responsables de formular políticas*. Gland, Suiza: UICN. 28 pp.
- Lehninger, A.L. (1975). *Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 1104 pp.
- Levin, L. (2003). Oxygen minimum zone benthos: adaptation and community response to hypoxia. *Oceanogr. Mar. Biol., An Annual Review.*, 41: 1–45.

- Libes, S.M. (1992). *An introduction to Marine Biogeochemistry* (Libes SM ed). New York, Chichester. Brisbane, Toronto, Singapore. 1378 pp.
- Livingstone, D.R. (1983). Invertebrate and vertebrate pathway of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. *Journal of the Geological Society (London)*, 140: 27–37.
- Lyons, T.W., Reinhard, C.T., Planavsky, N.J. (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*. 20; 506 (7488): 307-15. doi: 10.1038/nature13068. PMID: 24553238.
- Meléendez, B., (1982). *Paleontología. Tomo I. Parte general e Invertebrados. 3ª Edición.* Ed. Paraninfo. 722pp.
- Mikkelsen, P.M.(1998). Review of shell reduction and loss in traditional and phylogenetic molluscan systematics, with experimental manipulation of a negative gain character. *Am. Malacol Bull.* 14(2): 201-218.
- Moat, A.G., Foster, J.W. and Spector, M.P. (2002). Fermentation Pathways. In *Microbial Physiology* (eds A.G. Moat, J.W. Foster and M.P. Spector). <https://doi.org/10.1002/0471223867.ch11>
- Montecinos, V., Pizarro, G., Quiroz, D. (1998). Primary production off the Chilean Coast Páginas 69-76. En: *Biotics impacts of extratropical climate variability in the Pacific* (Holloway, G., Muller, P., Henderson, D, eds). Proceedings 'Aha Huliko'a Hawaiian winter workshop. University of Hawaii at Manoa. January 25-29, 1998. SOEST Special Publication. 165pp.
- Moran, A.L., Woods, H.A. 2010. Limits to diffusive O₂ transport: flow, form, and function in nudibranch egg masses from temperate and polar regions. *PLoS One*. 2010 Aug 11;5(8):e12113. doi: 10.1371/journal.pone.0012113.

- Morales, C.M., Hormazabal, S., y Blanco, J.L. (1999). Interannual variability in the mesoscale distribution of the depth of the upper boundary of the oxygen minimum layer off northern Chile (18-24S): Implications for the pelagic system and biogeochemical cycling. *Journal of Marine Research*, 57: 909-932.
- Morales, C.E., Blanco, J.L., Braun, M., Reyes, H., Silva, N. (1996). Chlorophyll-a distribution and associated oceanographic conditions in the upwelling region off northern Chile during the winter and spring 1993. *Deep-Sea Res.* 43:267-289.
- Nelson, D.L., y Cox, M.M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. Third edition. Worth Publishers, New York, 1152pp.
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D., y Garçon, V. (2008). The oxygen minimum zone (OMZ) off Chile is an intense source of CO₂ and N₂O. *Cont. Shelf Res.* 28: 2746–2756.
- Packard, T.T. (1969). The estimation of the oxygen utilization rate in the seawater from the activity of the respiratory electron transport system in plankton. PhD Thesis, University of Washington, Seattle, 155 pp.
- Packard, T.T. (1985). Measurement of electron transport activity of microplankton. In: Jannasch, H., Williams P.J.L.B. (eds) *Advances in aquatic microbiology*. London: Academic Press, pp. 207–261.
- Packard, T.T., Healy, M.L., y Richards, F.A. (1971). Vertical distribution of the activity of the respiratory electron transport system in marine plankton. *Limnol. Oceanogr.* 16: 60-70.
- Panepucci, L., Fernandes, M.N., Sanches, J.R., y Rantin, F.T. (2000). Changes in lactate dehydrogenase activities during hypoxia and after

temperature acclimation in the armored fish, *Rhinelepis strigosa* (Siluriformes, Loricariidae). *Braz. J. Biol.* 60: 353–360.

Panepucci, R.A., Panepucci, L., Fernandes, M.N., Sanches, J.R., y Rantin, F.T. (2001) The effect of hipoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Braz. J. Biol.* 61: 547–554.

Penney, B. K. (2002). Lowered nutritional quality supplements nudibranch chemical defense. *Oecologia*, 132(3), 411-418.

Pizarro-Koch, M., Pizarro, O., Boris, Dewitte, Montes, I., Ramos, M., Aurelien, Paulmier, y Garcon, V. (2019). Seasonal variability of the southern tip of the oxygen minimum zone in the Eastern South Pacific (30°- 38° S): a modeling study. *J. Geophys. Res. Oceans* 124 (12): 8574–8604.

Quiñones, R.A., Levipan, H.A. y Urrutia, H. (2009). Spatial and temporal variability of planktonic archaeal abundance in the Humboldt System off Chile. *Deep Sea Research II*, 56(16): 1073-1082.

Quiñones, R. A., Gutiérrez, M. H., Daneri, G., Gutiérrez D.A., González, H.E., Chávez, F. 2010. Pelagic carbon fluxes in the Humboldt Current System. Pages 44-64, In: Carbon and nutrient fluxes in global continental margins: A global synthesis. K.K. Liu, L. Atkinson, , R. A. Quiñones, L. Talaue-McManus (eds.), IGBP Series Book, Springer-Verlag New York. 741 pp.

Sagasti, A., Schaffner, L.C., Duffy, J.E. (2001) Effects of periodic hypoxia on mortality, feeding and predation in an estuarine epifaunal community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 258(2):257-283,

- Sánchez Garduño, F., y Gutiérrez Sánchez, J. L. (2020). La alometría, una ley de potencias ubicua en la estructura de los seres vivos. *Interdisciplina* 8(20): 11-22.
- Schiedek, D. (1997). *Marenzelleria viridis* (Verrill, 1873) (Polychaeta), a new benthic species within European coastal waters. Some metabolic features. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 211: 85– 101.
- Schroedl, M. (2003). *Sea Slugs of southern South America*. ConchBooks, 165pp.
- Shapiro, A. Z., y Bobkova, A. N. (1975). The role of malate dehydrogenase in adaptation to hypoxia in invertebrates. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*, 11(5), 546-547.
- Sievers, H.A., Silva, N. (1975). Masas de agua y circulación en el Océano Pacífico Sudoriental. Latitudes 18°S-33°S (Operación Oceanográfica “Mar Chile VIII”). *Cienc. Tec. Mar. CONA*, 1: 7-67.
- Silva, N., Neshyba, S. (1979). On the southernmost extension of Peru-Chile undercurrent. *Deep Sea Res.*, 26A: 1387-1393.
- Silva, N. (1981). Masas de agua y circulación en la región del norte de Chile, latitudes 18°S-33°S (Operación Oceanográfica Mar Chile XI-ERFEN II). *Cienc. Tec. Mar. CONA*, 5:5-50.
- Stramma, L., Schmidtko, S., Levin, L.A., y Jonhson, G.C (2010). Ocean oxygen minima expansions and their biological impacts. *Deep-Sea Res. I.*, 57: 587–595.
- Thiel, M., Macaya, E.C., Acuña, E., Arntz, W. E., Bastias, H., Brokordt, K., Camus, P.A., Castilla, J.C., Castro, L.R. et al. 2007. The Humboldt Current System of Northern and Central Chile – oceanographic

- processes, ecological interactions and socio-economic feedback. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 45: 195-344
- Thomas, A.C., Strub, P.T., Huacey, y F., James, C. (1994). A comparison on the seasonal and inter-annual variability of phytoplankton pigment concentration in the Peru and California Current Systems. *J. Geophys. Res.* 99: 7355-737.
- Ulloa, O., Escribano, R., Hormazabal, S., Quiñones, R.A., González, R.R., y Ramos, M. (2001). Evolution and biological effects of El Niño 1997-98 in the upwelling ecosystem of northern Chile. *Geophysical Investigation Letters* 28: 1591-1594.
- Valdés, A., Bouchet, P. (1998). Naked in toxic fluids: A nudibranch mollusc from hydrothermal vents. *Deep-Sea Research II* 45: 319-327.
- Valdés, J., Sifedine, A., Guiñez, M., y Castillo, A. (2021). Oxygen minimum zone variability during the last 700 years in a coastal upwelling area of the Humboldt system (Mejillones, 23° S, Chile). A new approach from geochemical signature. *Progress in Oceanography* 193: 102520
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M. (2011). Temperature effects on oxygen thresholds for hypoxia in marine benthic organisms. *Global Change Biol.* 17: 1788–1797.
- Vaquer-Sunyer, R., y Duarte, C.M. (2008). Hypoxia thresholds for marine biodiversity. *PNAS*, 105(40): 15452-15457.
- Vetter, R.D., Lynn, E.A., Garza, M., y Costa, A.S. (1994). Depth zonation and metabolic adaptation in Dover sole *Microstomus pacificus*, and other deep-living flatfishes: factors that affect the sole. *Marine Biology*, 120: 145–159.

- Walker, J.C.G. (1981). The earliest atmosphere of the earth. *Precambrian Res.* 17: 147-171.
- Williams, P. J. leB., Jenkinson, N. W. (1982) A transportable microprocessor controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnology and Oceanography* 27: 576–584.
- Wishner, K.F., Outram, D.M., Seibel, B.A., Daly, K.L., Williams, R.L. (2013). Zooplankton in the eastern tropical north Pacific: Boundary effects of oxygen minimum zone expansion. *Deep-Sea Res. II: Oceanogr. Res. Pap.* 79: 122–140.
- White, B.N. (1988). Oceanic anoxic events and allopatric speciation in the deep sea. *Biological Oceanography* 5: 243- 259.
- Zagal, C., y Hermosilla, C. (2007). Guía de invertebrados marinos del sur de Chile. Fantástico Sur Eds. 135 pp.
- Yang, T.H., Lai, N.C., Graham, J.B., Somero, G.N. (1992). Respiratory, blood, and heart enzymatic adaptations of *Sebastes alascanus* (Scorpaenidae; Teleostei) to the oxygen minimum zone: a comparative study. *Biol Bull.* 183: 490–499.
- Zammit, V. A. (1978). Possible relationship between energy metabolism of muscle and oxygen binding characteristics of haemocyanin of cephalopods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 58: 421–424.
- Zar, J. H. (1984). *Bioestatistical Analysis*. Second edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.