



FACULTAD CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS
CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

“Tolerancia de juveniles de cabrilla (*Paralabrax humeralis* valenciennes, 1828) y chita (*Anisotremus scapularis* tschudi, 1846) a condiciones de bajo oxígeno”

Tesis para optar el título profesional de:
BIÓLOGA MARINA

Presentado por:
Rebeca Montero Taboada (0000-0001-8794-6349)

Asesor:
Arturo Aguirre Velarde (0000-0001-9175-9036)

Coasesor:
Giovanna Sotil Caycho (0000-0002-1583-8821)

Lima – Perú
2021



FACULTAD CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS
CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

“Tolerancia de juveniles de cabrilla (*Paralabrax humeralis* valenciennes, 1828) y chita (*Anisotremus scapularis* tschudi, 1846) a condiciones de bajo oxígeno”

Tesis para optar el título profesional de:
BIÓLOGA MARINA

Presentado por:

Rebeca Montero Taboada (0000-0001-8794-6349)

Asesor:

Arturo Aguirre Velarde (0000-0001-9175-9036)

Coasesor:

Giovanna Sotil Caycho (0000-0002-1583-8821)

Lima – Perú

2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 27 de agosto 2021.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Alfredo Rubén Palomino Ramos
Miembro: Mg. Daphne Kalen Su Pucheu
Miembro: Elgo. Jorge Alberto Soto Villanueva

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

"TOLERANCIA DE JUVENILES DE CABRILLA (PARALABRAX HUMERALIS VALENCIENNES, 1828) Y CHITA (ANISOTREMUS SCAPULARIS TSCHUDI, 1846) A CONDICIONES DE BAJO OXÍGENO"

Presentada por la/el estudiante/bachiller:

- **Rebeca Montero Taboada**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Marina

Asesorado por: Dr. Arturo Aguirre Velarde
Coasesora: Mg. Giovanna Elizabeth Sotil Caycho

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del estudiante de la carrera de Biología Marina en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) calificar a:

Tesis: Rebeca Montero Taboada		Nota (en letras): 16 (dieciséis)	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena ()	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()
	(X)		

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Mg. Alfredo Rubén Palomino Ramos
Presidente



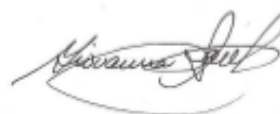
Mg. Daphne Kalen Su Pucheu
Miembro 1



Elgo. Jorge Alberto Soto Villanueva Rivas
Miembro 2



Dr. Arturo Aguirre Velarde
Asesor



Mg. Giovanna Elizabeth Sotil Caycho
Asesor

Dedicatoria

A mis padres Ricardo y Nieves quienes con su amor, paciencia y motivación me han permitido cumplir mis sueños.

A mis hermanas Raquel y Romina, y a mi sobrina Clara Mikela por su cariño y apoyo incondicional.

A mis abuelos, cuatro personas muy importantes que significan todo para mí, en especial a Irma y Emilio, sus recuerdos viven en mi corazón.

A mi familia en general, por haberme brindado todo su apoyo y compartir conmigo buenos y malos momentos.

A mis amigos y amigas más cercanos, ustedes saben quiénes son, por haberme escuchado y dado palabras de aliento cuando más lo necesitaba.

Por último, al pequeño River, por su compañía y amor incondicional.

Agradecimientos

A mis asesores, Dr. Arturo Aguirre y Mg. Giovanna Sotil por la orientación y ayuda brindada para la realización de esta tesis, su apoyo y paciencia me permitieron aprender mucho más.

Al Ing. Jhon Dionicio y a Blga. Maryandrea Rosado por todo su apoyo durante la realización del proyecto.

A mis papás, por todo el esfuerzo realizado y haberme formado como una persona con valores y perseverancia, motivándome siempre a cumplir mis sueños; mis logros se los debo a ustedes.

Índice

CARÁTULA	1
Acta de sustentación.....	4
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
CONTENIDO EN INGLÉS	10
Introduction.....	11
Materials and Methods.....	13
Results.....	17
Discussion.....	19
Acknowledgments.....	25
CONTENIDO EN ESPAÑOL	26
Introducción.....	26
Materiales y Métodos.....	27
Resultados.....	31
Discusión.....	32
Agradecimientos.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
FIGURAS Y TABLAS	46
ANEXOS	52

Resumen

La hipoxia es actualmente una de las mayores amenazas para los ecosistemas costeros del mundo, generando una mortalidad masiva de organismos marinos, pérdida de ecosistemas bentónicos y una disminución de la producción pesquera. Evaluamos y comparamos la tolerancia a la hipoxia de dos especies de diferentes hábitats de la costa peruana, la cabrilla *Paralabrax humeralis* y la chita *Anisotremus scapularis*. El efecto de la hipoxia se midió en función del tiempo de exposición (progresiva y crónica) sobre las respuestas conductuales y fisiológicas de las especies, así como sobre la actividad enzimática asociada a la respuesta al estrés oxidativo (LDH, SOD y AKP). La frecuencia ventilatoria (FV) se midió a dos temperaturas diferentes (16 y 22 ° C) en condiciones de hipoxia progresiva para determinar el punto crítico ventilatorio (Vcp). *A. scapularis* mostró un Vcp más alto que *P. humeralis*, el cual fue afectado positivamente por la temperatura. La mediana del tiempo letal (Lt50) de *A. scapularis* fue de 36 min al 60% de saturación de oxígeno, mientras que *P. humeralis* no mostró mortalidad después de 31 días de exposición al 5% de saturación de oxígeno. Para ambas especies, bajo hipoxia, se observó un aumento en la actividad de LDH en todas las muestras de tejido (branquias, hígado y músculo), un aumento en la actividad de SOD en hígado y sangre solo para *P. humeralis*, mientras que se observó una disminución en la actividad de AKP en ambas especies. La respuesta de *P. humeralis* a la hipoxia pasa por una reducción en la actividad y el metabolismo, por lo que esta especie puede considerarse tolerante a la hipoxia. Por otro lado, la respuesta de *A. scapularis* a la hipoxia prioriza los mecanismos de evitación y puede considerarse intolerante a la hipoxia. Estos resultados permiten comprender mejor la vulnerabilidad de ambas especies a la desoxigenación y el calentamiento global de los océanos, y desarrollar mejores estrategias para la gestión sostenible de la pesca y la acuicultura.

Palabras clave: Hipoxia, peces marinos, fisiología, estrés oxidativo, punto crítico de oxígeno, frecuencia ventilatoria.

Abstract

Hypoxia is currently one of the greatest threats to the world's coastal ecosystems, generating massive mortality of marine organisms, loss of benthic ecosystems and a decrease in fishery production. We evaluated and compared the hypoxia tolerance of two species from different habitats of the Peruvian coast, the Peruvian rock seabass *Paralabrax humeralis* and the Peruvian grunt *Anisotremus scapularis*. The effect of hypoxia was measured in function of the exposure time (progressive and chronic) on the behavioral and physiological responses of the two species, as well as on the enzymatic activity associated with the oxidative stress response (LDH, SOD and AKP). The ventilatory frequency (VF) was measured at two different temperatures (16 and 22 °C) under progressive hypoxia conditions to determinate the ventilatory critical point (Vcp). *A. scapularis* showed a higher Vcp than *P. humeralis*, which was positively affected by temperature. The median lethal time (Lt50) of *A. scapularis* was 36 min at 60% of oxygen saturation, while *P. humeralis* did not show mortality after 31 days of exposure at 5% oxygen saturation. For both species, under hypoxia, an increase in LDH activity was observed in all tissue samples (gill, liver and muscle), an increase in SOD activity in liver and blood only for *P. humeralis*, while an observed decrease in AKP activity in both species. *P. humeralis* response to hypoxia goes through a reduction in activity and metabolism, so this species can be considered as hypoxia-tolerant. On the other hand, *A. scapularis* response to hypoxia prioritizes avoidance mechanisms, and can be considered as hypoxia-intolerant. These results allow to better understand the vulnerability of both species to ocean global deoxygenation and warming, and to develop better strategies for sustainable fisheries and aquaculture management.

Key words: Hypoxia, marine fish, physiology, oxidative stress, oxygen critical point, ventilatory frequency.

Tolerance of juvenile Peruvian Rock Seabass (*Paralabrax humeralis* Valenciennes, 1828) and Peruvian grunt (*Anisotremus scapularis* Tschudi, 1846) to low oxygen conditions

Montero-Taboada, Rebeca^{1,2}

Sotil, Giovanna²

Dionicio-Acedo, Jhon²

Rosado-Salazar, Maryandrea²

Aguirre-Velarde, Arturo²

¹Universidad Científica del Sur, Carretera Panamerica Sur Km 19, Villa el Salvador, Lima, Peru

²Instituto del Mar del Perú, Esquina General Valle y Gamarra S/N, Chucuito, Callao, Peru

Correspondence author:

Montero-Taboada, Rebeca

446 Juan Guillermo Moore

Lima, Santa Anita 15008

Peru

rebecamonttab@gmail.com

Introduction

In the last few decades, the concentration of dissolved oxygen (DO) in coastal waters has been changing dramatically, generating oxygen depletion events in these areas around the world (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). Hypoxia is usually defined as the DO concentration in water that ranges from 2.0 ml l⁻¹ (~2.8 mg l⁻¹ or 30% saturation, Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008) to 0.0 ml l⁻¹, where reaches the point of anoxia (Claireaux and Chabot, 2016). Hypoxia can be the result of natural phenomena, such as vertical stratification in the water column (Levin et al., 2009; Rosenberg et al., 1991; Zhang et al., 2010), but also due to human activity (eutrophication process). Limitations in environmental oxygen can act as a restricting factor for the growth, reproduction, and distribution of aquatic species (Behrens, 2007; Kramer, 1987), however marine organisms exhibit several adaptive strategies, as well as different levels of tolerance to hypoxia (Burton and Heath 1980; Herbet and Steffensen, 2005; Ishibashi et al. 2002; Pichavant et al. 2002; Van Raaij et al. 1996). In fish, hypoxia can generate/initiate behavioral and sublethal responses, such as the species redistribution, which in turn can alter the interspecific competition for preys and/or habitat, and thus survival. It can also affect its feeding and growth rates and can induce a switch from aerobic to anaerobic metabolism. When they are not able to cope with hypoxia, it can eventually result in death (Claireaux et al., 2000; Fry, 1971; Hvas and Oppedal, 2019; Remen et al., 2016). Moreover, negative ecological consequences of hypoxic events include massive mortality of marine organisms and loss of populations (predominantly benthonic), resulting in a decrease of fishery and aquaculture production (Wu, 2002; Zhang et al., 2010).

Under extended periods of hypoxia, the survival of organisms depends on combined physiological and biochemical responses, to enhance the oxygen uptake from the environment, or to induce defense mechanisms to counteract stress (Richards, 2009). Assessment of oxygen uptake and hypoxia tolerance is usually done by respirometry, which is the measurement of oxygen consumption. Moreover, the classification of organisms between oxyregulators and oxyconforms is based on oxygen uptake rates under hypoxic conditions (Mangum and Van Winkle, 1973). Along with this classification, Prosser (1973) introduced the concept of critical oxygen point (P_{cO2}), representing the oxygen level below which an oxyregulator is not able to maintain its oxygen uptake independent from the environmental concentration. From a metabolic

perspective, the P_{cO_2} represents the moment of transition from aerobic to anaerobic pathways (Grieshaber et al., 1988). Thus, as oxygen saturation decreases, a common physiological response in marine fish is to maintain oxygen uptake by increasing water flow through the gills (Wu, 2002), and therefore increasing the ventilatory frequency (VF), defined as the opercular movement (one opening and one closing) per minute (Calderer, 2001). However, this is an energy-demanding mechanism, which cannot be sustained for a long time without affecting energy allocation to other metabolic functions, and thus resulting in a fitness decrease (Wannamaker and Rice, 2000). Thus, VF determination is considered a non-invasive technique to assess hypoxic stress in fish (Barreto and Volpato, 2004). Furthermore, under hypoxic conditions, oxidative stress can develop and cause cellular damage, due to the imbalance and excess of reactive oxygen species (ROS), compared to the capacity of the antioxidant defense system (Tagliari et al., 2004). Oxidative stress can generate highly toxic consequences in organisms (Lushchak and Bagnyukova, 2006), and might affect the fish feeding and reproduction, among others (Nikinmaa, 2002; Wu, 2002). Oxygen radicals trigger antioxidant responses, with the presence of antioxidant enzymes, such as the lactate dehydrogenase (LDH) involved also in the anaerobic glycolysis, the superoxide dismutase (SOD), and the alkaline phosphatase (AKP).

In Peru, due to the particular oxygen conditions (shallow oxygen minimum zone and vertical stratification in the water column), some coastal fish species developed the capacity to survive under low oxygen saturations. The benthopelagic Peruvian rock seabass *Paralabrax humeralis* lives in rocky-sandy shallow coastal areas, down to depths close to 200 m (Miñano and Castillo, 1971; Chirichigno and Cornejo, 2001; Goicochea et al., 2012), and is regularly exposed to low oxygen concentrations. On the other hand, Peruvian grunt *Anisotremus scapularis*, which is one of the six species of the genus *Anisotremus* registered in Peru, inhabits the rocky subtidal zone to depths up to 35 m (Allen et al., 2015; Iannacone and Alvarino, 2012), where oxygen saturation is rarely a limiting factor. These contrasting environmental conditions should lead to differences in hypoxia tolerance between the two species. Although both species are of significant economic importance in Peru, with good potential for aquaculture, the knowledge about their behavioral, physiological, and metabolic responses to environmental changes is still scarce. Indeed, this information is necessary to better understand adaptations of *P. humeralis* and *A. scapularis* to their environment, and the consequences that global ocean

deoxygenation might have for them. Knowing the oxygen tolerance range of these two species could also be useful for the implementation of aquaculture conditions for these species, and therefore improve their productivity. In the present study, we compared the behavioral, physiological, and metabolic responses of *P. humeralis* and *A. scapularis* to hypoxic conditions. We evaluated their short- and long-term physiological responses, through VF measurement and V_{cp} determination at two different temperatures, and the Lt_{50} determination, respectively. Also, we assessed their oxidative stress responses by measuring LDH, SOD and AKP enzymatic activity.

Materials and Methods

Experimental design

Specimens of *P. humeralis* and *A. scapularis* collected from Callao Bay, were transported to the Laboratory of Aquatic Ecophysiology of the Instituto del Mar del Perú (IMARPE), and juveniles with total length (TL) of 14-17 cm ($n = 32$, weight = 80-115 g) and 18-21 cm TL ($n = 32$, weight = 70-100 g) were selected, respectively. Fish were kept separated in two recirculation aquaculture systems (RAS), each one consisting in eight cylindrical, grey fiberglass tanks with 250 l of useful capacity, with a flow rate of 400 l h⁻¹, and constant aeration for maintaining oxygen saturation at 100%. After 15-day acclimation period at 22 ± 0.5 °C (warm condition), hypoxia experiments at this temperature were carried out; then water temperature was progressively reduced (c. 0.5 °C per day) for 15 days, until 16 ± 0.5 °C (cold condition) was reached, and another 15-day acclimation period was included before carrying out the hypoxia experiments at this temperature. The two experimental temperatures were chosen considering the maxima and minima values recorded weekly in the Peruvian Sea (Instituto del Mar del Perú, 2020), and the tolerance ranges reported for both species (Espino et al., 1990; León-Palomino et al., 2017). Temperature in the RAS was controlled by heat pumps; temperature and oxygen were monitored twice a day with a WTW Multi 3430 Multiparameter fitted with temperature and oxygen sensor. Fish were fed ad libitum once a day with commercial (Otohime) 4.1 mm pellets (42% protein and 12% lipids) for *P. humeralis*, and 2.3 mm pellets (48% protein and 14% lipids) for *A. scapularis*, according to Rosado-Salazar et al. (2018) and Dionicio-Acedo et al. (2017), respectively. No food was supplied 24 h before starting the experiments.

Determination of the ventilatory frequency (VF)

To evaluate the short-term physiological response to progressive hypoxia of both species, the ventilatory frequency (VF) was recorded at different oxygen saturation levels, at the two experimental temperatures. Two individuals per species were placed in a 90 l rectangular glass aquarium, separated by a PVC coated mesh, and each fish was restricted to 25% of the aquarium volume, in the front side. Water temperature (22 or 16 °C) was controlled by aquarium heaters (50 W) connected to a temperature controller (Autonics TZN4S), and oxygen saturation was regulated with a WTW Multi 3430 Multiparameter (WTW, Germany) coupled to a Raspberry Pi-controlled automatic system, allowing the injection of ultra-pure nitrogen into the water (Figure 1). Immediately after isolation, the fish were acclimated for 90 min at 100% oxygen saturation. Subsequently, oxygen saturation was progressively decreased, and saturations of 100, 70, 50, 30, 20, 10 and 5% were established and maintained for 1 h each, with 5 min of acclimation after each decrease. Every 10 min, the number of opercular movements, or VF, that occurred within 30 s was visually counted in triplicate, and VF was expressed in beats min⁻¹. This procedure was repeated five times, and a total of 10 fish per species were evaluated, for each temperature. The VF measurement was performed through a small hole in an opaque curtain, which covered only the front part of the aquarium, to avoid stressing the fish due to the presence of the observer.

Determination of the median lethal time (Lt50) and weight monitoring

The long-term physiological response of *P. humeralis* and *A. scapularis* to chronic hypoxia was assessed by determining the median lethal time (Lt50), which is the average time interval during which 50% of the individuals are expected to die after exposure to hypoxia (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2010). The experiment was carried out in the same thermo- and oxygen-controlled aquarium system, as described for the VF determination. Four juveniles of the two species (each fish was considered a replicate) were placed in a single aquarium, during a 31-day period, with no food provided during the experiment. To exclude the lack of food as a possible factor affecting the ability of fish to cope with hypoxia, a control group (100% oxygen saturation) was kept in an identical aquarium without food, for the same period. Water temperature was set at 16 °C, which was chosen

according to observations made in the upwelling zones along the coasts of Peru, where hypoxia usually occurs at low temperatures (Aguirre-Velarde et al., 2016), and also because no mortality was observed at 16 °C during the first experiment, contrary to 22 °C. Oxygen saturation was set at 5% (hypoxia), however because *A. scapularis* specimens died at the first few minutes, it was increased to 60% for this species, to allow the proper determination of Lt50. iSpy open-source video surveillance software and two Microsoft Lifecam Studio webcams were used to assess fish activity and mortality. Additionally, the weight of *P. humeralis* specimens from the two treatments (hypoxia and control) was determined at days 1, 16 and 31 (beginning, middle and end) of the experiment, to avoid excessive stress due to handling.

Antioxidant enzymatic activity

To evaluate the effect of exposure to hypoxia on the antioxidant response of both species, the enzymatic activities of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), and alkaline phosphatase (AKP) were measured. The same thermo- and oxygen-controlled aquarium system described for the VF determination was used. Water temperature was set at 16 °C, and two treatments were implemented: 15% oxygen saturation (hypoxia) and 100% oxygen saturation (control), with 4 individuals per species (each fish was considered a replicate) in each treatment, for an exposure period of 2 h.

At the end of the exposure period, 0.5 to 1 ml of blood was collected from all fish, using 1 ml tuberculin syringes with heparin, and stored in 1.5 ml microcentrifuge tubes, at 4 °C. Then samples were centrifuged at 8600 x g for 15 min at 4 °C, and separated plasma and blood cells were stored at -80 °C. In addition, 0.05 to 0.1 g of muscle, liver and gill tissues were collected in cold and stored in 1.5 ml microcentrifuge tubes. The tissue samples were thawed on ice and homogenized using polypropylene pestles, in Tris-HCl buffer, pH 7.5, with Triton-X100 at 1% (proportion 1:4 w/v). The homogenates were then centrifuged at 14500 x g for 20 min at 4 °C, and supernatants were aliquoted and stored at -80 °C until analysis. LDH and SOD activity were measured in heparinized blood plasma and in tissue samples from the gills, liver and muscles, using the Lactate Dehydrogenase LS kit (Valtek Diagnostics®), and the SOD Determination Kit (Sigma-Aldrich®), respectively; while AKP activity was evaluated in heparinized blood plasma and in liver tissue samples, using the Alkaline Phosphatase Kit (Valtek Diagnostics®).

Additionally, the total protein concentration of each sample was quantified in duplicate using the Bradford method, with bovine serum albumin (BSA) as standard. Relative enzymatic activity was expressed in U mg protein⁻¹. All reactions were performed according to the manufacturer specifications, and analyzed in a microplate reader Varian Cary® 50 Bio UV-VIS.

Statistical analysis

The VF data at 100% oxygen saturation were compared between the two temperatures (16 and 22 °C) for both species (*P. humeralis* and *A. scapularis*), using the Kruskal-Wallis test. To estimate the ventilatory critical point (V_{cp}) for the two species at each temperature, a segmented linear regression model was fitted to the VF data, as a function of oxygen saturation, where the break points in the fitted curve indicate the V_{cp} (%). The 95% confidence interval (CI) of V_{cp} was calculated. In addition, an analysis of covariance (ANCOVA) was performed to compare the slopes of the linear segments of the curve above the V_{cp} , which allows to compare the ventilatory response of the two species to progressive hypoxia between the two temperatures. The Lt_{50} was determined by a linear regression using the “MASS” R package (Venables and Ripley, 2002). The Kruskal-Wallis test was used to compare weight loss between hypoxia and control groups. Finally, a Student’s t-test was performed to compare the enzymatic activity of each enzyme (LDH, SOD and AKP) between treatments (hypoxia and control) and tissues (blood, gill, liver and muscle) for the two species. All data analysis was performed using R software (R Core Team, 2021), and the segmented linear regressions were performed using the “segmented” R package (Muggeo, 2008).

Ethical statement

All animal handling procedures complied with the Peruvian animal welfare law (Ley N° 30407 de Protección y Bienestar Animal).

Results

Short-term response to progressive hypoxia

At 100% oxygen saturation, the VF was significantly higher ($p = 0.003$) at 22 °C than at 16 °C for *P. humeralis*, while VF did not show a significant difference between the two temperatures for *A. scapularis* ($p > 0.05$) (Figure 2). However, *A. scapularis* presented higher VF (50 to 78 beats min⁻¹) at 100% oxygen saturation, compared with *P. humeralis* (15 to 30 beats min⁻¹). For both species, VF tended to increase with decreasing oxygen saturation. For *P. humeralis*, the segmented linear regression model allowed determining a Vcp (breakpoint) at $22.3\% \pm 0.9$ at 16 °C, while at 22 °C a first Vcp was determined at $23.8\% \pm 1.2$; both Vcp were followed by a strong increase in VF. No statistical differences were found between these two Vcp values, as their CI overlap (Table 1). Furthermore, at 22°C a second Vcp was determined at $7.5\% \pm 1.3$, this is the point where maximum VF (VFmax) is reached, followed by a decrease in VF (Figure 2a). For *A. scapularis*, at 16 °C, a first Vcp was determined at $48.7\% \pm 7.6$, and a second Vcp at $11.6\% \pm 1.0$; while at 22 °C a first Vcp was determined at $98.6\% \pm 0.9$, and the VFmax at $29.9\% \pm 1.9$. For both temperatures, the first Vcp was followed by an increase in VF, while the second Vcp was followed by a decrease in VF (Figure 2b). Furthermore, at 22 °C, specimens of *A. scapularis* presented a loss of balance and mortality at the end of the experiment; and Vcp values of this specie were statistically different between the two temperatures since no overlap between the confidence intervals was observed (Table 1). Additionally, the slopes of the linear segments of the fitted curves above the Vcp were not significantly different between the two temperatures, for both species (ANCOVA, $p > 0.05$).

Long-term response to hypoxia

The O₂ saturation below the Vcp was chosen based on the results of the VF measurement for each species. For *P. humeralis*, the saturation was maintained at 5%. For *A. scapularis*, was decided to increase the saturation to 60% due to the previously observed mortality of all the individuals after minutes of exposure to 5% saturation and considering a higher saturation than the Vcp reported (48.7%) for this species at 16 °C in progressive hypoxia approach. The Lt50 results were very different for the two species. During the entire

experiment (31 days) specimens of *P. humeralis*, which were exposed to severe hypoxia (5% oxygen saturation), presented no mortality. Due to technical reasons, experiment could not be extended further than 31 days and no Lt50 was determined for this species. Behavioral changes were observed such as: the fish reduced their swimming activity and remained at the bottom of the aquarium, while no loss of balance was observed (Table 2). Furthermore, no significant differences ($p > 0.05$) were observed in the weight of *P. humeralis* individuals at the different times of the experiment, between hypoxia and control (Table 3). On the other hand, for *A. scapularis*, Lt50 was determined at 36 min, for exposure to 60% oxygen saturation, and total mortality was attained at 43 min 13 s (Table 2). An increase in active swimming was observed from the beginning of the experiment, followed by a loss of balance after 10 min with specimens remaining at the bottom of the aquarium until their death.

Antioxidant enzymatic activity

In general, *A. scapularis* showed higher LDH activity values than *P. humeralis*, under normoxia and hypoxia. For *P. humeralis*, under normoxic conditions (100% oxygen saturation), LDH was higher in muscle (21.02 U mg protein⁻¹), and lower in liver (0.48 U mg protein⁻¹) (Figure 3a). Under hypoxic conditions (15% oxygen saturation), activity significantly increased in the gills (from 0.70 to 1.07 U mg protein⁻¹) ($p > 0.05$), while no significant changes were observed in the blood, liver, and muscle ($p > 0.05$). For *A. scapularis*, under normoxic conditions, LDH showed a higher activity in the muscle (24.38 U mg protein⁻¹) and a lower activity in the liver (0.45 U mg protein⁻¹) (Figure 3b). Under hypoxic conditions, LDH significantly decreased in the blood (from 2.16 to 0.67 U mg protein⁻¹) ($p < 0.05$), and no significant differences were observed in the gills, liver and muscle ($p > 0.05$).

On the other hand, SOD values ranged from 24.38 U mg protein⁻¹ in gills (observed in *P. humeralis* under normoxia) to 16.57 U mg protein⁻¹ in blood (in *A. scapularis* under hypoxia). Increases in SOD response was observed in liver and blood tissues (except in gills) of *P. humeralis* under hypoxia, while in general no changes were observed in *A. scapularis* (Figure 3c-d), except a significant increase ($p=0.04$) due to hypoxia in muscle.

Finally, both species showed a decrease in ALK under hypoxia in liver and blood, and only an increase in blood (from 1.95 to 2.30 U mg protein⁻¹) of *P. humeralis* was recorded due to hypoxia (Figure 3e- f).

Discussion

Short-term response to hypoxia

Marine fish present numerous adaptations to fluctuating environmental conditions. In particular, within a species-specific range of oxygen saturation, most teleosts are able to maintain a constant oxygen uptake (Calderer, 2001; Neill et al., 1991), thanks to physiological adaptations such as the increase in gill ventilation, in perfusion and surface area, the increased cardiac output, and an enhanced binding affinity between blood hemoglobin and oxygen (Calderer, 2001; Farrell, 2009; Graham, 1997; Richards, 2011; Russell et al., 2008; Speers-Roesch et al., 2010; Well, 2009). Additionally, they present a wide variety of behavioral responses to the decrease in environmental oxygen saturation.

A common response mechanism of fish under hypoxic conditions, is the increase in VF aiming to compensate the low availability of oxygen in the water by increasing its uptake rate, and thus maintain stable levels of oxygen in tissues (Richards, 2011). Therefore, VF is expected to increase as a function of oxygen depletion; however, when a suboptimal level of oxygen saturation is reached, the VF shows a dramatic increase (Cerezo-Valverde et al., 2006). Although *P. humeralis* and *A. scapularis* increased VF under progressive hypoxia, nevertheless V_{cp} occurred at much higher oxygen saturation for *A. scapularis* than for *P. humeralis*. This reflected a higher sensitivity of *A. scapularis* to hypoxia. In contrast, the relatively low V_{cp} observed in *P. humeralis*, demonstrated its good capacity to regulate oxygen uptake under hypoxic conditions. Even under normoxic conditions, *A. scapularis* showed a higher VF than *P. humeralis*, related to a faster metabolism that probably demands more energy for its maintenance.

At higher temperatures, *A. scapularis* seems to be more sensitive to hypoxia than *P. humeralis*. Temperature is an important factor to consider when evaluating fish responses

to hypoxia, as it affects the availability of oxygen in the water, leading to an increase in oxygen consumption, in addition to reducing the affinity of hemoglobin from oxygen (Cerezo-Valverde et al., 2006; Farrell and Richards, 2009). In fact, V_{cp} in *P. humeralis* was not affected by temperature, but *A. scapularis* did show a higher V_{cp} at 22 than at 16 °C, as well as a higher V_{Fmax} , immediately followed by a drop in V_F , and finally led to death. Furthermore, in *P. humeralis*, V_{Fmax} occurred at 22 °C followed by a fall in V_F , not observed at 16 °C, and without mortality. This event evidenced a slight sensitivity of *P. humeralis* to hypoxia at higher temperatures, despite its wider tolerance range. A similar temperature effect was reported in the Atlantic cod (*Gadus morhua*), with lethal oxygen saturations increasing with temperature (Schurmann and Steffensen, 1992), while Plante et al. (1998) found no differences between the tolerance to hypoxia of cod at 6 and 2 °C. Also, for both species in our study, the slopes above the V_{cp} did not show any differences between the two temperatures. So, at oxygen saturations higher than V_{cp} , the V_F is in function of the availability of ambient oxygen and therefore its regulation is similar, regardless to the temperature.

Long-term response to hypoxia

Hypoxia induced different responses in Lt_{50} and behavior between both species of this study, as expected since they inhabit different environmental conditions. Along the Peruvian coast, *A. scapularis* is present in rocky subtidal zones, at depths up to 35 m, where seawater presents stable high oxygen saturations; while the benthopelagic fish *P. humeralis* is distributed from shallow waters to depths up to 200 m, and where hypoxic or anoxic conditions are frequently observed. These contrasting environmental conditions could have led to differentiated adaptations, physiological and behavioral, which were recorded during this study. Thus, at 60% oxygen saturation, *A. scapularis* showed a short Lt_{50} and fast total mortality (less than 1 h), while at 5% oxygen saturation *P. humeralis* did show no mortality during the experiment (31 days). Several reports also mentioned that Lt_{50} differs between species of different habitats. For example, for red sea bream (*Chrysophrys major*), a demersal fish living in shallow waters, Lt_{50} has been reported at 60 min at 10% oxygen concentration, while at 5% mortality was too fast to be recorded (Woo, 1990). Flounder *Platichthys flesus*, from shallow sandy bottoms that are affected by periodic oxygen deficiencies, showed a Lt_{50} of approximately 30 h at 20% oxygen saturation (Tallqvist et al., 1999). In the case of spot *Leiostomus xanthurus*, a demersal

species living in coastal areas, near sandy or muddy bottoms, mortality was reported at an oxygen saturation of approximately 16% at 25 °C (Cooper, 2002). This wide range in Lt50 reflects that sensitivity to hypoxia varies greatly between marine fish, which implies a variety in adaptive behavioral and metabolic strategies to cope with hypoxic conditions (Vaquer and Duarte, 2008). However, few studies have assessed and compared the Lt50 of fish during progressive hypoxia. Moreover, the difference between experimental protocols makes it difficult to compare results between studies (David, 1975).

The swimming activity alteration also reflected differences in tolerance response under hypoxia, between species. In fact, *A. scapularis* first increased swimming activity, but after some time the fish showed a loss of balance and sank to the bottom of the aquarium where they remained until death. While *P. humeralis* showed a reduced activity from the beginning of the exposure, and remained almost motionless at the bottom of the aquarium throughout the experiment period. In an environment with constant oxygen saturation, hypoxia-intolerant species, such as *A. scapularis*, would respond by increasing their swimming activity (and therefore their VF) to avoid, or “escape” the suboptimal waters. If the hypoxic condition cannot be avoided, the fish experiencing an increase in metabolism, will rapidly show a stressed behavior, which would likely be followed by death if hypoxia persists (Richards, 2009). Tolerant species, such as *P. humeralis* which live near the bottom, are exposed to recurrent hypoxic conditions. During these events, a decrease in swimming activity, which might enable the relocation of energy for the maintenance of the organism, causes the fish to withstand suboptimal conditions for relatively long periods. Indeed, hypoxia-tolerant species have been described as “rarely athletic” by Farrell (2009). However, the typical avoidance response of hypoxic-intolerant fish has also been observed in benthic species, such as flatfish species like flounder (*Platichthys flesus*), common sole (*Solea solea*) and winter flounder (*Pleuronectes americanus*) (Dalia Via et al., 1997; McEnroy and Krolowitz, 1997; Tallqvist et al., 1999), demonstrating that habitat alone is not enough to determine whether a species is tolerant to hypoxia.

Enzymatic activity

Hypoxic conditions can also trigger response mechanisms in fish metabolism. Thereby, once the first strategy of increasing oxygen uptake fails, biochemical responses occur, that attempt to modify the mechanisms of metabolic energy production, and/or reduce energy demand (Richards, 2011). A response to hypoxia was evidence with the increased LDH activity in the muscle of both, *P. humeralis* and *A. scapularis* (showing in general higher enzymatic activity). High levels of this enzymatic activity have been reported related to muscle anaerobic glycolysis, resulting in the reduction of pyruvate into lactate, via LDH catalysis (Vijayan et al., 1997). Likewise, increases in the lactate substrate has been reported in fish species under hypoxic conditions, such as rainbow trout *Salmo gairdneri* (Dunn and Hochachka, 1986) and common sole *Solea solea* (Dalla Via et al., 1997). Hypoxia-tolerant organisms, which can withstand prolonged exposures to low oxygen levels, might either conserve their energy by reducing their metabolism, regulating or modifying protein synthesis (Wu, 2002), or also they might obtain their energy from anaerobic metabolism. Anaerobic glycolysis is the metabolic pathway that supplies ATP to cells and involves lactate dehydrogenase (LDH), whose activity increases under low oxygen saturation (MacIntyre, 2011).

In this context, it is worth mentioning here that during hypoxia exposure, *P. humeralis* showed low swimming activity and remained at the bottom of the aquarium, while *A. scapularis* increased its active swimming. In consequence, the energy demand of *A. scapularis* would have increased, probably causing an increase in glycolysis, which therefore could be reflected as an increase in LDH activity. Some studies reported that fish could reduce their activity under hypoxic conditions, as a strategy to preserve energy and compensate for metabolic stress (Schurmann and Steffensen, 1994; Dalla Via et al., 1998; Herbert and Wells, 2001; Herbert and Steffensen, 2005). In this sense, the reduced activity presented by *P. humeralis*, could allow it to maximize its metabolic scope and energy allocation, and consequently remain within the optimum limits of the cost of its maintenance, as has been also described for the Atlantic cod *Gadus morhua* (Claireaux et al., 2000). Furthermore, the absence of a significant difference in weight loss of *P. humeralis*, between normoxia and hypoxia, suggests that an efficient energy relocation would have occurred under hypoxia. Although both species showed an increase of LDH activity in muscle under hypoxic conditions.

SOD is one of the most important antioxidant enzymes that participate in the defense mechanism against ROS, in aerobic metabolism (Fridovich, 1995); so as oxidative stress increases, it is expected occurrence of increases in SOD activity. In our study, this was observed with *P. humeralis*, showing an increase of SOD in muscle, liver and blood, in contrast to *A. scapularis* which remained overall stable, with an increase only in muscle. In particular, the liver is responsible of detoxification, xenobiotic metabolism, and the maintenance of normal physiological functions in fish (Welker et al., 2012). Therefore, the highest SOD levels recorded in liver of *P. humeralis* could reflect an enhanced defense capacity against oxidative stress, supported by the concept of “preparation for oxidative stress”, introduced by Hermes-Lima et al. (2015). This concept suggests that organisms that tend to frequently face a wide range of variation in oxygen availability, could improve their antioxidant response during low oxygen events. So, the evidence of SOD increases under hypoxia supported the hypothesis that *P. humeralis* presents a preparation mechanism with capacity to face oxidative stress. Similarly, an increase in SOD activity as a response to oxidative stress has been reported in the characid fish *Cyphocharax abramoides* (Johannsson et al., 2018), a species exposed to frequent hypoxic events, as *P. humeralis*. In addition, the lower activity of SOD registered in gills of *P. humeralis* in hypoxia with respect to normoxia, probably related to tissue function, has also being reported in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*, where no significant differences were registered (Cooper et al., 2002).

AKP is one of the most important multifunctional enzymes involved in metabolism, catalyzing the hydrolysis of phosphatase monoesters into organic radical and inorganic phosphate (Sharma et al., 2014). This enzyme is present in different tissues but concentrated mainly in the liver, whose activity is affected by environmental changes (Wang et al., 2017). AKP activity is positively correlated with the severity of stressors; and it is also important to mention that increases of enzyme concentration, generates an adverse impact on the organism (Li et al., 2009, Yin et al., 2015, Wang et al., 2017). In this study, the 2 h hypoxia treatment could not be considered as an intense stressor, evidenced due the AKP levels decreased respect to normoxia, in general for both species. Also for example, studies in largemouth bass *Micropterus salmoides* mentioned increases of AKP activity in gills and liver, observed after 12 to 24 h of exposure to hypoxia (Sun et al., 2020). So, our results could evidence an early metabolic response of the organisms

under initial stress conditions, being necessary future studies that consider prolonged exposures to hypoxia for a better understanding of species temporal-changes response under different levels of oxidative stress.

Implications in the context of ocean de-oxygenation

Hypoxic areas are becoming more common and severe in marine systems. Dissolved oxygen concentration has been changing drastically in the last few decades (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). This phenomenon is expected to continue and intensify due to eutrophication (Diaz et al., 2012) and to the increase in sea temperature (Wu, 2002). The de-oxygenation of the world's oceans has been highlighted as a major component of climate change (Montgomery et al., 2019).

One of the challenges humanity faces is to achieve food security for the next generations, making use of natural resources in all dimensions of sustainable development: social, economic and environmental (United Nations, 2015). Fish is an important source of protein, vitamins and other essential nutrients, and the increasing demand for this resource puts pressure on natural resources exploitation (HLPE, 2014; FAO, 2016). This increase in both extension and intensity of the hypoxic events jeopardize the future of activities like fisheries and aquaculture in the world, due to the increased mortality of organisms. Being able to understand hypoxia responses across different species, is fundamental to understanding processes of adaptation. The results obtained in this work can help to better understand the vulnerability of species in our oceans, and to develop strategies to avoid or reduce the impacts of de-oxygenation in fisheries and aquaculture.

P. humeralis and *A. scapularis* are species of economic importance in Peru, and in recent years the interest to develop their aquaculture has increased. The response and adaptations shown by *A. scapularis* (high V_{cp} , short Lt_{50} and high LDH activity) make it especially vulnerable to the reduction in oxygen concentration. Typically, fish would have an avoidance response to the stressor, (in this case, the low oxygen concentration); however, in an aquaculture setting where fish are maintained in confinement conditions, the eventual death of the organisms could be inevitable. On the other hand, *P. humeralis*

response is distinctive of hypoxia-tolerant species, which would allow it to face hypoxia events more efficiently and during prolonged periods. Nonetheless, the problem of hypoxia at an environmental level should be assessed for both species, along with further metabolic studies, to comprehend the species' tolerance. Further studies on oxidative stress coupled with hypoxia are still needed to fully understand the tolerance and response mechanisms of these two species. These studies should assess chronic hypoxic exposure, as well as oscillations in oxygen supply that might reflect diurnal rhythms, alongside other environmental stressors such as elevated CO₂ levels and temperature, as they have been predicted to affect the oxygen availability in the future.

Acknowledgments

We would like to thank Instituto del Mar del Peru (IMARPE) for their founding through the project PpR Development and Management of Aquaculture, as well as the JEAI-Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

Tolerancia de juveniles de cabrilla (*Paralabrax humeralis* Valenciennes, 1828) y chita (*Anisotremus scapularis* Tschudi, 1846) a condiciones de bajo oxígeno

Montero-Taboada, Rebeca^{1,2}

Sotil, Giovanna²

Dionicio-Acedo, Jhon²

Rosado-Salazar, Maryandrea²

Aguirre-Velarde, Arturo²

¹Universidad Científica del Sur, Carretera Panamerica Sur Km 19, Villa el Salvador, Lima, Peru

²Instituto del Mar del Perú, Esquina General Valle y Gamarra S/N, Chucuito, Callao, Peru

Introducción

En las últimas décadas, la concentración de oxígeno disuelto (OD) en las aguas costeras ha ido cambiando drásticamente, generando eventos de agotamiento de oxígeno en estas áreas alrededor del mundo (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008). La hipoxia se define generalmente como la concentración de OD en el agua que oscila entre 2,0 ml l⁻¹ (~ 2,8 mg l⁻¹ o 30% de saturación, Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008) a 0,0 ml l⁻¹, donde alcanza el punto de anoxia (Claireaux y Chabot, 2016). La hipoxia puede ser el resultado de fenómenos naturales, como la estratificación vertical en la columna de agua (Levin et al., 2009; Rosenberg et al., 1991; Zhang et al., 2010), pero también debido a la actividad humana (proceso de eutrofización). Las limitaciones en el oxígeno ambiental pueden actuar como un factor restrictivo para el crecimiento, reproducción y distribución de especies acuáticas (Behrens, 2007; Kramer, 1987), sin embargo, los organismos marinos exhiben varias estrategias adaptativas, así como diferentes niveles de tolerancia a la hipoxia (Burton y Heath 1980; Herbet y Steffensen, 2005; Ishibashi et al. 2002; Pichavant et al. 2002; Van Raaij et al. 1996). En los peces, la hipoxia puede generar/iniciar respuestas conductuales y subletales, como la redistribución de especies, que a su vez puede alterar la competencia interespecífica por las presas y / o el hábitat y, por tanto, la supervivencia. También puede afectar sus tasas de alimentación y crecimiento y puede inducir un cambio de metabolismo aeróbico a anaeróbico. Cuando los peces no pueden hacer frente a la hipoxia, eventualmente puede resultar en su muerte (Claireaux et al., 2000; Fry, 1971; Hvas y Oppedal, 2019; Remen et al., 2016). Además, las consecuencias ecológicas negativas de los eventos hipóxicos incluyen la mortalidad masiva de organismos marinos y la pérdida de poblaciones (predominantemente bentónicas), lo que resulta en una disminución de la producción pesquera y acuícola (Wu, 2002; Zhang et al., 2010).

En períodos prolongados de hipoxia, la supervivencia de los organismos depende de respuestas fisiológicas y bioquímicas combinadas, para mejorar la absorción de oxígeno del medio ambiente o para inducir mecanismos de defensa para contrarrestar el estrés (Richards, 2009). La evaluación de la absorción de oxígeno y la tolerancia a la hipoxia generalmente se realiza mediante respirometría, que es la medición del consumo de oxígeno. Además, la clasificación de organismos entre oxirreguladores y oxiconformadores se basa en las tasas de absorción de oxígeno en condiciones hipóxicas (Mangum y Van Winkle, 1973). Junto con esta clasificación, Prosser (1973) introdujo el concepto de punto crítico de oxígeno (PcO_2), que representa el nivel de oxígeno por debajo del cual un oxirregulador no es capaz de mantener su absorción de oxígeno independientemente de la concentración ambiental. Desde una perspectiva metabólica, la PcO_2 representa el momento de transición de vías aeróbicas a anaeróbicas (Grieshaber et al., 1988). Por lo tanto, a medida que disminuye la saturación de oxígeno, una respuesta fisiológica común en los peces marinos es mantener la absorción de oxígeno aumentando el flujo de agua a través de las branquias (Wu, 2002) y, por lo tanto, aumentando la frecuencia ventilatoria (FV), definida como el movimiento opercular (una abertura y un cierre) por minuto (Calderer, 2001). Sin embargo, este es un mecanismo demandante de energía, que no se puede mantener durante mucho tiempo sin afectar la asignación de energía a otras funciones metabólicas y, por lo tanto, resulta en una disminución de la aptitud física (Wannamaker y Rice, 2000). La determinación de la FV se considera una técnica no invasiva para evaluar el estrés hipóxico en peces (Barreto y Volpato, 2004). Además, en condiciones de hipoxia, el estrés oxidativo puede desarrollarse y causar daño celular, debido al desequilibrio y exceso de especies reactivas de oxígeno (EROS), en comparación con la capacidad del sistema de defensa antioxidante (Tagliari et al., 2004). El estrés oxidativo puede generar consecuencias altamente tóxicas en los organismos (Lushchak y Bagnyukova, 2006), y puede afectar la alimentación y reproducción de los peces, entre otras (Nikinmaa, 2002; Wu, 2002). Los radicales de oxígeno desencadenan respuestas antioxidantes, con presencia de enzimas antioxidantes, como el lactato deshidrogenasa (LDH) involucrada también en la glucólisis anaeróbica, el superóxido dismutasa (SOD) y la fosfatasa alcalina (AKP).

En Perú, debido a las condiciones particulares de oxígeno (zona de mínimo oxígeno poco profunda y estratificación vertical en la columna de agua), algunas especies de peces costeros desarrollaron la capacidad de sobrevivir en bajas saturaciones de oxígeno. La cabrilla *Paralabrax humeralis* vive en zonas costeras poco profundas rocoso-arenosas, hasta profundidades cercanas a los 200 m (Miñano y Castillo, 1971; Chirichigno y Cornejo, 2001; Goicochea et al., 2012), y está regularmente expuesta a bajas concentraciones de oxígeno. Por otro lado, la chita *Anisotremus scapularis*, que es una de las seis especies del género *Anisotremus* registradas en Perú, habita la zona submareal rocosa hasta profundidades de hasta 35 m (Allen et al., 2015; Iannacone y Alvarino, 2012), donde la saturación de oxígeno rara vez es un factor limitante. Estas condiciones ambientales contrastantes deberían conducir a diferencias en la tolerancia a la hipoxia entre las dos especies. Aunque ambas especies son de gran importancia económica en Perú, con buen potencial para la acuicultura, el conocimiento sobre sus respuestas conductuales, fisiológicas y metabólicas a los cambios ambientales es aún escaso. De hecho, esta información es necesaria para comprender mejor las adaptaciones de *P. humeralis* y *A. scapularis* a su entorno, y las consecuencias que la desoxigenación global

de los océanos podría tener para ellos. Conocer el rango de tolerancia al oxígeno de estas dos especies también podría ser útil para la implementación de condiciones de acuicultura para estas especies y, por lo tanto, mejorar su productividad. En el presente estudio, comparamos las respuestas conductuales, fisiológicas y metabólicas de *P. humeralis* y *A. scapularis* a condiciones hipóxicas. Evaluamos sus respuestas fisiológicas a corto y largo plazo, mediante la medición de FV y la determinación de V_{cp} a dos temperaturas diferentes, y la determinación de Lt_{50} , respectivamente. Además, evaluamos sus respuestas al estrés oxidativo midiendo la actividad enzimática de LDH, SOD y AKP.

Materiales y Métodos

Diseño experimental

Especímenes de *P. humeralis* y *A. scapularis* recolectados en la Bahía del Callao, fueron transportados al Laboratorio de Ecofisiología Acuática del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), y juveniles con longitud total (LT) de 14-17 cm ($n = 32$, peso = 80-115 g) y 18-21 cm LT ($n = 32$, peso = 70-100 g) fueron seleccionados, respectivamente. Los peces se mantuvieron separados en dos sistemas de recirculación acuícola (RAS), cada uno compuesto por ocho tanques cilíndricos de fibra de vidrio gris con 250 l de capacidad útil, con un caudal de 400 l h⁻¹ y aireación constante para mantener la saturación de oxígeno a 100 %. Después de un período de aclimatación de 15 días a $22 \pm 0,5$ °C (condición cálida), se llevaron a cabo experimentos de hipoxia a esta temperatura; luego la temperatura del agua se redujo progresivamente (c. 0.5 °C por día) durante 15 días, hasta alcanzar 16 ± 0.5 °C (condición fría), y se incluyó otro período de aclimatación de 15 días antes de realizar los experimentos de hipoxia a esta temperatura. Las dos temperaturas experimentales se eligieron considerando los valores máximos y mínimos registrados semanalmente en el Mar Peruano (Instituto del Mar del Perú, 2020), y los rangos de tolerancia reportados para ambas especies (Espino et al., 1990; León-Palomino et al., 2017). La temperatura en el RAS se controló mediante bombas de calor; la temperatura y el oxígeno se controlaron dos veces al día con un multiparámetro WTW Multi 3430 equipado con un sensor de temperatura y oxígeno. Los peces fueron alimentados *ad libitum* una vez al día con pellets comerciales (Otohime) de 4,1 mm (42% de proteína y 12% de lípidos) para *P. humeralis*, y pellets de 2,3 mm (48% de proteína y 14% de lípidos) para *A. scapularis*, según Rosado-Salazar et al. (2018) y Dionicio-Acedo et al. (2017), respectivamente. No se suministró alimento 24 h antes de comenzar los experimentos.

Determinación de la frecuencia ventilatoria (FV)

Para evaluar la respuesta fisiológica a corto plazo a la hipoxia progresiva de ambas especies, se registró la frecuencia ventilatoria (FV) a diferentes niveles de saturación de oxígeno, a las dos temperaturas experimentales. Se colocaron dos individuos por especie en un acuario de vidrio rectangular de 90 l, separados por una malla recubierta de PVC, y cada pez se restringió al 25% del volumen del acuario, en la parte frontal. La temperatura del agua (22 o 16 °C) se controló mediante calentadores de acuario (50 W) conectados a un controlador de temperatura (Autonics TZN4S), y la saturación de oxígeno se reguló con un multiparámetro WTW Multi 3430 (WTW, Alemania) acoplado

a un sistema Raspberry Pi de control automático, que permite la inyección de nitrógeno ultrapuro en el agua (Figura 1). Inmediatamente después del aislamiento, los peces se aclimataron durante 90 minutos al 100% de saturación de oxígeno. Posteriormente, se disminuyó progresivamente la saturación de oxígeno y se establecieron saturaciones de 100, 70, 50, 30, 20, 10 y 5% y se mantuvieron durante 1 h cada una, con 5 min de aclimatación después de cada disminución. Cada 10 min, el número de movimientos operculares, o FV, que ocurrieron dentro de los 30 s se contó visualmente por triplicado, y la FV se expresó en latidos min⁻¹. Este procedimiento se repitió cinco veces y se evaluó un total de 10 peces por especie, para cada temperatura. La medición de la FV se realizó a través de un pequeño orificio en una cortina opaca, que cubría solo la parte frontal del acuario, para evitar estresar a los peces por la presencia del observador.

Determinación del tiempo letal medio (Lt50) y control del peso

La respuesta fisiológica a largo plazo de *P. humeralis* y *A. scapularis* a la hipoxia crónica se evaluó determinando el tiempo letal medio (Lt50), que es el intervalo de tiempo promedio durante el cual se espera que el 50% de los individuos mueran después de la exposición a la hipoxia (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2010). El experimento se llevó a cabo en el mismo sistema de acuario con control de calor y oxígeno, como se describe para la determinación de FV. Cuatro juveniles de las dos especies (cada pez se consideró una réplica) se colocaron en un solo acuario, durante un período de 31 días, sin alimento durante el experimento. Para excluir la falta de comida como un posible factor que afecta la capacidad de los peces para hacer frente a la hipoxia, se mantuvo un grupo de control (saturación de oxígeno al 100%) en un acuario idéntico sin comida, durante el mismo período. La temperatura del agua se fijó en 16 °C, la cual se eligió de acuerdo con las observaciones realizadas en las zonas de surgencia a lo largo de las costas del Perú, donde la hipoxia suele ocurrir a bajas temperaturas (Aguirre-Velarde et al., 2016), y también porque no se registró mortalidad a 16 °C durante el primer experimento, contrario a 22 °C. La saturación de oxígeno se fijó en 5% (hipoxia), sin embargo, debido a que los especímenes de *A. scapularis* murieron en los primeros minutos, se aumentó al 60% para esta especie, para permitir la determinación adecuada de Lt50. Se utilizaron el software de videovigilancia de código abierto iSpy y dos cámaras web Microsoft Lifecam Studio para evaluar la actividad y la mortalidad de los peces. Adicionalmente, se determinó el peso de los ejemplares de *P. humeralis* de los dos tratamientos (hipoxia y control) los días 1, 16 y 31 (inicio, medio y final) del experimento, para evitar un estrés excesivo por manipulación.

Actividad enzimática antioxidante

Para evaluar el efecto de la exposición a la hipoxia sobre la respuesta antioxidante de ambas especies, se midieron las actividades enzimáticas del lactato deshidrogenasa (LDH), superóxido dismutasa (SOD) y fosfatasa alcalina (AKP). Se utilizó el mismo sistema de acuario con control de temperatura y oxígeno descrito para la determinación de FV. La temperatura del agua se fijó en 16 °C, y se implementaron dos tratamientos: saturación de oxígeno al 15% (hipoxia) y saturación de oxígeno al 100% (control), con 4

individuos por especie (cada pez se consideró una réplica) en cada tratamiento, por un período de exposición de 2 h.

Al final del período de exposición, se recogieron de 0.5 a 1 ml de sangre de todos los peces, utilizando jeringas de tuberculina de 1 ml con heparina, y se almacenaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml, a 4 °C. Luego, las muestras se centrifugaron a 8600 x g durante 15 min a 4 °C, y el plasma y las células sanguíneas separados se almacenaron a -80 °C. Además, se recogieron en frío de 0.05 a 0.1 g de tejido muscular, hepático y branquial y se almacenaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. Las muestras de tejido se descongelaron en hielo y se homogeneizaron con mano de mortero de polipropileno, en tampón Tris-HCl, pH 7.5, con Triton-X100 al 1% (proporción 1: 4 p / v). A continuación, los homogeneizados se centrifugaron a 14500 x g durante 20 min a 4 °C, y los sobrenadantes se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. La actividad de LDH y SOD se midió en plasma sanguíneo heparinizado y en muestras de tejido de las branquias, el hígado y los músculos, utilizando el kit Lactate Dehydrogenase LS (Valtek Diagnostics®) y el SOD Determination Kit (Sigma-Aldrich®), respectivamente; mientras que la actividad de AKP se evaluó en plasma sanguíneo heparinizado y en muestras de tejido hepático, utilizando el kit de fosfatasa alcalina (Valtek Diagnostics®). Además, la concentración de proteína total de cada muestra se cuantificó por duplicado utilizando el método de Bradford, con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La actividad enzimática relativa se expresó en U mg de proteína⁻¹. Todas las reacciones se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se analizaron en un lector de microplacas Varian Cary® 50 Bio UV-VIS.

Análisis estadístico

Los datos de FV al 100% de saturación de oxígeno se compararon entre las dos temperaturas (16 y 22 °C) para ambas especies (*P. humeralis* y *A. scapularis*), utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Para estimar el punto crítico ventilatorio (V_{cp}) para las dos especies a cada temperatura, se ajustó un modelo de regresión lineal segmentado a los datos de FV, en función de la saturación de oxígeno, donde los puntos de ruptura en la curva ajustada indican el V_{cp} (%). Se calculó el intervalo de confianza (IC) al 95% del V_{cp} . Además, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para comparar las pendientes de los segmentos lineales de la curva previos al V_{cp} , lo que permite comparar la respuesta ventilatoria de las dos especies a la hipoxia progresiva entre las dos temperaturas. El Lt_{50} se determinó mediante una regresión lineal utilizando el paquete "MASS" R (Venables y Ripley, 2002). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar la pérdida de peso entre los grupos de hipoxia y de control. Finalmente, se realizó una prueba t de Student para comparar la actividad enzimática de cada enzima (LDH, SOD y AKP) entre tratamientos (hipoxia y control) y tejidos (sangre, branquias, hígado y músculo) para las dos especies. Todo el análisis de datos se realizó utilizando el software R (R Core Team, 2021), y las regresiones lineales segmentadas se realizaron utilizando el paquete R "segmentado" (Muggeo, 2008).

Declaración ética

Todos los procedimientos de manejo de animales cumplieron con la ley peruana de bienestar animal (Ley N ° 30407 de Protección y Bienestar Animal).

Resultados

Respuesta a corto plazo a la hipoxia progresiva

Al 100% de saturación de oxígeno, el FV fue significativamente mayor ($p = 0.003$) a 22 °C que a 16 °C para *P. humeralis*, mientras que el FV no mostró una diferencia significativa entre las dos temperaturas para *A. scapularis* ($p > 0.05$) (Figura 2). Sin embargo, *A. scapularis* presentó FV más alta (50 a 78 latidos min⁻¹) al 100% de saturación de oxígeno, en comparación con *P. humeralis* (15 a 30 latidos min⁻¹). Para ambas especies, FV tendió a aumentar con la disminución de la saturación de oxígeno. Para *P. humeralis*, el modelo de regresión lineal segmentado permitió determinar un Vcp (punto de ruptura) a $22.3\% \pm 0.9$ a 16 °C, mientras que a 22 °C se determinó un primer Vcp a $23.8\% \pm 1.2$; ambos Vcp fueron seguidos por un fuerte aumento en FV. No se encontraron diferencias estadísticas entre estos dos valores de Vcp, ya que sus IC se superponen (Tabla 1). Además, a 22 °C se determinó un segundo Vcp a $7.5\% \pm 1.3$, este es el punto donde se alcanza la FV máxima (VFmax), seguido de una disminución en el FV (Figura 2a). Para *A. scapularis*, a 16 °C, se determinó una primera Vcp a $48.7\% \pm 7.6$ y una segunda Vcp a $1.6\% \pm 1.0$; mientras que a 22 °C se determinó un primer Vcp en $98.6\% \pm 0.9$ y el VFmax en $29.9\% \pm 1.9$. Para ambas temperaturas, el primer Vcp fue seguido por un aumento en FV, mientras que el segundo Vcp fue seguido por una disminución en FV (Figura 2b). Además, a 22 °C, los ejemplares de *A. scapularis* presentaron pérdida de equilibrio y mortalidad al final del experimento; y los valores de Vcp de esta especie fueron estadísticamente diferentes entre las dos temperaturas ya que no se observó superposición entre los intervalos de confianza (Tabla 1). Además, las pendientes de los segmentos lineales de las curvas ajustadas por encima del Vcp no fueron significativamente diferentes entre las dos temperaturas, para ambas especies (ANCOVA, $p > 0.05$).

Respuesta a largo plazo a la hipoxia

La saturación de O₂ por debajo del Vcp se eligió en base a los resultados de la medición de FV para cada especie. Para *P. humeralis*, la saturación se mantuvo al 5%. Para *A. scapularis*, se decidió aumentar la saturación al 60% debido a la mortalidad previamente observada de todos los individuos luego de minutos de exposición al 5% de saturación y considerando una saturación mayor que la Vcp reportada (48.7%) para esta especie a 16 °C en el experimento de hipoxia progresiva. Los resultados de Lt50 fueron muy diferentes para las dos especies. Durante todo el experimento (31 días) los juveniles de *P. humeralis*, que fueron expuestos a hipoxia severa (5% de saturación de oxígeno), no presentaron mortalidad. Por razones técnicas, el experimento no pudo extenderse más de 31 días y no se determinó Lt50 para esta especie. Se observaron cambios de comportamiento tales como: los peces redujeron su actividad de natación y permanecieron en el fondo del

acuario, mientras que no se observó pérdida de equilibrio (Tabla 2). Además, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el peso de los individuos de *P. humeralis* en los diferentes momentos del experimento, entre hipoxia y control (Tabla 3). Por otro lado, para *A. scapularis* se determinó Lt50 a los 36 min, para exposición al 60% de saturación de oxígeno, y la mortalidad total se alcanzó a los 43 min 13 s (Tabla 2). Se observó un aumento en la natación activa desde el inicio del experimento, seguido de una pérdida de equilibrio después de 10 min, quedando las muestras en el fondo del acuario hasta su muerte.

Actividad enzimática antioxidante

En general, *A. scapularis* mostró valores de actividad LDH más altos que *P. humeralis*, bajo normoxia e hipoxia. Para *P. humeralis*, en condiciones normóxicas (100% de saturación de oxígeno), la LDH fue mayor en el músculo (21.02 U mg de proteína-1) y menor en el hígado (0.48 U mg de proteína-1) (Figura 3a). En condiciones hipóxicas (15% de saturación de oxígeno), la actividad aumentó significativamente en las branquias (de 0.70 a 1.07 U mg de proteína-1) ($p > 0,05$), mientras que no se observaron cambios significativos en la sangre, hígado y músculo ($p > 0,05$). Para *A. scapularis*, en condiciones normóxicas, la LDH mostró una mayor actividad en el músculo (24.38 U mg de proteína-1) y una menor actividad en el hígado (0.45 U mg de proteína-1) (Figura 3b). En condiciones hipóxicas, la LDH disminuyó significativamente en la sangre (de 2.16 a 0.67 U mg de proteína-1) ($p < 0,05$), y no se observaron diferencias significativas en las branquias, hígado y músculo ($p > 0,05$).

Por otro lado, los valores de SOD variaron de 24.38 U mg de proteína-1 en branquias (observado en *P. humeralis* bajo normoxia) a 16.57 U mg de proteína-1 en sangre (en *A. scapularis* bajo hipoxia). Se observaron aumentos en la respuesta de SOD en el hígado y los tejidos sanguíneos (excepto en las branquias) de *P. humeralis* bajo hipoxia, mientras que en general no se observaron cambios en *A. scapularis* (Figura 3c-d), excepto un aumento significativo ($p = 0.04$) debido a la hipoxia en el músculo.

Finalmente, ambas especies mostraron una disminución de ALK bajo hipoxia en hígado y sangre, y solo se registró un aumento en sangre (de 1.95 a 2.30 U mg de proteína-1) de *P. humeralis* debido a la hipoxia (Figura 3e-f).

Discusión

Respuesta a corto plazo a la hipoxia

Los peces marinos presentan numerosas adaptaciones a las condiciones ambientales fluctuantes. En particular, dentro de un rango de saturación de oxígeno especie-específico, la mayoría de los teleósteos son capaces de mantener una absorción constante de oxígeno (Calderer, 2001; Neill et al., 1991), gracias a adaptaciones fisiológicas como el aumento de la ventilación branquial, de la perfusión y el área de superficie, el aumento del gasto cardíaco y una mayor afinidad de unión entre la hemoglobina sanguínea y el

oxígeno (Calderer, 2001; Farrell, 2009; Graham, 1997; Richards, 2011; Russell et al., 2008; Speers-Roesch et al., 2010; Bueno, 2009). Además, presentan una amplia variedad de respuestas conductuales a la disminución de la saturación de oxígeno ambiental.

Un mecanismo de respuesta común de los peces en condiciones hipóxicas es el aumento de la FV con el objetivo de compensar la baja disponibilidad de oxígeno en el agua aumentando su tasa de absorción y así mantener niveles estables de oxígeno en los tejidos (Richards, 2011). Por lo tanto, se espera que la FV aumente en función del agotamiento de oxígeno; sin embargo, cuando se alcanza un nivel subóptimo de saturación de oxígeno, la FV muestra un aumento dramático (Cerezo-Valverde et al., 2006). Aunque *P. humeralis* y *A. scapularis* aumentó la FV bajo hipoxia progresiva, la Vcp se presentó a una saturación de oxígeno mucho mayor para *A. scapularis* que para *P. humeralis*. Esto reflejó una mayor sensibilidad de *A. scapularis* a la hipoxia. Por el contrario, el Vcp relativamente bajo observado en *P. humeralis*, demostró su buena capacidad para regular la captación de oxígeno en condiciones hipóxicas. Incluso en condiciones normóxicas, *A. scapularis* mostró una FV más alta que *P. humeralis*, relacionada con un metabolismo más rápido que probablemente demanda más energía para su mantenimiento.

A temperaturas más altas, *A. scapularis* parece ser más sensible a la hipoxia que *P. humeralis*. La temperatura es un factor importante a considerar al evaluar las respuestas de los peces a la hipoxia, ya que afecta la disponibilidad de oxígeno en el agua, lo que lleva a un aumento en el consumo de oxígeno, además de reducir la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (Cerezo-Valverde et al., 2006; Farrell y Richards, 2009). De hecho, la Vcp en *P. humeralis* no se vio afectada por la temperatura, pero *A. scapularis* sí mostró una Vcp más alta a 22 que a 16 °C, así como una VFmax más alta, seguida inmediatamente por una caída en la VF, que finalmente condujo a muerte. Además, en *P. humeralis*, el VFmax ocurrió a 22 °C seguido de una caída en VF, no observada a 16 °C, y sin mortalidad. Este evento evidenció una leve sensibilidad de *P. humeralis* a la hipoxia a temperaturas más altas, a pesar de su rango de tolerancia más amplio. Se ha reportado un efecto de temperatura similar en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), con saturaciones de oxígeno letales que aumentan con la temperatura (Schurmann y Steffensen, 1992), mientras que Plante et al. (1998) no encontraron diferencias entre la tolerancia a la hipoxia del bacalao a 6 y 2 °C. Además, para ambas especies de nuestro estudio, las pendientes por encima de la Vcp no mostraron diferencias entre las dos temperaturas. Entonces, a saturaciones de oxígeno superiores a Vcp, el VF está en función de la disponibilidad de oxígeno ambiental y, por tanto, su regulación es similar, independientemente de la temperatura.

Respuesta a largo plazo a la hipoxia

La hipoxia indujo diferentes respuestas en Lt50 y comportamiento entre ambas especies en este estudio, como se esperaba, ya que habitan diferentes condiciones ambientales. A lo largo de la costa peruana, *A. scapularis* está presente en zonas submareales rocosas, a profundidades de hasta 35 m, donde el agua de mar presenta altas saturaciones de oxígeno

estables; mientras que el pez bentopelágico *P. humeralis* se distribuye desde aguas someras hasta profundidades de hasta 200 m, y donde con frecuencia se observan condiciones hipóxicas o anóxicas. Estas condiciones ambientales contrastantes podrían haber llevado a adaptaciones diferenciadas, fisiológicas y de comportamiento, que se registraron durante este estudio. Así, al 60% de saturación de oxígeno, *A. scapularis* mostró un Lt50 corto y una mortalidad total rápida (menos de 1 h), mientras que al 5% de saturación de oxígeno *P. humeralis* no mostró mortalidad durante el experimento (31 días). Varios informes también mencionaron que Lt50 difiere entre especies de diferentes hábitats. Por ejemplo, para el besugo (*Chrysophrys major*), un pez demersal que vive en aguas poco profundas, se ha reportado el Lt50 a los 60 min con una concentración de oxígeno del 10%, mientras que al 5% la mortalidad fue demasiado rápida para ser registrada (Woo, 1990). La platija europea *Platichthys flesus*, de fondos arenosos poco profundos que se ve afectada por deficiencias periódicas de oxígeno, mostró un Lt50 de aproximadamente 30 a 20% de saturación de oxígeno (Tallqvist et al., 1999). En el caso del spot *Leiostomus xanthurus*, una especie demersal que vive en áreas costeras, cerca de fondos arenosos o fangosos, la mortalidad se reportó a una saturación de oxígeno de aproximadamente 16% a 25 °C (Cooper, 2002). Este amplio rango en Lt50 refleja que la sensibilidad a la hipoxia varía mucho entre los peces marinos, lo que implica una variedad de estrategias metabólicas y conductuales adaptativas para hacer frente a las condiciones hipóxicas (Vaquer y Duarte, 2008). Sin embargo, pocos estudios han evaluado y comparado el Lt50 de los peces durante la hipoxia progresiva. Además, la diferencia entre protocolos experimentales dificulta la comparación de resultados entre estudios (David, 1975).

La alteración de la actividad de natación también reflejó diferencias en la respuesta de tolerancia bajo hipoxia, entre especies. De hecho, *A. scapularis* primero aumentó la actividad de natación, pero después de algún tiempo los peces mostraron una pérdida de equilibrio y se hundieron hasta el fondo del acuario donde permanecieron hasta la muerte. Mientras que *P. humeralis* mostró una actividad reducida desde el inicio de la exposición, y permaneció casi inmóvil en el fondo del acuario durante todo el período del experimento. En un ambiente con saturación constante de oxígeno, las especies intolerantes a la hipoxia, como *A. scapularis*, responderían aumentando su actividad de natación (y por lo tanto su FV) para evitar o "escapar" de las aguas subóptimas. Si no se puede evitar la condición hipóxica, los peces que experimentan un aumento en el metabolismo mostrarán rápidamente un comportamiento estresado, que probablemente iría seguido de la muerte si persiste la hipoxia (Richards, 2009). Las especies tolerantes, como *P. humeralis* que viven cerca del fondo, están expuestas a condiciones hipóxicas recurrentes. Durante estos eventos, una disminución en la actividad de natación, que podría permitir la redistribución de energía para el mantenimiento del organismo, hace que los peces resistan condiciones subóptimas durante períodos relativamente largos. De hecho, las especies tolerantes a la hipoxia han sido descritas como "raramente atléticas" por Farrell (2009). Sin embargo, la respuesta típica de evitación de los peces intolerantes a la hipoxia también se ha observado en especies bentónicas, como especies de peces planos como la platija europea (*Platichthys flesus*), el lenguado común (*Solea solea*) y la platija de invierno (*Pleuronectes americanus*) (Dalia Via et al., 1997; McEnroy y

Krolowitz, 1997; Tallqvist et al., 1999), lo que demuestra que el hábitat por sí solo no es suficiente para determinar si una especie es tolerante a la hipoxia.

Actividad enzimática

Las condiciones hipóxicas también pueden desencadenar mecanismos de respuesta en el metabolismo de los peces. Por lo tanto, una vez que falla la primera estrategia de aumento de la absorción de oxígeno, ocurren respuestas bioquímicas que intentan modificar los mecanismos de producción de energía metabólica y / o reducir la demanda de energía (Richards, 2011). Se evidenció una respuesta a la hipoxia con el aumento de la actividad de LDH en el músculo tanto de *P. humeralis* como de *A. scapularis* (mostrando en general una mayor actividad enzimática). Se han reportado altos niveles actividad enzimática relacionados con la glucólisis anaeróbica muscular, lo que resulta en la reducción del piruvato en lactato, mediante catálisis de LDH (Vijayan et al., 1997). Asimismo, se han reportado incrementos en el sustrato de lactato en especies de peces en condiciones hipóxicas, como la trucha arco iris *Salmo gairdneri* (Dunn y Hochachka, 1986) y el lenguado común *Solea solea* (Dalla Via et al., 1997). Los organismos tolerantes a la hipoxia, que pueden soportar exposiciones prolongadas a niveles bajos de oxígeno, pueden conservar su energía reduciendo su metabolismo, regulando o modificando la síntesis de proteínas (Wu, 2002), o también pueden obtener su energía del metabolismo anaeróbico. La glucólisis anaeróbica es la vía metabólica que suministra ATP a las células e involucra al lactato deshidrogenasa (LDH), cuya actividad aumenta en condiciones de baja saturación de oxígeno (MacIntyre, 2011).

En este contexto, es importante mencionar aquí que, durante la exposición a la hipoxia, *P. humeralis* mostró baja actividad de natación y permaneció en el fondo del acuario, mientras que *A. scapularis* aumentó su natación activa. En consecuencia, la demanda de energía de *A. scapularis* habría aumentado, probablemente provocando un aumento de la glucólisis, que por lo tanto podría reflejarse en un aumento de la actividad de LDH. Algunos estudios reportaron que los peces podrían reducir su actividad en condiciones hipóxicas, como una estrategia para preservar la energía y compensar el estrés metabólico (Schurmann y Steffensen, 1994; Dalla Via et al., 1998; Herbert y Wells, 2001; Herbert y Steffensen, 2005). En este sentido, la reducida actividad que presenta *P. humeralis*, podría permitirle maximizar su alcance metabólico y asignación energética, y en consecuencia permanecer dentro de los límites óptimos del costo de su mantenimiento, como también se ha descrito para el bacalao atlántico *Gadus morhua*. (Claireaux et al., 2000). Además, la ausencia de una diferencia significativa en la pérdida de peso de *P. humeralis*, entre normoxia e hipoxia, sugiere que se habría producido una reubicación de energía eficiente bajo hipoxia. Aunque ambas especies mostraron un aumento de la actividad de LDH en el músculo en condiciones hipóxicas.

La SOD es una de las enzimas antioxidantes más importantes que participa en el mecanismo de defensa contra ROS, en el metabolismo aeróbico (Fridovich, 1995); de modo que a medida que aumenta el estrés oxidativo, se espera que se produzcan aumentos

en la actividad de la SOD. En nuestro estudio, esto se observó con *P. humeralis*, mostrando un aumento de la SOD en músculo, hígado y sangre, en contraste con *A. scapularis* que permaneció estable en general, con un aumento solo en el músculo. En particular, el hígado es responsable de la desintoxicación, el metabolismo xenobiótico y el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales en los peces (Welker et al., 2012). Por lo tanto, los niveles más altos de SOD registrados en el hígado de *P. humeralis* podrían reflejar una mayor capacidad de defensa contra el estrés oxidativo, respaldada por el concepto de “preparación para el estrés oxidativo”, introducido por Hermes-Lima et al. (2015). Este concepto sugiere que los organismos que tienden a enfrentar con frecuencia un amplio rango de variación en la disponibilidad de oxígeno podrían mejorar su respuesta antioxidante durante eventos de bajo oxígeno. Entonces, la evidencia de aumento de SOD bajo hipoxia apoya la hipótesis de que *P. humeralis* presenta un mecanismo de preparación con capacidad para enfrentar el estrés oxidativo. De manera similar, se ha reportado un aumento en la actividad de SOD como respuesta al estrés oxidativo en el pez carácido *Cyphocharax abramoides* (Johannsson et al., 2018), una especie expuesta a frecuentes eventos hipóxicos, como *P. humeralis*. Además, la menor actividad de SOD registrada en branquias de *P. humeralis* en hipoxia con respecto a normoxia, probablemente relacionada con la función tisular, también se ha reportado en el pez estuarino *Leiostomus xanthurus*, donde no se registraron diferencias significativas (Cooper et al., 2002).

La AKP es una de las enzimas multifuncionales más importantes implicadas en el metabolismo, que cataliza la hidrólisis de los monoésteres de fosfatasa en radicales orgánicos y fosfato inorgánico (Sharma et al., 2014). Esta enzima está presente en diferentes tejidos, pero concentrada principalmente en el hígado, cuya actividad se ve afectada por cambios ambientales (Wang et al., 2017). La actividad de AKP se correlaciona positivamente con la gravedad de los factores estresantes; y también es importante mencionar que los aumentos de concentración de enzimas generan un impacto adverso en el organismo (Li et al., 2009, Yin et al., 2015, Wang et al., 2017). En este estudio, el tratamiento de hipoxia de 2 h no pudo ser considerado como un estresante intenso, evidenciado por la disminución de los niveles de AKP respecto a la normoxia, en general para ambas especies. También, por ejemplo, estudios en lobina negra *Micropterus salmoides* mencionaron aumentos de la actividad de AKP en branquias e hígado, observados después de 12 a 24 h de exposición a hipoxia (Sun et al., 2020). En ese sentido, nuestros resultados podrían evidenciar una respuesta metabólica temprana de los organismos en condiciones de estrés inicial, siendo necesarios estudios futuros que consideren exposiciones prolongadas a hipoxia para una mejor comprensión de la respuesta de las especies a los cambios temporales bajo diferentes niveles de estrés oxidativo.

Implicaciones en el contexto de la desoxigenación de los océanos

Las áreas hipóxicas se están volviendo más comunes y severas en los sistemas marinos. La concentración de oxígeno disuelto ha cambiado drásticamente en las últimas décadas (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008). Se espera que este fenómeno continúe y se intensifique debido a la eutrofización (Díaz et al., 2012) y al aumento de la temperatura del mar (Wu, 2002). La desoxigenación de los océanos del mundo se ha destacado como un componente importante del cambio climático (Montgomery et al., 2019).

Uno de los desafíos que enfrenta la humanidad es lograr la seguridad alimentaria para las próximas generaciones, haciendo uso de los recursos naturales en todas las dimensiones del desarrollo sostenible: social, económica y ambiental (Naciones Unidas, 2015). El pescado es una fuente importante de proteínas, vitaminas y otros nutrientes esenciales, y la creciente demanda de este recurso ejerce presión sobre la explotación de los recursos naturales (HLPE, 2014; FAO, 2016). Este aumento tanto en la extensión como en la intensidad de los eventos hipóxicos pone en peligro el futuro de actividades como la pesca y la acuicultura en el mundo, debido al aumento de la mortalidad de organismos. Ser capaz de comprender las respuestas a la hipoxia en diferentes especies es fundamental para comprender los procesos de adaptación. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ayudar a comprender mejor la vulnerabilidad de las especies en nuestros océanos y a desarrollar estrategias para evitar o reducir los impactos de la desoxigenación en la pesca y la acuicultura.

P. humeralis y *A. scapularis* son especies de importancia económica en el Perú, y en los últimos años ha aumentado el interés por desarrollar su acuicultura. La respuesta y adaptaciones mostradas por *A. scapularis* (Vcp alto, Lt50 corto y actividad LDH alta) lo hacen especialmente vulnerable a la reducción de la concentración de oxígeno. Normalmente, los peces tendrían una respuesta de evitación al factor estresante (en este caso, la baja concentración de oxígeno); sin embargo, en un entorno de acuicultura donde los peces se mantienen en condiciones de confinamiento, la eventual muerte de los organismos podría ser inevitable. Por otro lado, la respuesta de *P. humeralis* es distintiva de las especies tolerantes a la hipoxia, lo que le permitiría enfrentar los eventos de hipoxia de manera más eficiente y durante períodos prolongados. No obstante, el problema de la hipoxia a nivel ambiental debe evaluarse para ambas especies, junto con más estudios metabólicos. Aún se necesitan más estudios sobre el estrés oxidativo junto con la hipoxia para comprender completamente los mecanismos de tolerancia y respuesta de estas dos especies. Estos estudios deben evaluar la exposición hipóxica crónica, así como las oscilaciones en el suministro de oxígeno que podrían reflejar los ritmos diurnos, junto con otros factores de estrés ambiental como los niveles elevados de CO₂ y la temperatura, ya que se ha predicho que afectarán la disponibilidad de oxígeno en el futuro.

Agradecimientos

Queremos agradecer al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) por el financiamiento a través del proyecto PpR Desarrollo y Manejo de la Acuicultura, así como al JEAI-Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

Referencias bibliográficas

Aguirre-Velarde, A., Jean, F., Thouzeau, G. & Flye-Sainte-Marie, J. (2016). Effects of progressive hypoxia on oxygen uptake in juveniles of the Peruvian scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 451, 385–389.

Allen, G., Robertson, R., Rivera, R., Edgar, F., & Merlen, G. (2015). *Anisotremus scapularis*, The IUCN Red List of Threatened Species. Available at <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T183256A8081555.en>.

Barreto, R. E., & Volpato, G. L. (2004). Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Processes*, 66(1), 43–51.

Behrens, J. (2007). Effect of Global Change related oxygen depletion on fish; lesser sandeel (*Ammodytes tobianus*) as model organism. Retrieved from <http://www.neri.dk>

Burton, D. T., & Heath, A. G. (1980) Ambient oxygen tension (Po₂) and transition to anaerobic metabolism in three species of freshwater fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 1216–1224.

Calderer, A. C. (2001). Influencia de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y consumo de oxígeno de la dorada, *Sparus aurata* L. (Doctoral thesis, University of Barcelona, Spain). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=3122>

Cerezo Valverde, J., Martínez López, F.-J., & García García, B. (2006). Oxygen consumption and ventilatory frequency responses to gradual hypoxia in common dentex (*Dentex dentex*): Basis for suitable oxygen level estimations. *Aquaculture*, 256, 542–551.

Chirichigno, N., & Cornejo, M. (2001). Catálogo comentado de los peces marinos del Perú. Instituto del Mar del Perú. Callao. Special Publication, April. Available at <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PE2001104873>

Claireaux, G., & Chabot, D. (2016). Responses by fishes to environmental hypoxia: Integration through Fry's concept of aerobic metabolic scope. *Journal of Fish Biology*, 88, 232-251.

Claireaux, G., Webber, D., Lagardère, J.-P., & Kerr, S. (2000). Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Sea Research*, 44, 257-265.

Cooper, R. U., Clough, L. M., Farwell, M. A. & West, T. L. (2002). Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279, 1– 20.

David, J. C. (1975). Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32, 2295-2332.

Dalla Via, J., van den Thillart, G., Cattani, O., & Cortesi, P. (1997). Environmental versus functional hypoxia/anoxia in sole *Solea solea*: the lactate paradox revisited. *Marine Ecology Progress Series*, 154, 79–90.

Dalla Via, J., van den Thillart, G., Cattani, O., & Cortesi, P. (1998). Behavioural responses and biochemical correlates in *Solea solea* to gradual hypoxic exposure. *Canadian Journal of Zoology*, 76, 2108–2113.

Diaz, R. J., Rabalais, N. N., & Breitburg, D. L. (2012). Agriculture's Impact on Aquaculture: Hypoxia and Eutrophication in Marine Waters. Organization for Economic Co-operation and Development. Available at <https://www.iucnredlist.org/species/183256/8081555>.

Dionicio-Acedo, J., Rosado-Salazar, M., Flores-Mego, J., Flores-Ramos, L., & Aguirre-Velarde, A. (2017). Evaluación de dietas comerciales en el crecimiento y su efecto en la composición bioquímica muscular de juveniles de chita, *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) (Familia: Haemulidae). *Latin american journal of aquatic research*, 45(2), 410-420.

Dunn, J. F., & Hochachka, P. W. (1986). Metabolic responses of trout (*Salmo gairdneri*) to acute environmental hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 123, 229-242.

- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- Farrell, A. P., & Richards, J. G. (2009). Chapter 11 Defining Hypoxia. In G. Jeffrey, A. P. F. Richards & J. B. Colin (Eds.), *Fish Physiology*, 27, 487–503.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97–112.
- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. Hoar, W. S., & Randall, D. J. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, London, 1-98.
- Goicochea, C., Moquillaza, P., & Mostacero, J. (2012). Edad y crecimiento de *Paralabrax humeralis* (Valenciennes) en el mar del Callao, 1996. Retrieved from <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/handle/123456789/2199>
- Graham, J. B. (1997). *Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity and Adapation*. San Diego, CA: Academic Press.
- Grieshaber, M. K., Kreutzer, U., Pörtner, H. O. (1988) Critical PO₂ of Euryoxic Animals. In: Acker H. (eds) *Oxygen Sensing in Tissues*. Springer, Berlin, Heidelberg (pp 37-48).
- Hvas, M., & Oppedal, F. (2019). Physiological responses of farmed Atlantic salmon and two cohabitant species of cleaner fish to progressive hypoxia. *Aquaculture*, 512, 734353.
- Herbert, N. A., & Wells, R. M. G. (2001). The aerobic physiology of the airbreathing blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, necessitates behavioural regulation of breath-hold limits during hypoxic stress and predatory challenge. *Journal of Comparative Physiology B*, 171, 603–612.
- Herbert, N. A., & Steffensen, J.F. (2005). The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Marine Biology*, 147, 1403-1412.
- Hermes-Lima, M., Moreira, D. C., Rivera-Ingraham, G.A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T. C., & Campos, E. G. (2015). Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1122-1143.

HLPE. (2014). La pesca y la acuicultura sostenibles para la seguridad alimentaria y la nutrición. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, Roma.

Iannacone, J., & Alvarino, L. (2012). Microecología del monogeneo Mexicana sp. en las branquias de *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) (Osteichthyes, Haemulidae) de la costa marina de lima, Perú. *Neotropical Helminthology*, 6, 277-285 pp.

Instituto del Mar del Perú. (2020). Boletín semanal de la temperatura superficial del mar en el litoral peruano. Año 5, N°52. Retrieved from http://imarpe.gob.pe/imarpe/ultimo_archivo.php?id_seccion=boletin_semanal_TSM_litoral_peruano

Ishibashi, Y., Ekawa, H., Hirata, H., & Kumai, H. (2002). Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. *Fisheries Science*, 68, 1374–1383. Johannsson, O. E., Giacomini, M., Sadauskas-Henrique, H., Campos, D. F., Braz-Mota, S., Heinrichs-Caldas, W. D., Baptista, R., Wood, C. M., Almeida-Val, V. M. F., & Val, A. L. (2018). Does hypoxia or different rates of re-oxygenation after hypoxia induce an oxidative stress response in *Cyphocharax abramoides* (Kner 1858), a Characid fish of the Rio Negro?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 224, 53–67.

Kramer, D. L. (1987). Dissolved oxygen and fish behaviour. *Environmental Biology of Fishes*, 18, 81-92.

León-Palomino, C., Flores-Mego, J., Dionicio-Acedo, J., Rosado-Salazar, M., Flye-Sainte-Marie, J., & Aguirre-Velarde, A. (2017). Thermal preference and tolerance of Peruvian grunt *Anisotremus scapularis* juveniles (Pisces:Haemulidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 581-589.

Levin, L. A., Ekau, W., Gooday, A. J., Jorissen, F., Middelburg, J. J., Naqvi, S. W. A., Neira, C., Rabalais, N. N., & Zhang, J. (2009). Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos. *Biogeosciences*, 6, 2063-2098.

Li, H.T., Ying, D.J., He, X.C., Sun, J.S., & Chen, L. (2009). Stereoscopic study on capillary density of early brain oedema in a dog postburn model. *International Journal of the Care of the Injured*, 40, 835-839.

Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 283–289.

MacIntyre, S. T. D. (2011). The Effects of Metabolic Depression Induced by Food Deprivation on Hypoxia Tolerance of Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Master thesis). Available from Queen's University Library https://qspace.library.queensu.ca/bitstream/handle/1974/6838/Scott_MacIntyre_T_2011_09_MSc.pdf;jsessionid=10251AE9C0A9F0B73FE1253925B9C391?sequence=1.

Magnum, C., & Van Winkle, W. (1973). Responses of Aquatic Invertebrates to Declining Oxygen Conditions. *American Zoologist*, 13(2), 529-541.

McEnroy, M. & Krozlowitz, D. (1997). Activity of juvenile winter flounder, *Pleuronectes americanus*, in response to progressive environmental hypoxia. In: Proc. Long Island Research Conf., CT Sea Grant Institute, Univ. of Connecticut, Avery Point, USA. Publ. No CTSG-97-08, 53–59.

Miñano, J. B. & Castillo, J. (1971). Investigación biológica preliminar de la “cabrilla” *Paralabrax humeralis* (Valenciennes) en Chimbote. Instituto del Mar del Perú. Callao. Special Publication, May. Available at <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/1673>

Muggeo, V. M. R. (2008). Segmented: an R package to fit regression models with broken-line relationships. *R News*, 8, 20–25.

Nikinmaa, M. (2002). Oxygen-dependent cellular functions—why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133, 1–16.

Pichavant, K., Maxime, V., Thebault, M. T., Ollivier, H., Garnier, J. P., Bousquet, B., Diouris, M., Boeuf, G., & Nonnotte, G. (2002). Effects of hypoxia and subsequent recovery on turbot *Scophthalmus maximus*: hormonal changes and energy metabolism. *Marine Ecology Progress Series*, 225, 275–285.

Plante, S., Chabot, D., & Dutil, J. D. (1998). Hypoxia tolerance in Atlantic cod. *Journal of Fish Biology*, 53(6), 1342–1356.

Prosser, C. L. (1973). *Comparative animal physiology*. Saunders, Philadelphia. Available at <https://ia800200.us.archive.org/33/items/comparativeanima00pros/comparativeanima00pros.pdf>

R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at <https://www.R-project.org/>.

Remen, M., Sievers, M., Torgersen, T., & Oppedal, F. (2016). The oxygen threshold for maximal feed intake of Atlantic salmon post-smolts is highly temperature-dependent *Aquaculture*, 464, 582-592.

Richards, J. G. (2009). Chapter 10 Metabolic and Molecular Responses of Fish to Hypoxia. In G. Jeffrey, A. P. F. Richards & J. B. Colin (Eds.), *Fish Physiology*, 27, 443–485.

Richards, J. G. (2011). Physiological, behavioural and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 191-199.

Rosado-Salazar, M., Dionicio-Acedo, J., Flores-Mego, J., Vásquez, F., Cosio, L., & Aguirre-Velarde, A. (2018). Perfil de ácidos grasos y contenido energético en músculo de juveniles de cabrilla (*Paralabrax humeralis*) acondicionados al cautiverio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 142-150.

Russell, M. J., Dombkowski, R. A. & Olson, K. R. (2008). Effects of hypoxia on vertebrate blood vessels. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309A, 55-63.

Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269–278.

Schurmann, H., & Steffensen, J. F. (1994). Spontaneous swimming activity of Atlantic cod *Gadus morhua* exposed to graded hypoxia at three temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 197, 129–142.

- Speers-Roesch, B., Sandblom, E., Lau, G. Y., Farrell, A. P. & Richards, J. G. (2010). Effects of environmental hypoxia on cardiac energy metabolism and performance in tilapia. *American Journal of Physiology*, 298, R104-R119.
- Sun, J-L., Zhao, L-L., Liao, L., Tang, X-H., Cui, C., Liu, Q., He, K., Ma, J-D., Jin, L., Yan, T., Zhou, J., & Yang, S. (2020). Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 98, 923-936.
- Tagliari, K. C., Vargas, V. M. F., Zimiani, K., & Cecchini, R. (2004). Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17, 149–157.
- Tallqvist, M., Sandberg-Kilpi, E., & Bonsdorff, E. (1999). Juvenile flounder, *Platichthys flesus* (L.), under hypoxia: Effects on tolerance, ventilation rate and predation efficiency. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 242(1), 75–93.
- United Nations. (2015). Resolución 70/1 de la Asamblea General “Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible” A/RES/70/1. Available at http://unctad.org/meetings/es/SessionalDocuments/ares70d1_es.pdf
- Van Raaij, M. T. M., Van den Thillart, G. E. E. J. M., Vianen, G.J., Pit, D. S. S., Balm, P. H. M., & Steffens, A. B. (1996). Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) and common carp (*Cyprinus carpio*, L.) during deep hypoxia and subsequent recovery. *Journal of Comparative Physiology B*, 166, 443–452.
- Vaquer-Sunyer, R., & Duarte, C. M. (2008). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 15452–15457.
- Vaquer-Sunyer, R., & Duarte, C. M. (2010). Temperature effects on oxygen thresholds for hypoxia in marine benthic organisms. *Global Change Biology*, 17, 1788–1797.
- Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York.

- Vijayan, M. M., Pereira, C., Gordon Grau, E. & Iwama, G. K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in Tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116C, 89-95.
- Wang, Q. F., Shen, W. L., Hou, C. C., Liu, C., Wu, X. F., & Zhu, J. Q. (2017). Physiological responses and changes in gene expression in the large yellow croaker *Larimichthys crocea* following exposure to hypoxia. *Chemosphere*, 169, 418-427.
- Wannamaker, C. M., & Rice, J. A. (2000). Effects of hypoxia on movements and behaviour of selected estuarine organisms from the southeastern United States. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249, 145–163.
- Wells, R. M. G. (2009). Blood-gas transport and haemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia. In J. G. Richards, A. P. Farrell and C. J. Brauner (Eds.), San Diego, California (pp 255-299).
- Woo, N. Y. S. (1990). Metabolic and osmoregulatory changes during temperature acclimation in the red sea bream, *Chrysophrys major*, implications for its culture in the subtropics. *Aquaculture*, 37, 197-208.
- Wu, R. S. (2002). Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 35–45.
- Yin, F., Gong, H., Ke, Q., & Li, A. (2015). Stress, antioxidant defence and mucosal immune responses of the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* challenged with *Cryptocaryon irritans*. *Fish Shellfish Immunology*, 47, 344-351.
- Zhang, J., Gilbert, D., Gooday, A. J., Levin, L., Naqvi, S. W. A., Middelburg, J. J., Scranton, M., Ekau, W., Peña, A., Dewitte, B., Oguz, T., Monteiro, P.M.S, Urban, E., Rabalais, N. N., Ittekkot, V., Kemp, W. M., Ulloa, O., Elmgren, R., Escobar-Briones, E., & Van der Plas, A.K. (2010). Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: Synthesis and future development. *Biogeosciences*, 7, 1443-1467.
- Zhang, G., Mao, J., Liang, F., Chen, J., Zhao, C., Yin, S., Wang, L., Tang, Z., & Chen, S. (2016). Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 151, 271-279.

Zhu, C. D., Wang, Z. H., & Yan, B. (2013). Strategies for hypoxia adaptation in fish species: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 183(8), 1005–1013.

Figuras y Tablas

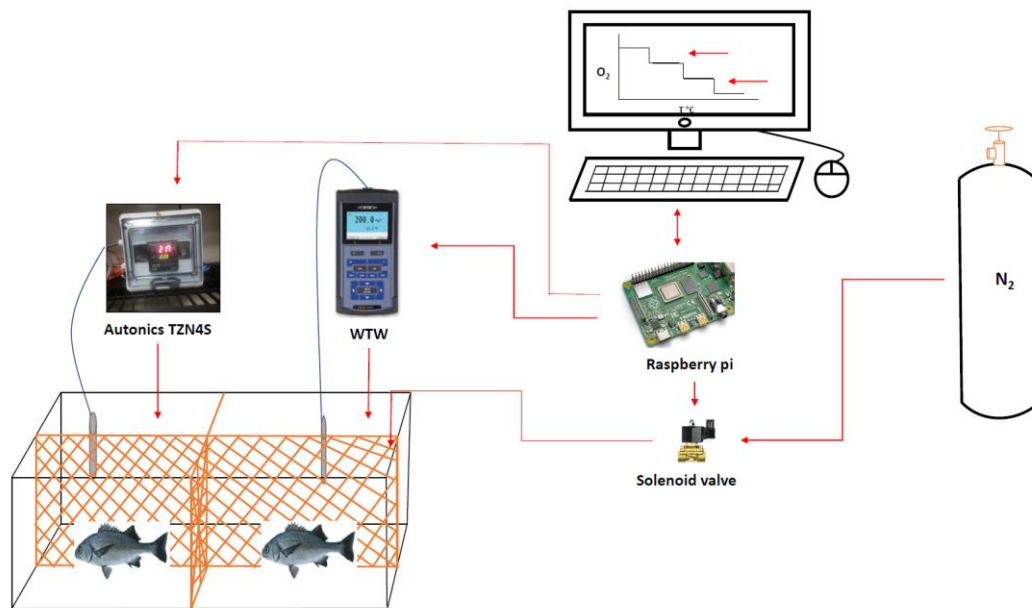


Figure 1. Schematic representation of the experimental setting for the ventilatory frequency (VF) determination. Each fish is restricted to 25% of the total water volume of a 90 L aquarium. Temperature and oxygen saturation control systems are represented.

Figura 1. Representación esquemática del escenario experimental para la determinación de la frecuencia ventilatoria (FV). Cada pez está restringido al 25% del volumen total de agua de un acuario de 90 L. Se representan los sistemas de control de temperatura y saturación de oxígeno.

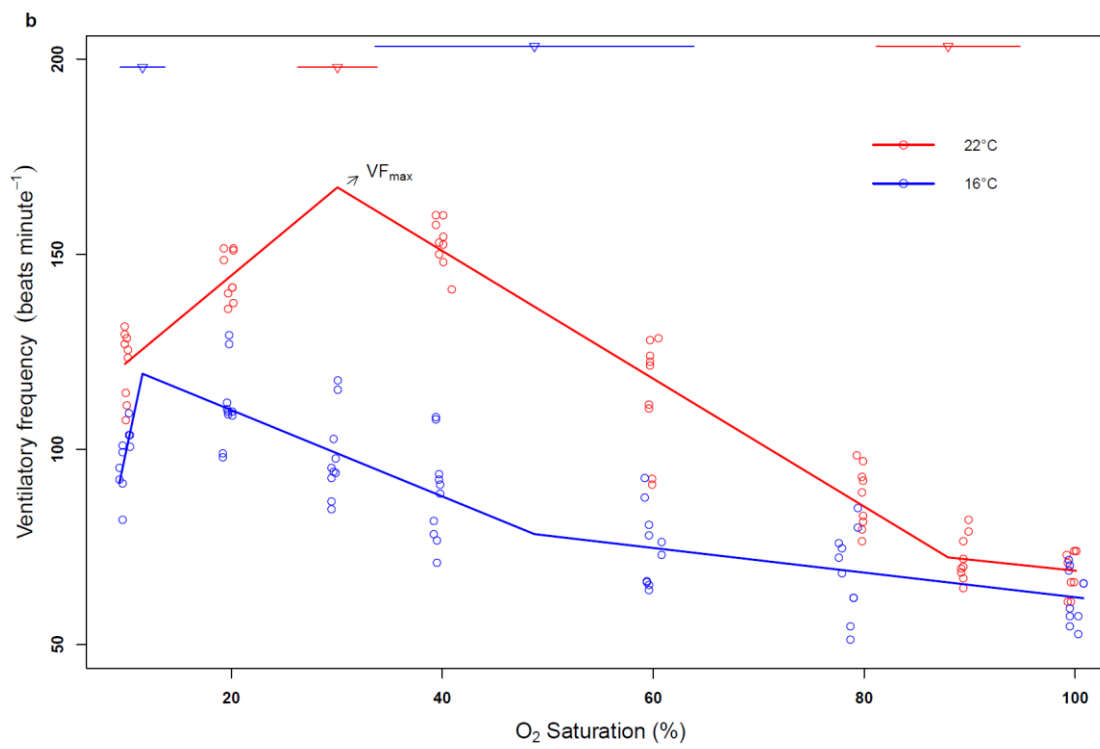
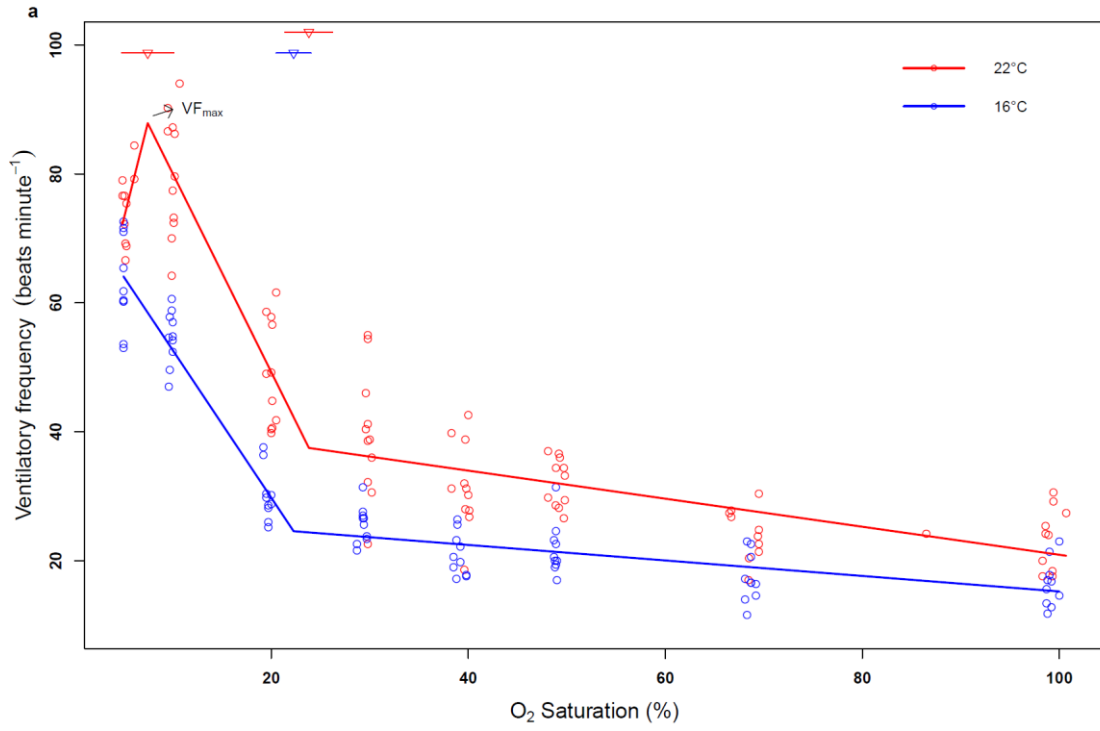


Figure 2. Ventilatory frequency (beats minute⁻¹) of *Paralabrax humeralis* (a) and *Anisotremus scapularis* (b), exposed to progressive hypoxia, at 16°C and 22 °C. Solid lines represent the segmented linear models used for the determination of the ventilatory critical points (Vcp). Maximum ventilatory frequency (VFmax). Triangles and lines at the top of the graph represent the 95% confidence interval (CI).

Figura 2. Frecuencia ventilatoria (pulsación minuto⁻¹) de *Paralabrax humeralis* (a) y *Anisotremus scapularis* (b), expuestos a hipoxia progresiva, a 16 °C y 22 °C. Las líneas continuas representan los modelos lineales segmentados utilizados para la determinación de los puntos críticos ventilatorios (Vcp). Frecuencia ventilatoria máxima (VFmax). Los triángulos y las líneas en la parte superior del gráfico representan el intervalo de confianza (IC) al 95%.

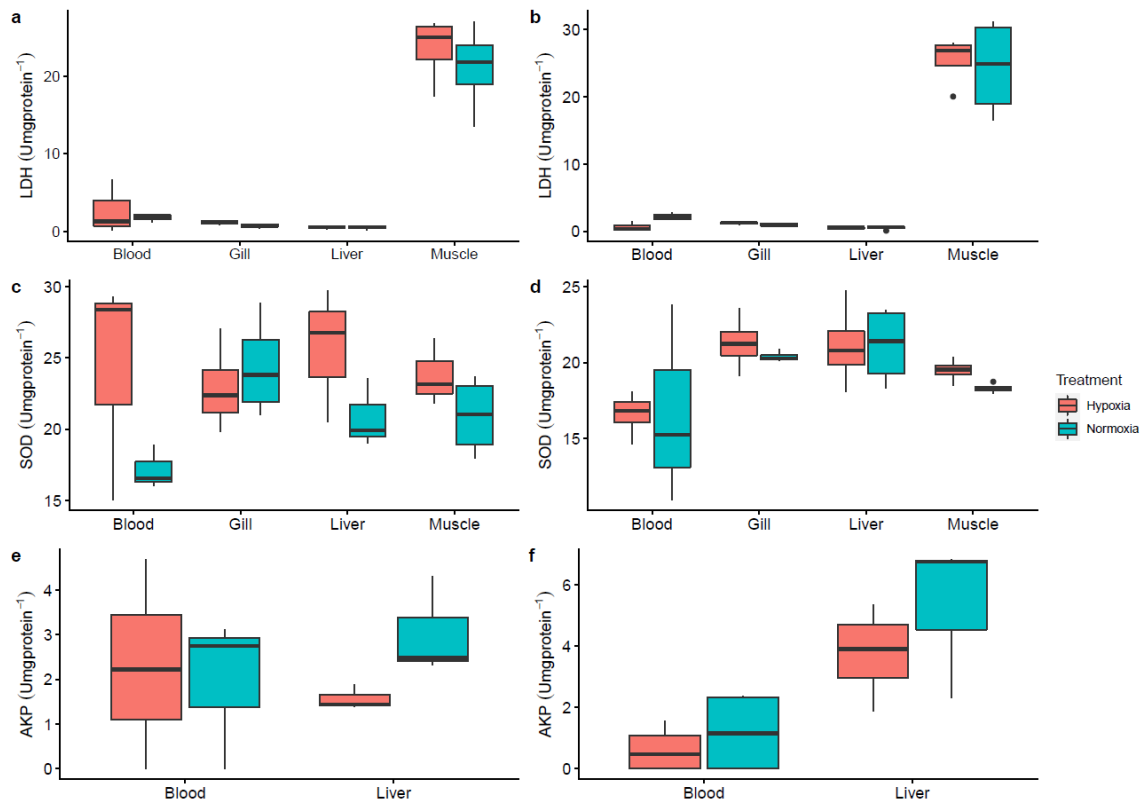


Figure 3. Enzymatic activity of LDH (a, b), SOD (c, d) AKP (e, f) in blood, gill, liver and muscle of *Paralabrax humeralis* and *Anisotremus scapularis*, after 2 h of exposure to hypoxic (15% oxygen saturation) and normoxic (100% oxygen saturation).

Figura 3. Actividad enzimática de LDH (a, b), SOD (c, d) AKP (e, f) en sangre, branquias, hígado y músculo de *Paralabrax humeralis* y *Anisotremus scapularis*, después de 2 h de exposición a hipóxia (15% saturación de oxígeno) y normóxia (100% de saturación de oxígeno).

Table 1. Ventilatory critical point (Vcp) of *Paralabrax humeralis* and *Anisotremus scapularis* during progressive hypoxia at 16 and 22°C. ANCOVA of slope segments prior to the Vcp ($p < 0.001$). CI: 95% confidence interval.

Tabla 1. Punto crítico ventilatorio (Vcp) de *Paralabrax humeralis* y *Anisotremus scapularis* durante la hipoxia progresiva a 16 y 22 °C. ANCOVA de los segmentos de

Temperature (°C)	Vcp (% ± CI)	
	<i>P. humeralis</i>	<i>A. scapularis</i>
16	22.3% ± 0.9	48.7% ± 7.6
		11.59% ± 1.0
22	23.8% ± 1.2	98.6% ± 0.9
	7.5% ± 1.3	29.9% ± 1.9

pendiente antes del Vcp ($p < 0,001$). IC: intervalo de confianza al 95%.

Table 2. Lt50 and changes in the behaviour of *Paralabrax humeralis* and *Anisotremus scapularis* observed over a period of 31 days at 5% oxygen saturation (*P. humeralis*) and 60% oxygen saturation (*A. scapularis*).

Tabla 2. Lt50 y cambios en el comportamiento de *Paralabrax humeralis* y *Anisotremus scapularis* observados durante un período de 31 días al 5% de saturación de oxígeno (*P. humeralis*) y al 60% de saturación de oxígeno (*A. scapularis*).

Species	Lt50	
	Mortality	Behaviour
<i>P. humeralis</i> (5% O ₂ sat)	No	Reduced active swimming No loss of balance Remained at the bottom
<i>A. scapularis</i> (60% O ₂ sat)	36 min 43 min 13 s (total mortality)	Increased active swimming Remained lying down at the bottom

Table 3. Student's t-test significance values obtained after assessing differences between the activity of the enzymes, in each tissue, under conditions of normoxia (100% oxygen saturation) and hypoxia (15% oxygen saturation) for an exposure period of 2 hours.

Tabla 3. Valores de significancia de la prueba t de Student obtenidos después de evaluar las diferencias entre la actividad de las enzimas, en cada tejido, en condiciones de normoxia (saturación de oxígeno al 100%) e hipoxia (saturación de oxígeno al 15%) durante un período de exposición de 2 horas.

Species	<i>p-value</i> (0.05)			
	Gill	Liver	Muscle	Blood
<i>P. humeralis</i>				
LDH	0.06189	9.04E-01	0.5243	0.7005
SOD	5.55E-01	2.11E-01	1.98E-01	0.2616
AKP	-	0.1401	-	0.8481
<i>A. scapularis</i>				
LDH	2.19E-01	0.9084	0.8065	0.04162*
SOD	4.04E-01	9.82E-01	0.0462*	9.83E-01
AKP	-	0.4244	-	0.5103

Anexos

- **Evidencia de envío a la revista**

JFB Acknowledgement JFB-MS-21-0647 Recibidos x



Journal of Fish Biology <em@editorialmanager.com>

jue, 18 nov. 03:38 (hace 10 días)



para mí ▾

Dear Ms Rebeca Montero

Journal of Fish Biology has received your submission and assigned the number JFB-MS-21-0647.

Kind regards,

Renuka Devi
 Editorial Assistant
 Journal of Fish Biology
JFBoffice@wiley.com

Please be aware that if you ask to have your user record removed, we will retain your name in the records concerning manuscripts for which you were an author, reviewer, or editor.

- **Copia de documento de aprobación del comité de ética**

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CON ANIMALES Y BIODIVERSIDAD



Constancia N° 46-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2019

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad de la Universidad Científica del Sur (CIEI-AB-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido **aprobado**.

Código de registro: **006-2018-PRE5**

Título: **Determinación de la respuesta fisiológica y enzimática de juveniles de cabrilla (*Paralabrax humeralis* Valenciennes, 1828) y chita (*Anisotremus scapularis* Tschudi, 1846) a la hipoxia progresiva**

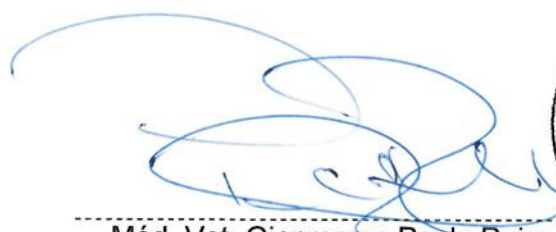
Investigador(a): **Rebeca Montero Taboada**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-AB-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (**hasta el 22 de octubre del 2020**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 23 de abril de 2019




Méd. Vet. Gianmarco Paolo Rojas Moreno

Presidente

Comité Institucional de Ética en Investigación
con Animales y Biodiversidad