



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
OCEANOGRÁFICAS



Defensas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en adultos de *Euphausia mucronata* G.O. Sars, 1883 (Crustacea: Euphausiacea) expuestos a aguas hipóxicas con alta y baja presión parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$).



Constanza Isabel Domínguez Aguilera

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Para optar al Título de
BIOLOGA MARINA

Concepción – Chile

2022

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

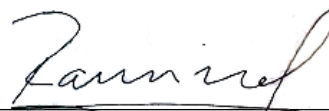
Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Zoología y Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Director de Seminario



Dr. Mauricio A. Urbina Foneron

Profesor Co-guía



Dr. Ramiro A. Riquelme Bugueño

Profesor Patrocinante



Dra. Pamela Del Carmen Hidalgo Díaz

Ha sido aprobada por la siguiente comisión evaluadora



MSc Erika Jorquera Paegelow

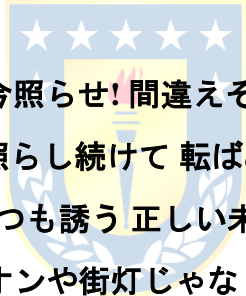
Jefe de Carrera



Dr. Ariel E. Valenzuela Saldías

DEDICATORIA

A mi mamá, a mi papá, a mis hermanos mayores...
A ellos y a todos los que formaron parte de este proceso...
Muchas gracias por todo el apoyo.



“月光りよ今照らせ!間違えそうな僕らを
ひたすら照らし続けて 転ばぬようにと
僕らをいつも誘う 正しい未来の光は
ネオンや街灯じゃなくて
夜にだけ咲くまん丸い満月”

“¡Luz de luna, brilla sobre nosotros ahora!
Parece que cometemos errores
Sólo sigue brillando la luz para que no te caigas
La luz del futuro correcto que siempre nos invita
Ni neón ni farolas
Una luna llena redonda que sólo florece de noche”
- One Ok Rock

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Mauricio Urbina por guiarme académicamente y aceptarme en el Laboratorio de Fisiología Animal Comparada para realizar mi Seminario de Título, el cual se enmarcó y financió por el proyecto Fondecyt 121007. Al Dr. Ramiro Riquelme por aceptarme como su alumna desde el Proyecto de Seminario y acompañarme durante todo este proceso. A Erika Jorquera por guiarme durante mis primeros meses en el laboratorio y enseñarme el funcionamiento de los distintos equipos. A Caroline Montes por enseñarme y brindarme apoyo durante el proceso de ajuste de los protocolos que utilice para realizar las mediciones. A Natalia Montoya, alumna de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, la cual fue mi fiel compañera durante la realización de la parte más complicada del experimento, la medición de la actividad de las enzimas. Y a todos los miembros del laboratorio, los cuales me animaron y apoyaron durante este proceso.

Agradezco al profesor Marco Antonio Retamal Rivas Q.D.E.P, por enseñarme lo interesante y maravilloso que es la biología y la taxonomía de crustáceos decápodos, por aceptarme como su alumna y guiarme hasta los últimos momentos de su vida. A la Dra. Pamela Hidalgo por aceptar ser mi patrocinante de tesis y enseñarme durante mis años académicos.

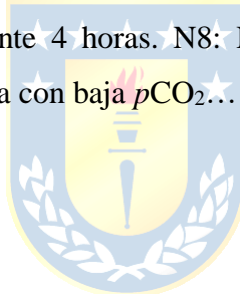
Finalmente, agradezco a toda mi familia, sobre todo a mis padres y a mis hermanos mayores, los cuales estuvieron presente durante mis momentos más felices y más difíciles, gracias a ellos he realizado mi primer logro académico importante. También, y no menos importante, a la familia que forme durante mi vida universitaria, mis amigas y mis amigos, con los que pase grandes momentos, los cuales se volverán inolvidables para mí, y darles las gracias por creer en mí, e incluso en mis peores momentos.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE ANEXOS.....	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPOTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Localización de área de estudio y obtención de muestras.....	14
Diseño experimental.....	14
Análisis bioquímicos.....	14
Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	15
Determinación de la actividad de catalasa (CAT).....	16
Determinación de proteínas totales.....	17
Análisis estadístico.....	17
RESULTADOS.....	19
Actividad de la enzima superóxido dismutasa.....	20
Actividad de la enzima Catalasa.....	21
DISCUSIÓN	22
BIBLIOGRAFÍA.....	25

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1.- Esquema de la producción de especies reactivas de oxígeno (Meneghini, 1987).....	6
Figura N°2.- Esquema del diseño experimental.....	15
Figura N°3. – Porcentaje de sobrevivencia de los eufáusidos expuestos a los tratamientos de normoxia (N), hipoxia (H) e hipoxia con alto $p\text{CO}_2$ (ZMO) durante 4 y 8 horas.....	19
Figura N°4. – Actividad específica de la enzima SOD (media \pm desviación estándar) en <i>Euphausia mucronata</i> en cuatro tratamientos. Los valores están expresados en USOD/mg de proteína. N4: Normoxia durante 4 horas. N8: Normoxia durante 8 horas. ZMO: Hipoxia con alta $p\text{CO}_2$. H: Hipoxia con baja $p\text{CO}_2$	20
Figura N°5. – Actividad específica de la enzima CAT (media \pm desviación estándar) en <i>Euphausia mucronata</i> en cuatro tratamientos. Los valores están expresados en UCAT/mg de proteína. N4: Normoxia durante 4 horas. N8: Normoxia durante 8 horas. ZMO: Hipoxia con alta $p\text{CO}_2$. H: Hipoxia con baja $p\text{CO}_2$	21



INDICE DE TABLAS

Tabla N°1.- Principales especies reactivas de oxígeno..... 5



INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Tabla con el peso (mg) de cada eufásido y volumen de buffer (μL) en los distintos tratamientos.....	33
Anexo 2.- Ecuación de la curva polinomial de grado 2 y su R^2 para cada tratamiento....	34

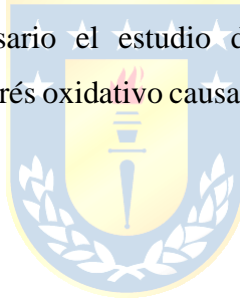


RESUMEN

El oxígeno es una de las moléculas más importantes para la vida, ya que es crucial para la obtención de ATP en organismos aerobios, sin embargo, es un potente agente oxidante. Durante condiciones de hipoxia, hay un aumento de ROS lo que provoca estrés oxidativo y causa daño oxidativo en distintas moléculas orgánicas. No obstante, los organismos han desarrollado un sistema de defensa antioxidante, donde sobresalen principalmente las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. El objetivo de este trabajo es determinar la actividad de las enzimas SOD y CAT en *Euphausia mucronata* adultos expuestos a condiciones de normoxia e hipoxia con alta y baja $p\text{CO}_2$ durante 4 y 8 horas. Se plantea como hipótesis que la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT será mayor en individuos expuestos durante 4 horas a hipoxia con alta y baja $p\text{CO}_2$ que a los que están en condiciones de normoxia durante 4 y 8 horas. Por otro lado, entre los organismos expuestos a hipoxia, los que en están en el tratamiento con alta $p\text{CO}_2$ tendrán una mayor actividad de las enzimas, en comparación a los que se encuentran en hipoxia con baja $p\text{CO}_2$.

Los eufáusidos fueron capturados en la estación 18, frente a la bahía de Dichato, utilizando una red cónica con copo no filtrante a bordo del buque de investigación de la Universidad de Concepción, Kay-Kay II. Los organismos fueron puestos en tres tratamientos, un control en condiciones de normoxia (18 kPa, 5.56 mL O_2/L), mientras que los otros dos tratamientos estuvieron expuestos a un medio hipóxico (3 kPa, 0.93 mL O_2/L), uno con alta $p\text{CO}_2$ (1400 μatm) y el otro con baja $p\text{CO}_2$ (400 μatm). Se contabilizó cada 2 horas el número de sobrevivientes durante el tiempo que duró las dos incubaciones. Los individuos vivos fueron congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta su medición. Se midió la actividad específica de las enzimas SOD y CAT, además de la concentración de proteínas totales para realizar los cálculos de ambas enzimas. Finalmente, se realizó un análisis estadístico para corroborar si las diferencias son significativas entre los tratamientos. Los organismos que estuvieron en los tratamientos de hipoxia (H) e hipoxia con alto $p\text{CO}_2$ (ZMO), presentaron el 100% de sobrevivientes las primeras 4 horas. Sin embargo, mostraron una disminución en el porcentaje de

sobrevivencia a las 6 horas (H: $13.3 \pm 11.54\%$ y ZMO: $53.3 \pm 11.54\%$). Finalmente, a las 8 horas el porcentaje de sobrevivientes fue 0% en ambas pruebas. El tratamiento de normoxia (N), mantuvo un 100% de sobrevivencia toda la incubación. En la actividad de la enzima SOD, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de normoxia N4 (4 horas) y N8 (8 horas) ($p = 0.439$), entre N4 y los tratamientos ZMO y H ($p = 0.439$), ni tampoco entre ZMO y H ($p = 0.753$). Mientras que si lo hubo entre N8 y los tratamientos ZMO y H ($p = 0.032$). Mientras que, en la actividad de la enzima CAT, no se encontraron diferencias significativas de las medias entre ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$). En ambas enzimas, los valores de actividad específica fueron considerablemente bajos en comparación a otro trabajo similar. No obstante, uno de los puntos importantes que mostró este estudio, fue el rol del CO_2 en los tratamientos de hipoxia, pues se sabe que este es capaz de eliminar RNS (Especies reactivas de nitrógeno) evitando la nitración y el daño oxidativo, aunque también bajo ciertas condiciones puede intensificar este daño. Es necesario el estudio de otros puntos importantes para comprender a grandes rasgos el estrés oxidativo causado por la hipoxia en este organismo.



ABSTRACT

Oxygen is one of the most important molecules for life, since it is crucial for obtaining ATP in aerobic organisms, however, it is a powerful oxidizing agent. During hypoxia conditions, there is an increase in ROS which causes oxidative stress and causes oxidative damage in different organic molecules. However, organisms have developed an antioxidant defense system, where the superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase enzymes stand out mainly. The objective of this work is to determine the activity of the SOD and CAT enzymes in *Euphausia mucronata* adults exposed to conditions of normoxia and hypoxia with high and low $p\text{CO}_2$ for 4 and 8 hours. It is proposed as a hypothesis that the activity of the SOD and CAT antioxidant enzymes will be greater in individuals exposed for 4 hours to hypoxia with high and low $p\text{CO}_2$ than to those in normoxia conditions for 4 and 8 hours. On the other hand, among the organisms exposed to hypoxia, those that are in the treatment with high $p\text{CO}_2$ will have a greater activity of the enzymes, compared to those found in hypoxia with low $p\text{CO}_2$.

The euphausiids were captured at station 18, in front of Dichato's bay, using a conical net with non-filtering cod end aboard the research ship of the University of Concepción, Kay-Kay II. The organisms were placed in three treatments, a control in normoxia conditions (18 kPa, 5.56 mL O_2/L), while the other two treatments were exposed to a hypoxic medium (3 kPa, 0.93 mL O_2/L), one with high $p\text{CO}_2$ (1400 μatm) and the other with low $p\text{CO}_2$ (400 μatm). The number of survivors was counted every 2 hours during the time that lasted the two incubations. Living individuals were frozen in liquid nitrogen and preserved at -80°C until measurement. The specific activity of the SOD and CAT enzymes was measured, in addition to the concentration of total proteins to perform the calculations of both enzymes. Finally, a statistical analysis was carried out to corroborate if the differences are significant between treatments. The agencies that were in hypoxia (H) and hypoxia with high $p\text{CO}_2$ (ZMO) treatments presented 100% of survivors the first 4 hours. However, they showed a decrease in the percentage of survival at 6 hours (H: $13.3 \pm 11.54\%$ and ZMO: $53.3 \pm 11.54\%$). Finally, at 8 hours the percentage of survivors was 0% in both tests. Normoxia treatment (N) maintained 100% survival all incubation. In the activity of the sod enzyme, no significant differences were found between N4 (4

hours) and N8 (8 hours) ($p = 0.439$), between N4 and ZMO and H treatments ($p = 0.439$), nor Nor between ZMO and H ($p = 0.753$). While there was between N8 and ZMO and H treatments ($p = 0.032$). While, in the activity of the enzyme CAT, no significant differences of the means between any of the treatments were found ($p > 0.05$). In both enzymes, the specific activity values were considerably low compared to another similar work. However, one of the important points that this study showed, was the role of CO_2 in hypoxia treatments, since it was discovered that it can eliminate RNS avoiding nitration and oxidative damage, although also under certain conditions it can intensify this damage. It is necessary to study other important points to understand the oxidative stress caused by hypoxia in this organism.



INTRODUCCIÓN

El oxígeno es una de las moléculas más importantes para la vida, ya que es crucial para la obtención de ATP en organismos aerobios. Sin embargo, esta molécula a la vez presenta otro efecto fisiológico, al ser un potente agente oxidante (Chang & College, 2002).

Los seres vivos que se desarrollan en condiciones aeróbicas están expuestos a una gran variedad de agentes oxidantes generados directamente como productos o subproductos, entre estos, uno de los más importantes son las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos también cumplen funciones biológicas esenciales para el desarrollo normal de las células (Pitocco et al., 2013), jugando un papel importante en la transducción de señales, que es vital para la comunicación y función de estas (Apel & Hirt, 2004), aunque también son capaces de ejercer efectos tóxicos.

Las ROS son compuestos que presentan en su estructura oxígeno de diferente reactividad química, puesto que, derivan directamente de esta molécula, considerándolos como metabolitos de oxígeno parcialmente reducidos y que poseen una gran capacidad oxidante (Mittal et al., 2014). Tienen electrones capaces de reaccionar con varios sustratos orgánicos, tales como lípidos, proteínas y ADN (Halliwell & Aruoma, 1991). La oxidación de estas biomoléculas provoca daño, comprometiendo las funciones celulares normales y contribuyendo a estados patológicos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Los ROS pueden o no ser radicales libres (Tabla N°1). Son generados principalmente en la mitocondria, aunque también en diferentes organelos, tales como, la membrana plasmática, el citoplasma, el retículo endoplasmático, entre otros (Carvajal, 2019).

Tabla N°1.- Principales especies reactivas de oxígeno.

	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)
Radicales	Anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$)
	Radical hidroxilo ($\cdot OH$)
	Radical alcoxilo ($RO\cdot$)
	Radical peroxilo ($ROO\cdot$)

No radicales	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
	Oxígeno singulete (¹ O ₂)
	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Peróxido orgánico (ROOH)

La producción de especies reactivas de oxígeno (Figura N°1) comienza cuando esta molécula oxida un compuesto, este se reducirá a causa de la ganancia de un electrón (e⁻) a la vez, formando así el anión superóxido (O₂^{•-}) (Meneghini, 1987). De la misma manera, cuando ocurre la reducción parcial del oxígeno por aceptación de dos electrones, inicia la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (García et al., 1993). No obstante, la unión que se da entre los oxígenos en el H₂O₂ es demasiado débil y puede llegar a descomponerse, dando origen al radical hidroxilo (•OH), el cual posee una alta reactividad, sin embargo, cuando el oxígeno acepta cuatro electrones se forma una molécula de agua (H₂O) (Green & Hill, 1984).

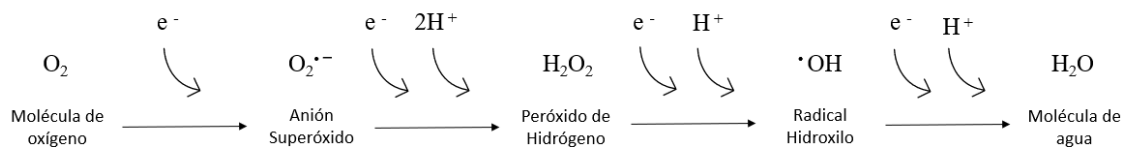


Figura N°1.- Esquema de la producción de especies reactivas de oxígeno (Meneghini, 1987).

Aunque estas reacciones de oxidación son requeridas para obtener energía para un apropiado funcionamiento celular, un desbalance entre la producción de especies reactivas y los mecanismos antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los primeros, genera el denominado estrés oxidativo (Halliwell, & Gutteridge, 1999). Esta alteración trae como consecuencia cambios tanto fisiológicos como bioquímicos, como, por ejemplo, la peroxidación lipídica, la autooxidación de la glucosa y la glicosilación de las proteínas, provocando daño y muerte celular (Halliwell & Whiteman, 2004). Más aún, la mayoría de las reacciones de oxidación utilizan el oxígeno (O₂), lo que lleva a que el 90% del oxígeno plasmático sea utilizado para procesos metabólicos (Halliwell, 1994).

En general, cerca del 2% de los electrones son desviados de la cadena transportadora y formarán aniones superóxidos (Lay et al., 2014; Di Meo et al., 2016). Además, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden constituir la mayoría de los ROS producidos dentro de la célula, y, en ausencia de mecanismos antioxidantes eficientes, la actividad mitocondrial conllevaría a un aumento de la concentración del radical superóxido por encima de lo normal, comprometiendo la sobrevivencia de la célula (Sainz et al., 2012).

Entre las ROS, el anión superóxido, es el radical más abundante a nivel celular, el cual es generado en distintos organelos, tales como la mitocondria principalmente, el retículo endoplasmático y el citoplasma (Llesuy, 2002; Mandavilli & Van Houten, 2002; Nichols & Ferguson, 2001; Possa, 2002).

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno, el cual no es un radical libre, es una especie reactiva de vital importancia, puesto que, es capaz de generar el radical hidroxilo, a través de la reacción Haber – Weiss (Halliwell, & Gutteridge, 1999), Esta especie reactiva es generada en la mitocondria, el retículo endoplasmático y en el peroxisoma (Llesuy, 2002; McCord & Fridovich, 1969).

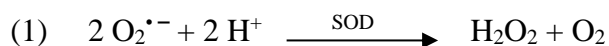
Así, debido a la necesidad de mantener las ROS dentro de los niveles compatibles con la función celular normal, los seres vivos han sido capaces de desarrollar diversos mecanismos moleculares eficientes, de los cuales participan antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que permiten la estabilización y eliminación de estas especies reactivas, ofreciendo defensa contra sus efectos desfavorables (Betteridge, 2000).

Los sistemas antioxidantes presentan dos tipos de mecanismos que permiten eliminar los excesos de ROS, estos son a través de la protección estequiométrica y la catalítica. La primera consiste en la neutralización mediante el uso de moléculas pequeñas que son capaces de inactivar una o dos moléculas de especies reactivas (Lozada & García, 2009), mientras que, la protección catalítica, utiliza enzimas que inhiben las reacciones oxidantes, evitando la formación de una cantidad considerable de especies reactivas (Droge, 2002).

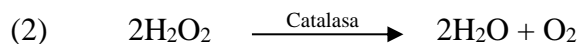
Los antioxidantes no enzimáticos tienen como función capturar los radicales libres y generar moléculas menos nocivas para la célula mediante la incorporación de un electrón al radical libre con el fin de estabilizarlo (Bandyopadhyay et al., 1999; Larkins, 1999), entre este conjunto de moléculas están, las Vitaminas C y E, las cuales tienen como función reciclar las ROS (Halliwell et al., 2005), también se encuentra el glutatión, tripéptido de bajo peso molecular, abundante en el citoplasma, la mitocondria y el núcleo, capaz de actuar sobre el H₂O₂, el superóxido y el radical hidroxilo (Power & Lennon, 1999). A parte de estos antioxidantes no enzimáticos, están la bilirrubina, el ácido úrico, los flavonoides, entre otros (Sainz et al., 2012; Rahal et al., 2014).

Por otro lado, en los sistemas enzimáticos se pueden encontrar tres tipos, las de inhibición, las reparadoras y las reductoras o neutralizantes (Mates et al., 1999). La oxidasa del NADPH y el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico, son ejemplos del primer tipo, estos actúan modulando la actividad de las enzimas que son responsables de la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (DeCoursey & Ligeti, 2005). Las del segundo tipo, tienen como función reparar el daño que han provocado las ROS y RNS en el ADN celular o en las membranas, entre estas están las lipasas, las transferasas y las proteasas (Evans et al., 2004). Finalmente, las reductoras o neutralizantes, son aquellas que se especializan en catalizar las especies reactivas y controlar la producción de antioxidantes y se caracterizan por utilizar como cofactores, oligoelementos tales como el zinc, el cobre, el magnesio, entre otros (Masella et al., 2005).

Una de las enzimas antioxidante neutralizadora más importante es la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1), más conocida como SOD, esta tiene como función catalizar la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrogeno y oxígeno molecular (O₂), tal como se muestra en la reacción (1), está fue la primera enzima que se descubrió que actuaba sobre un radical libre (McCord & Fridovich, 1969).



Otra enzima de igual importancia es la catalasa (EC 1.11.1.6) o también conocida como CAT, es una hemoproteína que se ubica principalmente en los peroxisomas y mitocondrias, encargándose de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (reacción 2) (Aebi, 1984), además, se caracteriza por su alta capacidad de reacción, pero también, por su poca afinidad por el sustrato.



Por último, está la glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9), también conocida como GPx, es una selenoproteína, que en presencia de glutatión reducido (GSH), tiene la capacidad de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente (Power & Lennon, 1999). Esta enzima presenta cuatro isoformas:

- GSH – Px celular; esta se encuentra presente en todas las células y como se mencionó anteriormente, reduce el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos.
- GSH – Px plasmática o extracelular; se caracteriza por ubicarse en el plasma humano y se sintetiza en las células proximales al riñón (Arthur, 2000).
- GSH – Px fosfolípido hidroperóxido; cumple la función de proteger contra la lipoperoxidación, además de prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja intensidad (Arthur, 2000).
- GSH – Px gastrointestinal; su función es reducir los hidroperóxidos de colesterol, además, de proteger contra la toxicidad provocada por la ingestión de hidroperóxidos lipídicos (Holben & Smithe, 1999).

Si bien, catalasa y glutatión peroxidasa cumplen la misma función de descomponer el H_2O_2 , sus mecanismos de regulación son diferentes, puesto que, se ha observado que ambas enzimas no actúan al mismo tiempo, por un lado, catalasa actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, por otro lado, glutatión peroxidasa lo hace a concentraciones mínimas, lo que demuestra que hay una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas (Cisneros et al., 1997).

En general, todos los animales cuentan con un sistema antioxidante defensivo que les permite evitar y/o reparar los daños provocados por la ROS, estando compuesto por enzimas y otros antioxidantes de baja masa molecular (Fridovich, 2004).

Entre las distintas razones que tienen como finalidad provocar un aumento en la producción de ROS, está el fenómeno conocido como ciclos de hipoxia y reoxigenación, es decir, cuando el organismo se encuentra sometido a grandes oscilaciones en la concentración de oxígeno (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002; Clanton, 2007). Este suceso es muy común en regiones intermareales, donde ocurren variaciones abruptas en los niveles de oxígeno disuelto (Smith & Able, 2003), siendo un gran problema para los animales que habitan en estos lugares, ya que reciben distintos tipos de daño oxidativo (Lesser, 2006). Algunos organismos aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes durante los estados de hipoxia/anoxia, con el objetivo de evitar el estrés oxidativo, mientras que otras especies, principalmente las que viven en zonas de bajo oxígeno, son capaces de expresar niveles altos de componentes antioxidantes, e incluso, bajo supresión de oxígeno (Gorr et al., 2010; Welker et al., 2013).

Se conoce que conforme aumenta la tasa de consumo de O_2 , la producción de ROS aumenta proporcionalmente (Alvarez et al. 2003; Fridovich 2004), es decir, si en condiciones de reoxigenación aumenta la producción de ROS, entonces, en medios hipóxicos, tendería a disminuir su producción. No obstante, estudios han demostrado que hay un aumento en el daño oxidativo (Maiti et al., 2006), y aunque se desconoce el mecanismo que permite que se originen en estas condiciones, diversas investigaciones han sugerido que son producidos en el complejo III de la cadena transportadora de electrones, el cual permite la accesibilidad del oxígeno en hipoxia (Chandel et al. 1998; Waypa y Schumacker 2002).

El sistema de defensa antioxidante ha sido uno de los indicadores que evalúa el nivel de estrés oxidativo que presentan distintos organismos frente a una situación de hipoxia/reoxigenación (Abele & Puntarulo, 2004), no obstante, son pocos los estudios que han prestado atención al metabolismo de las ROS en los crustáceos durante tales ocasiones (Geihs et al., 2016), siendo considerados entre las especies acuáticas, sensibles

a la hipoxia en comparación a moluscos y peces (Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008). Además, los pocos estudios que han evaluado los efectos de la hipoxia en el sistema de defensa antioxidante de los crustáceos, solo se han centrado en especies tolerantes a esta condición, sugiriendo que estos organismos presentan una respuesta preparatoria que anticipa en su sistema una forma de prevenir el estrés oxidativo (Zenteno-Savín et al. 2006; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín 2011; Lawniczak et al. 2013).

Los eufáusidos (o kril, como son comúnmente conocidos), son pequeños crustáceos pertenecientes al zooplancton, los cuales son capaces de formar agregaciones muy densas en zonas de surgencia costera (Brinton et al., 2000), y, sobre todo, son organismos clave en muchos ecosistemas oceánicos, puesto que, al alimentarse de fitoplancton, vinculan la producción primaria con muchos depredadores de niveles tróficos más altos al formar parte de la dieta básica de estos (Everson, 2000). Estos organismos se caracterizan por realizar importantes recorridos durante sus migraciones verticales a lo largo de la columna de agua alcanzando zonas mínimas de oxígeno (Escribano et al., 2000), e incluso, tolerar condiciones extremas asociados con ambientes anóxicos y elevadas $p\text{CO}_2$, como en el caso de *Euphausia eximia* en el norte de Chile (Riquelme-Bugueño et al., 2020), la cual es capaz de soportar estas condiciones durante un prolongado período de tiempo. Los eufáusidos adultos (e incluso las larvas) son capaces de regular su metabolismo a distintas concentraciones, ya sea de oxígeno, $p\text{CO}_2$, u otro (Quetin & Ross, 1989).

La especie endémica del Sistema de Corriente de Humboldt, *Euphausia mucronata* G.O. Sars, 1883, es una de los eufáusidos más abundantes (Riquelme-Bugueño et al., 2012), sobre todo en la costa del país (Riquelme-Bugueño et al., 2015), este al igual que *Euphausia eximia*, también migra verticalmente hasta el núcleo de la zona mínima de oxígeno (OMZ) (Antezana, 2009), es decir, a profundidades de alrededor de 250 m (Grados, 1989). La OMZ actúa como una barrera muy efectiva para diversos organismos, pero a la vez, ofrece un gran cantidad de alimento y refugio para las especies que se encuentran aclimatadas para habitar en esas condiciones (Wishner et al., 1995), puesto que, la hipoxia severa que hay dentro de esta zona, en el Ecosistema de la Corriente de Humboldt (HCE), puede llegar a limitar la extensión vertical de una gran cantidad de

organismos pertenecientes al zooplancton, a excepción de algunas especies de *Euphausia* (Brinton, 1979, Antezana, 1978, Antezana, 2002).

El objetivo de este trabajo es determinar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa en el kril *E. mucronata*, frente a condiciones de hipoxia con alta y baja $p\text{CO}_2$ en el laboratorio, durante 4 y 8 horas.



HIPÓTESIS

La actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT será mayor en individuos expuestos durante 4 horas a hipoxia con alta y baja $p\text{CO}_2$ que a los eufáusidos que están en condiciones de normoxia durante 4 y 8 horas. Por otro lado, entre los organismos expuestos a hipoxia, los que en están en el tratamiento con alta $p\text{CO}_2$ tendrán una mayor actividad de SOD y CAT, en comparación a los que se encuentran en hipoxia con baja $p\text{CO}_2$.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa en eufáusidos adultos (*Euphausia mucronata*) expuestos a condiciones de normoxia e hipoxia con alta y baja $p\text{CO}_2$ durante 4 y 8 horas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir la actividad de SOD y CAT en eufáusidos (*Euphausia mucronata*) expuestos a tratamientos de normoxia e hipoxia durante 4 y 8 horas.
- Medir la concentración de proteínas en los eufáusidos y usarlo en el cálculo de actividad específica de cada enzima.
- Comparar los resultados obtenidos entre tratamientos usando las medias \pm desviación estándar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de área de estudio y obtención de muestras

Los eufáusidos fueron extraídos de la estación 18 (36°30.80 S; 73°07.750 W), la cual se encuentra ubicada a 18 millas (aproximadamente 29 km desde la costa) frente a la Bahía de Dichato. El muestreo fue realizado durante la madrugada del 20 de octubre de 2021, a bordo del buque de investigación de la Universidad de Concepción “Kay-Kay II”. Para la captura de los organismos, se utilizó una red Viva o cónica con copo no filtrante. Estos fueron transportados en un cooler al laboratorio de la estación de biología marina de la Universidad de Concepción, junto con otros organismos zooplanctónicos. Posteriormente, se separaron los eufáusidos que estaban en óptimas condiciones en un recipiente de vidrio durante un período de 2 horas antes de realizar el experimento.

Diseño experimental

El experimento consistió en tres tratamientos, un control en condiciones de normoxia (18 kPa, 5,56 ml O₂/L), mientras que los otros dos tratamientos estuvieron expuestos a un medio hipóxico (3 kPa, 0,93 ml O₂/L), uno con alta pCO₂ (1400 μatm) y el otro con baja pCO₂ (400 μatm). Para lograr las condiciones de hipoxia, se burbujearon mezclas de gases en dos botellas con agua de mar filtrada. La incubación se realizó en botellas de 250 ml selladas con un tapón hermético. Cada tratamiento presentaba 3 réplicas, con 5 individuos cada uno (en total 15 individuos por tratamiento), en condiciones controladas de temperatura (11,5°C). Este experimento se realizó en dos períodos de tiempo, durante 4 y 8 horas. Cada 2 horas se contabilizó el número de organismos vivos por botella. Al finalizar cada incubación, los individuos vivos de cada tiempo fueron puestos en crioviales etiquetados individualmente, dejados en nitrógeno líquido de forma inmediata, y conservados en un freezer a -80°C. Se midió el pH del agua de cada botella al inicio y al final del experimento.

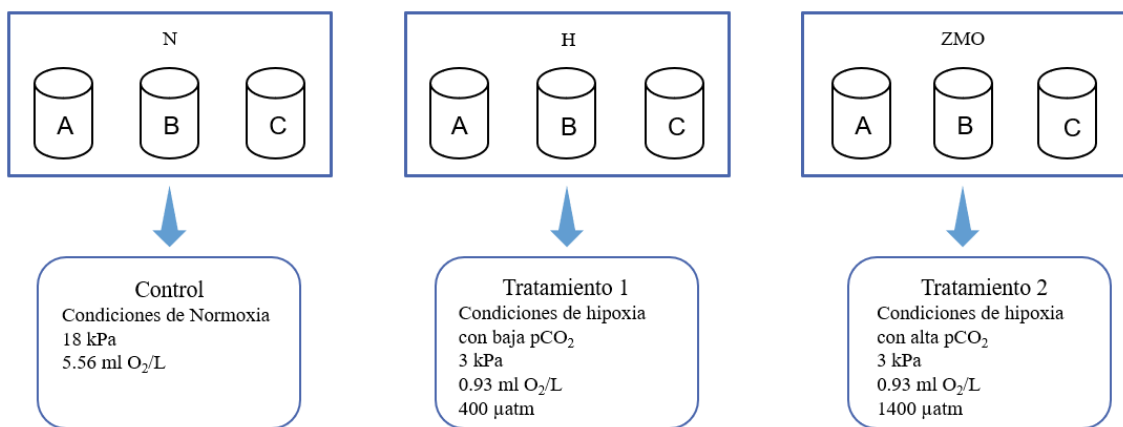


Figura N°2.- Esquema del diseño experimental.

Datos de sobrevivencia

Se graficaron los datos de sobrevivencia tomados cada 2 horas durante la realización de las incubaciones. Para los 3 tratamientos, se ajustó una curva para obtener la ecuación de la curva y así calcular el LC₅₀. Los gráficos fueron realizados en el programa RStudio, utilizando el sistema organizado de visualización de datos “ggplot2”.

Análisis bioquímicos


Se escogieron 3 individuos al azar de cada botella (36 individuos en total), se identificó la especie utilizando un estereoscopio y se pesó al organismo completo (sin los ojos). Se homogenizó cada muestra (usando al organismo completo) en un criovial rodeado de hielo, con buffer de fosfato (50 mM mezcla dibásica y monobásica de fosfato de potasio (K₂HPO₄/KH₂PO₄), 50 mM de EDTA y 1 mM de fluoruro de fenilmetanosulfonilo) agregando un volumen de 10 μL por cada mg de peso del organismo. Posteriormente, el homogenato fue cambiado a un tubo ependorf. Se centrifugó a 2800 rpm durante 20 min a una temperatura de entre 12 – 15 °C. Luego, el sobrenadante de cada homogenato fue dividida en tres tubos ependorf, 40 μL para medir SOD, 40 μL para CAT y el resto fue dejado para determinar la concentración de proteínas totales utilizando el método de Bradford. Finalmente, las muestras fueron congeladas a -20°C para el momento de su medición.

Determinación de la actividad de Superóxido dismutasa (SOD)

Para la medición de la actividad de superóxido dismutasa, se utilizó el método de ensayo indirecto postulado por McCord y Fridovich (1969), el cual consistió en generar aniones superóxidos a partir de la reacción de xantina y xantina oxidasa, este radical reacciona con la molécula detectora, Citocromo c, la cual es reducida y medida por espectrofotometría a 550 nm. Finalmente, con la presencia de la enzima, se observa la inhibición de la reacción.

El procedimiento consistió en enfriar la microplaca durante 10 minutos, posteriormente, a cada pocillo se agregaron 235 μL de buffer de fosfato (50 mM, pH 7.5), 30 μL de xantina (500 μM), 20 μL de citocromo c (150 μM), 6 μL de xantina oxidasa (0.15 mU/ μL) y 10 μL de muestra. Se midió cada 20 segundos en el lector de placas a 550 nm la inhibición de la reacción durante 4 min. Cada medición se realizó en triplicado y con un blanco sin muestra. Los resultados fueron expresados en unidades enzimáticas (USOD/mg de proteína), e indica la cantidad de enzima que inhibe la reducción de citocromo c por minuto.

Cálculo:


$$\text{USOD: } \frac{V_T}{\epsilon * d * V_m * C_{\text{proteína}}} \times \frac{(P_{\text{Blanco}} / P_{\text{Muestra}})}{\Delta t}$$

Donde:

V_T : Volumen total.

V_m : Volumen de la muestra.

ϵ : Coeficiente de extinción de la citocromo c.

d : Ancho del pocillo de la microplaca.

$C_{\text{proteína}}$: Concentración de proteínas totales.

P_{Muestra} : Pendiente.

Δt : Tiempo en que se forma la pendiente.

Determinación de la actividad de catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se midió por medio de la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno (Aebi, 1984). Antes de la medición, se agregó a los 40 μL de muestra, 10 μL de Tritón X-100, con la finalidad de lisar las membranas de los peroxisomas (y otros organelos), y liberar la enzima. Luego se dejó incubar durante 5 min

en hielo, y finalmente, se centrifugó a 2800 rpm a una temperatura de entre 14 – 15 °C en un período de 10 min.

El procedimiento consistió en agregar a la cubeta 10 µL muestra, 30 µL de H₂O₂ (al 1%), y al final 540 µL de buffer de fosfato 50 mM (sin EDTA a pH 7.0). Colocar de inmediato en el lector de placa y medir la absorbancia a 240 nm cada 10 segundos durante 20 minutos. Los resultados fueron expresados en unidades enzimáticas de CAT (UCAT/mg de proteína), donde 1 UCAT equivale al consumo de 1 µmol de sustrato consumido por minuto.

Cálculo:

$$\text{UCAT: } \frac{V_T}{\epsilon * d * V_m * C_{\text{proteína}}} \times \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t}$$

Donde:

V_T: Volumen total.

V_m: Volumen de la muestra.

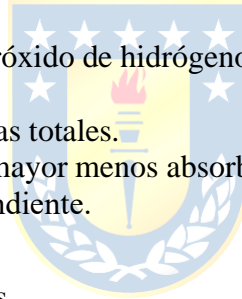
ε: Coeficiente de extinción del peróxido de hidrógeno.

D: Ancho de la cubeta.

C_{proteína}: Concentración de proteínas totales.

Δabs: Resta entre la absorbancia mayor menos absorbancia menor.

Δt: Tiempo en que se forma la pendiente.



Determinación de proteínas totales

Para determinar la concentración de proteínas totales, se utilizó el método de Bradford. Primero se preparó una curva de calibración con estándar de BSA. Después se tomaron 5 µL de cada muestra y de las muestras de la curva de calibración y se depositaron en una microplaca. Se agregaron 250 µL de azul de Comassie a cada pocillo de la microplaca. Ya dentro del lector de placas, se programó una agitación de 15 segundos y se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm. Para los cálculos, se elaboró la curva de calibración en Excel, se obtuvo la ecuación de la recta y se reemplazó “y” (absorbancia) para obtener el valor de “x” (concentración) de cada muestra.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las mediciones de actividad de las enzimas y concentración de proteínas fueron expresados como media \pm desviación estándar. Se aplicaron las pruebas Shapiro-Wilk y Fligner-Killeen para determinar la distribución normal de los datos y la homogeneidad de varianza, respectivamente. Para el caso de la actividad de las enzimas SOD y CAT, al no cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se les aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que, a los valores de la concentración de proteínas, al cumplir con los supuestos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para el método de comparación Post-Hoc para la prueba de Kruskal-Wallis, se aplicó la prueba de Mann-Whitney (corrección de Holm), mientras que, para el ANOVA, se realizó la prueba de TukeyHSD. Para todos los casos, se utilizó un valor de $p < 0.05$ como criterio estadístico para revelar diferencias significativas. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas en el programa Rstudio.



RESULTADOS

Los organismos que estuvieron en los tratamientos de hipoxia (H) e hipoxia con alto $p\text{CO}_2$ (ZMO) (Figura N°2), presentaron el 100% de sobrevivientes las primeras 4 horas. Sin embargo, mostrando una disminución en el porcentaje de sobrevivencia a las 6 horas (H: $13.3 \pm 11.54\%$ y ZMO: $53.3 \pm 11.54\%$). Finalmente, a las 8 horas el porcentaje de sobrevivientes fue 0% en ambas pruebas. El tratamiento de normoxia (N), mantuvo un 100% de sobrevivencia toda la incubación. Por otro lado, los organismos que estuvieron en los tratamientos H y N durante 4 horas mantuvieron el 100 % de sobrevivencia (Figura N°2), mientras que, en el tratamiento ZMO, la sobrevivencia disminuyó a la hora 4 ($92.9 \pm 11.54\%$).

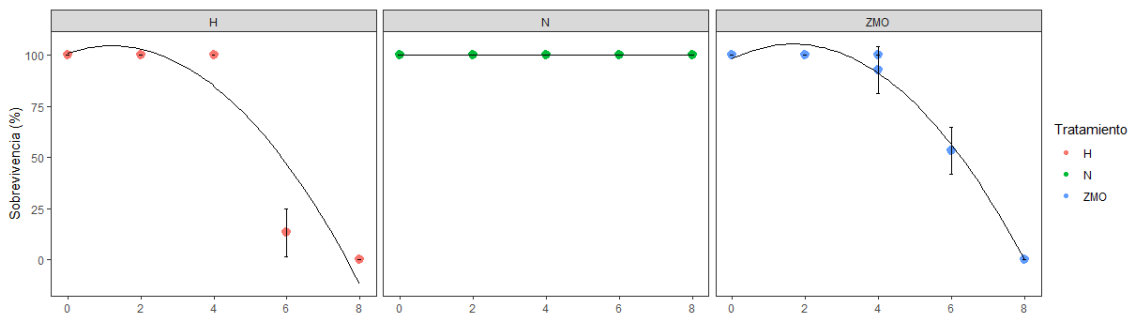


Figura N°3. – Porcentaje de sobrevivencia de los eufáusidos expuestos a los tratamientos de normoxia (N), hipoxia (H) e hipoxia con alto $p\text{CO}_2$ (ZMO) durante 4 y 8 horas.

Durante la realización del experimento de incubación, los eufáusidos que se encontraban en los tratamientos de hipoxia con alta y baja $p\text{CO}_2$, mostraron un comportamiento distinto a los que estaban en normoxia. A la hora 2, dejaron de nadar y quedaron al fondo de la botella, en comparación a los de normoxia, los cuales continuaron nadando.

El LC_{50} del tratamiento H fue a las 5 horas y 56 min aproximadamente, mientras que, para el tratamiento ZMO fue cerca de las 6 horas y 16 min.

Actividad de la enzima superóxido dismutasa. –

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de normoxia N4 (4 horas) y N8 (8 horas) ($p = 0.439$), entre N4 y los tratamientos ZMO y H ($p = 0.439$), ni tampoco entre ZMO y H ($p = 0.753$). Mientras que si lo hubo entre N8 y los tratamientos ZMO y H ($p = 0.032$).

Como se observa en el gráfico de la Figura N°3, la mayoría de los individuos mostraron actividad enzimática frente a condiciones de hipoxia con alta y baja $p\text{CO}_2$. Por otro lado, en los tratamientos de normoxia, los organismos que estuvieron 8 horas no mostraron actividad, mientras que los que estuvieron 4 horas, solo 2 eufáusidos si lo hicieron.

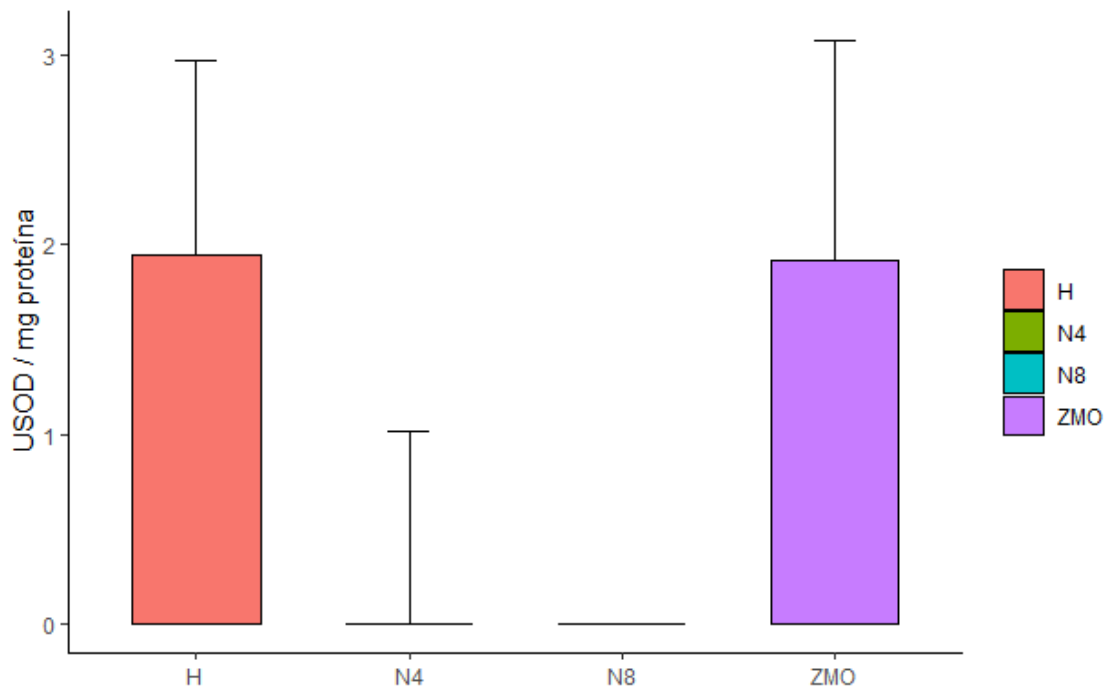


Figura N°4. – Actividad específica de la enzima SOD (media \pm desviación estándar) en *Euphausia mucronata* en cuatro tratamientos. Los valores están expresados en USOD/mg de proteína. N4: Normoxia durante 4 horas. N8: Normoxia durante 8 horas. ZMO: Hipoxia con alta $p\text{CO}_2$. H: Hipoxia con baja $p\text{CO}_2$.

Actividad de la enzima catalasa. –

No se encontraron diferencias significativas de las medias entre ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo, catalasa mostró actividad en cada uno de los tratamientos, siendo el tratamiento ZMO, el que mostró la media más alta entre los cuatro (0.0048 ± 0.005 UCAT/mg proteína), mientras que N8 fue la más baja (0.0008 ± 0.002 UCAT/mg proteína).

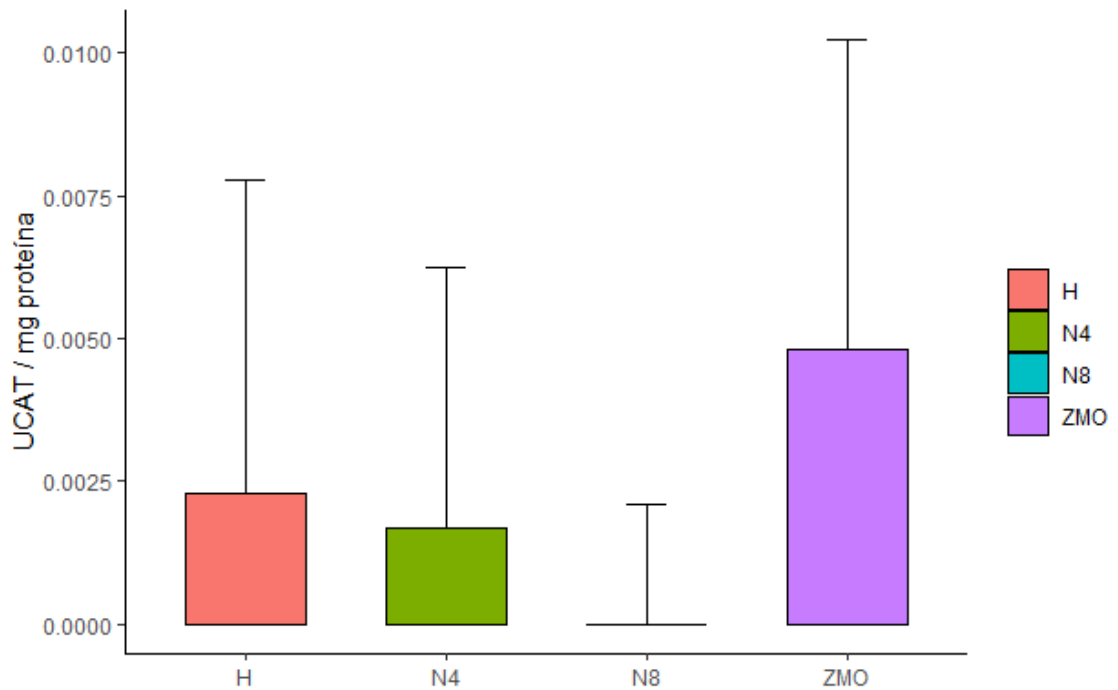


Figura N°5. – Actividad específica de la enzima CAT (media \pm desviación estándar) en *Euphausia mucronata* en cuatro tratamientos. Los valores están expresados en UCAT/mg de proteína. N4: Normoxia durante 4 horas. N8: Normoxia durante 8 horas. ZMO: Hipoxia con alta pCO_2 . H: Hipoxia con baja pCO_2 .

DISCUSIÓN

Euphausia mucronata mostró tolerancia a la hipoxia durante las primeras 4 horas, no obstante, a la hora 2 estos habían dejado de nadar dentro de la botella y precipitaron al fondo de esta. Mismo comportamiento fue reportado por Tremblay y Abele (2016), cuyo estudio tenía como uno de sus objetivos, realizar mediciones de respiración a tres especies de kril. Ellas indicaron que a los 6.3 kPa, *E. mucronata* comienza a realizar la respiración anaeróbica adicional. Sin embargo, recalcan que ningún individuo murió por debajo de este punto, lo cual, fue contrario a la situación que se observó en nuestro estudio, donde a la hora 6, en el tratamiento H y ZMO la sobrevivencia había disminuido a un 13.3% y 53.3%, respectivamente. No obstante, la concentración de oxígeno en nuestros tratamientos fue de 3 kPa, casi la mitad al valor reportado por Tremblay y Abele (2016), lo que probablemente explica la discrepancia.

En este estudio se observó que, en condiciones de hipoxia, la actividad de la enzima superóxido dismutasa aumentó de manera significativa, en comparación a los tratamientos de normoxia. Sin embargo, los valores obtenidos fueron considerablemente bajos, los cuales no superaron los 2 USOD/mg de proteínas, en comparación a los reportados por Tremblay & Abele en 2016 (cerca a 160 USOD/mg de proteínas). Por otro lado, la enzima Catalasa no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, además, de presentar valores muy por debajo a los obtenidos por Tremblay y Abele en 2016. No obstante, los resultados mostrados en ese trabajo toman en consideración la actividad de esta enzima durante la hipoxia y la reoxigenación, mientras que, en este estudio, solo están los valores en hipoxia. Es importante resaltar esta diferencia, puesto que, hay investigaciones que han reportado que la actividad de la enzima catalasa aumenta durante la reoxigenación (Geihs et al., 2016).

Generalmente, a parte de las defensas antioxidantes, muchos organismos son capaces de afrontar condiciones de hipoxia a través de estrategias metabólicas, entre estas están, la reducción de la tasa metabólica (Hochachka & Lutz, 2001), así como también, cambios en el aporte de vías aeróbicas y anaeróbicas al metabolismo total (Virani & Rees, 2000; González & Quiñones, 2002). Además, bajo condiciones de hipoxia “severa”, la mayor parte de las contribuciones vienen en cierta medida de las vías metabólicas anaeróbicas

(Virani & Rees, 2000). Por ejemplo, en *E. mucronata*, se observó un aumento de la enzima lactato deshidrogenasa (enzima involucrada en la glucólisis), lo cual es congruente con la capacidad de este eufáusido para realizar migraciones verticales diarias a través de la OMZ (González & Quiñones, 2002). Por lo tanto, cada especie dentro del grupo de los crustáceos puede mostrar distintas estrategias como defensa antioxidante ante el aumento de especies reactivas causado, por ejemplo, por la temperatura, la concentración de oxígeno o de algún metal (Frías-Espicueta et al., 2022; Madeira et al., 2018).

El aumento de la actividad enzimática de SOD, CAT, y otras enzimas durante la hipoxia, es uno de los principales mecanismos que protegen al individuo ante el estrés oxidativo. Sin embargo, es importante resaltar el rol de la mitocondria frente al aumento de ROS, puesto que, los ciclos de hipoxia/reoxigenación presentan cierto efecto sobre este organelo. Efectivamente, se ha reportado que la reoxigenación afectaría gravemente la función mitocondrial en los invertebrados en vista de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Por otro lado, hay especies que son capaces de soportar largos períodos a niveles bajos de oxígeno, sugiriendo que esta capacidad está relacionada probablemente a adaptaciones del tipo mitocondrial (Menze et al., 2005). En efecto, este último podría ser el caso de *E. mucronata*, ya que se conoce que este eufáusido es capaz de tolerar niveles bajos de oxígeno al momento de migrar desde la superficie hasta el núcleo de la OMZ (Antezana, 2009). No obstante, no todos los eufáusidos se comportan de la misma manera, hay algunos que no bajan más allá del límite superior de la OMZ, como en el caso del eufáusido *Nyctiphanes simplex*, el cual es sensible a las altas temperaturas y a bajas concentraciones de oxígeno, exhibiendo evidencia de estrés oxidativo (Tremblay et al., 2010). Además, un punto importante a tener en consideración es la relación que hay entre la generación de ROS y la fuga mitocondrial de protones (H^+), puesto que existe una reciprocidad entre ambas, donde se ha evidenciado que la fuga de protones disminuye la generación de ROS, y por otro lado, las ROS inducen la fuga de protones (Brookes, 2005).

Otro aspecto importante que se observó en nuestro estudio, fueron la respuesta de los eufáusidos a los dos niveles de pCO_2 presentes en los tratamientos de hipoxia. De hecho,

en condiciones donde hay presencia de una mayor cantidad de CO₂, los individuos son capaces de aclimatarse y tolerar de mejor manera los niveles bajos de oxígeno. Mientras, que, a niveles bajo de *p*CO₂, los organismos presentaron un porcentaje menor de sobrevivencia a las 6 horas, lo que sugiere que la presencia de la *p*CO₂ a cierto nivel es importante para que el organismo pueda sobrellevar el estrés oxidativo causado por la hipoxia.

Se ha descubierto que el CO₂ es capaz de interactuar con varias especies de radicales libres y, dependiendo de distintos factores, puede propagar o inhibir las reacciones en cadena de los radicales libres (Vesela & Wilhelm, 2002). Por ejemplo, en el plasma sanguíneo del ser humano, el CO₂ cumple un papel fundamental en la estabilización del complejo hierro-transferrina, puesto que, la capacidad de esta molécula al unirse al hierro permite que la transferrina proteja las células del daño oxidativo (Vesela & Wilhelm, 2002). Finalmente, Vesela y Wilhelm (2002) indican que el CO₂ presenta un papel dual dentro de la célula, ya que, en un ambiente acuoso, esta molécula es capaz de eliminar RNS evitando la nitración y el daño oxidativo. Sin embargo, en un ambiente no polar de las membranas, puede propagar reacciones de radicales libres e intensificar el daño oxidativo.

Aunque no se ha investigado a fondo el rol del CO₂ en el estrés oxidativo en crustáceos, este sigue siendo un tema de interés debido al futuro escenario previsto para muchos años después, donde el CO₂ jugará un papel importante en la acidificación de los océanos, tanto en la zona costera, como en el océano abierto. Por lo tanto, es necesario más estudios que tengan como finalidad confirmar el rol que cumple el CO₂ en la defensa antioxidante, así como también en otros mecanismos celulares de los crustáceos en condiciones hipóxicas y con alta *p*CO₂.

En conclusión, a pesar de que este estudio contribuye a uno de los primeros trabajos en determinar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en el kril *Euphausia mucronata*, aún es necesario el estudio de ciertos puntos importantes para comprender a grandes rasgos el estrés oxidativo en esta especie de eufáusido causado por la hipoxia presente en la OMZ.

BIBLIOGRAFÍA

Abele D, Puntarulo, S (2004) Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A* 138:405–415

Aebi H (1984) [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.

Alvarez S, Valdez L, Zaobornyj T, Boveris, A (2003) "Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(3): 771-775.

Antezana T (1978) Distribution of euphausiids in the Chile–Perú Current with particular reference to the endemic *E. mucronata* and the oxygen minimum layer. Ph.D. Thesis, Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego. (*Dissertation Abstracts International* 39(8), 1–476 pp).

Antezana T (2002) Vertical distribution and diel migration of *Euphausia mucronata* in the oxygen minimum layer of the Humboldt Current J. Färber Lorda (Ed.), *Oceanography of the Eastern Pacific*, vol. 2, Editorial CICESE, Mexico, pp. 13-28

Antezana T (2009) Species-specific patterns of diel migration into the Oxygen Minimum Zone by euphausiids in the Humboldt Current Ecosystem. *Progress in Oceanography*, 83(1-4), 228-236.

Arthur J (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 57: 1825 – 1835.

Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee R (1999) Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.* 77: 658-666.

Betteridge D (2000) What is oxidative stress? *Metabolism.* 49: 3-8.

Brinton E (1979) Parameters relating to the distributions of planktonic organisms, especially Euphausiids in the eastern tropical Pacific. *Progress in Oceanography*, 8, pp. 125-189

Brinton M, Ohma, A, Townsend M, Knight A (2000) Bridgeman Euphausiids of the World Ocean, Series: World Biodiversity Database CD-ROM Series Window 1.0 Expert Center for Taxonomic Identification, Amsterdam, Netherlands

Brookes P (2005) Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 12-23.

Carvajal C (2019) Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.

Chandel N, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu C, Simon M, Schumacker P (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95(20): 11715

Chang B, College W (2002). Elementos no metálicos y sus compuestos. In McGraw-Hill/Interamericana Editores (ed) *Química*, séptima edición. México, pp 839-876.

Cisneros E, Pupo J, Céspedes E (1997) Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 16(1), 10-15.

Clanton T (2007) Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102:2379–2388.

DeCoursey T, Ligeti E (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci.* 62:2173-93.

Di Meo S, Reed T, Venditti P, Victor V (2016) Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-44.

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95

Escribano R, Marín V, Irribarren C (2000) Distribución de *Euphausia mucronata* en la zona de surgencia de la Península de Mejillones, norte de Chile: la influencia de la capa mínima de oxígeno. *Sci. Mar.* 64(1): 69-77.

Evans M, Dizdaroglu M, Cooke M (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res.* 567:1-6

Everson I (2000) *Krill: Biology, Ecology and Fisheries.* Wiley-Blackwell.

Frías-Espéricueta M, Bautista-Covarrubias J, Osuna-Martínez C, Delgado-Alvarez C, Bojórquez C, Aguilar-Juárez M, Roos-Muñoz S, Osuna-López I, Páez-Osuna F (2022) Metals and oxidative stress in aquatic decapod crustaceans: A review with special reference to shrimp and crabs. *Aquatic Toxicology*, 242, 106024.

Fridovich I (2004) Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell* 3:13–16

García J, García B, Morin M, Céspedes E, Clapes S, Etienne O (1993) Radicales libres: impacto médico. *BEB (México)*, 13(3), 75-83.

Geihs M, Vargas M, Maciel F, Vakkuri O, Meyer-Rochow V, Allodi S, Nery L (2016) Effects of hypoxia and reoxygenation on the antioxidant defense system of the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 186(5), 569-579.

Grados M (1989) Variabilidad del régimen hídrico del codo peruano-chileno. *Memorias del Simposio Internacional de los Recursos Vivos y las Pesquerías en el Pacífico Sudeste.* CPPS Review Pacífico Sur (número especial), 95–105.

Green M, Hill H (1984) *Methods en Enzymol*, 105: 3-9.

Gonzalez R, Quiñones R (2002) Ldh activity in *Euphausia mucronata* and *Calanus chilensis*: implications for vertical migration behaviour. *Journal of Plankton Research*, 24(12), 1349-1356.

Gorr T, Wichmann D, Hu J, Hermes-Lima M, Welker A, Terwilliger N, Wren J, Viney M, Morris S, Nilsson G, Deten A, Soliz J, Gassmann M (2010) Hypoxia tolerance in animals: biology and application. *Physiol Biochem Zool* 83:733–752

Halliwell B, Aruoma O (1991) DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281:9-19.

Halliwell B (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews.* 52:253-65.

Halliwell B, Gutteridge J (1999) Oxidative stress: Adaptation, damage, repair and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd edition. New York: Oxford University Press.

Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and cell culture. How should you do it and what does it mean? *Br J Pharmacol.* 142:231-55.

Halliwell B, Rafter J, Jenner A (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr.* 81:268-76.

Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C* 133:537–556

Hochachka P, Lutz P (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals☆. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 130(4), 435-459.

Holben D, Smithe A (1999) The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc.* 99: 836 – 843.

Lawniczak M, Romestaing C, Roussel D, Maazouzi C, Renault D, Hervant F (2013) Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean. *Comp Biochem Physiol A* 165:299–303

Larkins N (1999) Free radical biology and pathology. *J Equine Vet Sci.* 19: 84- 89.

Lay S, Simard G, Martinez M, Andriantsitohaina R (2014) Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-18.

Lesser M (2006) Oxidative stress in marine environments. *Biochem Physiol Ecol Ann Rev Physiol* 68:253–278

Llesuy S (2002) Introducción y especies activas de oxígeno. En: *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Argentina. Editora: ULBRA. 22-32.

Lozada S, García L (2009) Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 17(3), 172-179.

Madeira C, Leal M, Diniz M, Cabral H, Vinagre C (2018) Thermal stress and energy metabolism in two circumtropical decapod crustaceans: Responses to acute temperature events. *Marine environmental research*, 141, 148-158.

Maiti P, Singh S, Sharma A, Muthuraju S, Banerjee P, Ilavazhagan G (2006) Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochemistry international*, 49(8), 709-716.

Mandavilli B, Van Houten B (2002) Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research*. 509 (1-2): 127-132.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *J Nutr Biochem*. 16:577-86.

Mates J, Pérez-Gómez C, De Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 32:5

McCord J, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.

Meneghini R (1987) toxicidade do oxigenio. Ciencia Hoje. 57-62.

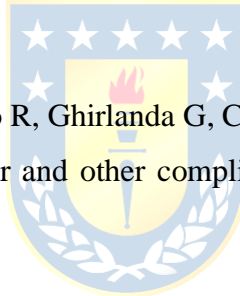
Menze M, Hutchinson K, Laborde S, Hand S (2005) Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 289(1), R68-R76.

Mittal M, Siddiqui M, Tran K, Reddy S, Malik A (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. Antioxidants and Redox Signaling, 20(7), 1126-1167.

Nichols D, Ferguson J (2001) Bioenergetics 3. Cuarta edición. Editora Academic Express, San Diego. 127-129.

Parrilla-Taylor D, Zenteno-Savín T (2011) Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. Aquaculture 318:379–383

Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C (2013) Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. Int J Mol Sci, 14, 21525-21550.



Possa N (2002) Estresse Oxidativo e Antioxidantes. Primera edición. Canoas-RS (Brasil). Editora da ULBRA.

Power S, Lennon S (1999) Analysis of cellular responses to free ra-dicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc Nutr Soc. 58: 1025 – 1033.

Quetin L, Ross R (1989) Effects of oxygen, temperature and age on the metabolic rate of the embryos and early larval stage of the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 133: 103–127.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K (2014) Oxidative stress, prooxidants, and Antioxidants: the interplay. BioMed Research International, 2014, 1-19.

Riquelme-Bugueño R, Núñez S, Jorquera E, Valenzuela L, Escribano R, Hormazábal S (2012) The influence of upwelling variation on the spatially-structured euphausiid community off central-southern Chile in 2007–2008. *Prog. Oceanogr.* 92: 146–165.

Riquelme-Bugueño R, Correa-Ramírez M, Escribano R, Núñez S, Hormazábal S (2015) Mesoscale variability in the habitat of the Humboldt Current krill, spring 2007. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(4): 2769-2783.

Riquelme-Bugueño R, Pérez-Santos I, Alegría N, Vargas C, Urbina M, Escribano R (2020) Diel vertical migration into anoxic and high-pCO₂ waters: acoustic and net-based krill observations in the Humboldt Current. *Scientific reports* 10(1): 1-11.

Sainz R, Lombo F, Mayo J (2012) Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers*, 4, 442-474.

Smith K, Able K (2003) Dissolved oxygen dynamics in salt marsh pools and its potential impacts on fish assemblages. *Mar Ecol Prog Ser* 258:223–232

Tremblay N, Gómez-Gutiérrez J, Zenteno-Savín T, Robinson C, Sánchez-Velasco L (2010) Role of oxidative stress in seasonal and daily vertical migration of three krill species in the Gulf of California. *Limnology and Oceanography*, 55(6), 2570-2584.

Tremblay N, Abele D (2016) Response of three krill species to hypoxia and warming: an experimental approach to oxygen minimum zones expansion in coastal ecosystems. *Marine Ecology*, 37(1), 179-199.

Vaquer-Sunyer R, Duarte C (2008) Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *PNAS* 105:15452–15457.

Vesela A, Wilhelm J (2002) The role of carbon dioxide in free radical reactions in organism. *Physiological research*, 51(4), 335-340.

Virani N, Rees B (2000). Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 126(3), 397-405.

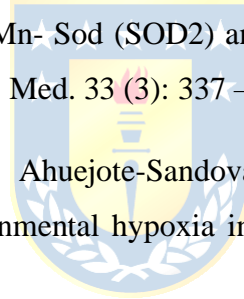
Waypa G, Schumacker P (2002) O₂ sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 132(1): 81-91.

Welker A, Moreira D, Campos E, Hermes-Lima M (2013) Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comp Biochem Physiol A* 165:384–404

Wishner K, Ashjian C, Gelfman C, Gowing M, Kann L, Levin L, Mullineaux L, Saltzman J (1995) Pelagic and benthic ecology of the lower interface of the eastern tropical Pacific oxygen minimum zone *Deep-Sea Research I*, 42 pp. 93-115

Zelko I, Mariani T, Foiz R (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu – Zn – SOD (SOD1), Mn- Sod (SOD2) and EC-Sod (SOD3) gene structures and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33 (3): 337 – 349

Zenteno-Savín T, Saldierna R, Ahuejote-Sandoval M (2006) Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp Biochem Physiol C* 142:301–308



ANEXO

Anexo 1.- Valores del peso (mg) de cada eufásido y volumen de buffer (μL) en los distintos tratamientos.

Tratamiento	Replica	N° del individuo	Peso (mg)	Volumen de buffer (μL)
Normoxia (8 horas)	1	1.1	26.8	268
		1.2	16	160
		1.4	19.4	194
	2	2.2	17.9	179
		2.3	40.2	402
		2.4	34.5	345
	3	3.2	40.5	405
		3.4	18.9	189
		3.5	17.7	177
Normoxia (4 horas)	4	4.1	20	200
		4.4	19.5	195
		4.5	20.8	208
	5	5.3	17	170
		5.4	40.7	407
		5.5	24.1	241
	6	6.2	41	410
		6.3	25.3	253
		6.4	17.1	171
ZMO (4 horas)	4	4.1	11.9	119
		4.3	13	130
		4.5	45.5	455
	5	5.1	22.8	228
		5.3	24.8	248
		5.4	19.6	196

Hipoxia (4 horas)	6	6.1	40.8	408
		6.2	26.3	263
		6.3	18.9	189
	4	4.1	77.9	779
		4.4	43.2	432
		4.5	34	340
	5	5.1	20	200
		5.2	30.7	307
		5.5	15.2	152
6	6.1	12.3	123	
	6.2	60.6	606	
	6.4	26.7	267	

Anexo 2.- Ecuación de la curva polinomial de grado 2 y su R^2 para cada tratamiento.

Tratamiento	Ecuación de la curva	R^2
Normoxia	$y = 100$	-
ZMO	$y = -2.634x^2 + 8.8222x + 98.198$	0.98
Hipoxia	$y = -2.5325x^2 + 6.1733x + 100.92$	0.86