



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EFECTO DE LA EXPOSICIÓN
COMBINADA A LA HIPOXIA Y
SULFURO DE HIDRÓGENO SOBRE LA
CAPACIDAD DE RECUPERACIÓN EN
Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819)

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR

ANGELO JESÚS GOMEZ VILCA

LIMA – PERÚ

2025

ASESOR

Dr. Arturo Aguirre Velarde

JURADO DE TESIS

DR. Dimitri Alexey Gutierrez Aguilar

PRESIDENTE

DR. Jorge Larry Tam Malaga

VOCAL

DR. Lander Merma Mora

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mi esposa por ser mi luz y mi apoyo

A mis padres por ser mis ejemplos de amor y sacrificio.

A mi hijo por ser mi mayor alegría y fuente de inspiración

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesor por su guía y acompañamiento.

A la profesora Giovanna Sotil.

A Jhon Dionicio, Fanny Rioual, Maryandrea Rosado y Paul Guarnizo por su
apoyo.

Al grupo de profesionales del laboratorio de Oceanografía química y Fitoplancton
del IMARPE.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis financiada con un aporte de las Becas Milla - Goñi de la Facultad de
Ciencias y Filosofía, JEAIDYSRUP (IRD-IMARPE) y PPR 094 Ordenamiento y
desarrollo de la Acuicultura – IMARPE, y del Laboratorio de Genética Molecular
del IMARPE.

 UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA	UNIDAD DE GOBIERNO Y ADMINISTRACIÓN	NP-108-UPCH
	SISTEMA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	V.02.00 / 27-01-2021
	NORMAS Y PROCEDIMIENTOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LOS GRADOS ACADÉMICOS DE MAESTRÍA Y DOCTORADO	ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO
		Página 25 de 32

*En el caso de doctorados, se deberá indicar cuál es el miembro externo.

Anexo N° 5 - Formato para la Declaración de Autor y Originalidad

FORMATO PARA LA DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	21	noviembre	20 <u>24</u>
APELLIDOS Y NOMBRES DEL ESTUDIANTE	Angelo Jesús Gomez Vilca		
PROGRAMA DE POSGRADO	Maestría en Ciencias del Mar		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	4	abril	20 <u>22</u>
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	Efecto de la exposición combinada a la hipoxia y sulfuro de hidrógeno sobre la capacidad de recuperación en <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819).		
MODALIDAD	Presencial		
Declaración del Autor El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	991465124		
E-mail	angelo.gomez@upch.pe		



Firma del egresado
DNI

77185208

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN..... Página 1

1.1 Antecedentes

- 1.1.1. *Argopecten purpuratus* “concha de abanico”
- 1.1.2. Eventos y registros de hipoxia
- 1.1.3. Respuesta fisiológica de *A. purpuratus* frente a la hipoxia
- 1.1.4. Eventos y registros de hipoxia más sulfuro de hidrógeno (H₂S)
- 1.1.5. Respuesta fisiológica y molecular de bivalvos frente a la hipoxia más H₂S
- 1.1.6. Respuesta molecular (transcriptoma) de *A. purpuratus* frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S
- 1.1.7. Evaluación en la recuperación posterior a la hipoxia e hipoxia más H₂S en bivalvos
- 1.1.8. Evaluación del punto de no retorno (PNR₅₀)
- 1.1.9. Influencia del calentamiento global en la desoxigenación de los océanos

1.2. Planteamiento del problema

1.3. Justificación

1.4. Pregunta de investigación

2. OBJETIVOS..... Página 11

2.1. General

2.2. Específicos

3. HIPÓTESIS..... Página 12

4. MARCO TEÓRICO..... Página 13

4.1. *Argopecten purpuratus*

4.2. Sulfuro de hidrógeno (H₂S)

4.3. Hipoxia

4.4. Punto de no retorno (PNR₅₀)

4.5. Transcriptoma

5. METODOLOGÍA..... Página 20

5.1. Procedimientos y técnicas para la determinación del PNR₅₀

5.1.1 Aclimatación de los organismos

5.1.2. Diseño experimental para la evaluación del PNR₅₀

5.1.3. Fase de exposición

5.1.3.1. Exposición a la hipoxia más sulfuro de hidrógeno
(H₂S)

5.1.3.2. Exposición a la hipoxia

5.1.4. Fase de recuperación

5.1.5. Determinación del PNR₅₀

5.2. Factor de estado energético

5.3. Análisis molecular

5.3.1. Obtención de muestras

5.3.2. Extracción de ARN

5.3.3. Obtención de transcriptomas

5.3.5. Análisis de anotación y enriquecimiento

5.3.6. Expresión diferencial de genes

5.4. Análisis estadístico

5.4.1. PNR₅₀

5.4.2. Factor de estado

6. RESULTADOS..... Página 29

6.1. Supervivencia

6.2. PNR₅₀

6.3. Expresión génica a partir del transcriptoma

6.3.1. Lecturas y transcritos

6.3.2. Anotación funcional

6.3.3. Expresión diferencial

7. DISCUSIONES..... Página 45

7.1. PNR₅₀

7.2. Expresión diferencial de genes

8. CONCLUSIONES..... Página 50

9. RECOMENDACIONES..... Página 51

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... Página 52

11. ANEXO

11.1 Anexo 1

11.2. Anexo 2

11.3. Anexo 3

RESUMEN

Los ambientes marinos de *Argopecten purpuratus* presentan concentraciones limitadas de oxígeno disuelto (hipoxia), generando a su vez, la producción eventual del sulfuro de hidrógeno (H_2S). *Argopecten purpuratus* es tolerante a la hipoxia; sin embargo, la exposición conjunta a la hipoxia y a la liberación de H_2S puede generar un deterioro acumulado en la fisiología de la especie y reducir su capacidad de recuperación hasta un punto de no retorno (PNR_{50}). Por lo tanto, en el presente trabajo se planteó el objetivo de determinar el efecto de la exposición combinada de la hipoxia y el H_2S sobre la capacidad de recuperación y la expresión diferencial de genes a partir del transcriptoma de *A. purpuratus*. Se establecieron dos tratamientos: hipoxia e hipoxia más H_2S . En el diseño experimental, se incluyó una canasta control (normoxia) y diez canastas para la exposición (fase 1), con 15 individuos por tamaño en cada canasta. Todas las canastas se mantuvieron en la fase 1 y luego se transportaron a la fase de recuperación (fase 2) por una semana para ambos tratamientos. Además, se colectaron tejidos de branquias del control, en el día 2 de la fase 1 y al culminar la fase 2 para la evaluación de expresión de genes. El PNR_{50} de *A. purpuratus* frente a la hipoxia más H_2S fue de 2.5 y 2 días de exposición para conchas de 63 mm y 45 mm respectivamente ($p > 0.05$), mientras que frente a la hipoxia el PNR_{50} fue de 3 y 1.5 días de exposición para conchas de 63 y 45 mm ($p < 0.05$). Bajo condiciones de hipoxia, se identificaron genes relacionados a procesos catabólicos, mientras que bajo la hipoxia más el H_2S se encontraron genes asociados a la apoptosis y necrosis. Finalmente se concluyó que la exposición combinada a la hipoxia y al H_2S afecta la capacidad de recuperación de *A. purpuratus* evidenciado en un PNR_{50} menor que frente a la hipoxia.

PALABRAS CLAVE

SUPERVIVENCIA, PUNTO DE NO RETORNO, ECOFISIOLOGÍA,
RECUPERACIÓN, SULFURO DE HIDROGENO, TIEMPO LETAL MEDIO,
EXPRESIÓN GÉNICA

ABSTRACT

The marine environments of *Argopecten purpuratus* present limited concentrations of dissolved oxygen (hypoxia), and this in turn, leads to the eventual production of hydrogen sulfide (H₂S). *Argopecten purpuratus* is tolerant to hypoxia; however, the joint exposure to hypoxia and H₂S can generate a cumulative deterioration in the physiology of the species and the ability to recover, reaching a point of no return (PNR₅₀). Therefore, in the present work we aimed to determine the effect of combined exposure to hypoxia and H₂S on the resilience and differential gene expression from the transcriptome of *A. purpuratus*. Two treatments were established: hypoxia and hypoxia plus H₂S. A control basket (normoxia) and ten baskets were prepared for exposure (phase 1); each basket with 15 for size individuals. All baskets were kept in phase 1 and then transported to the recovery phase (phase 2) for one week for both treatments. In addition, gill tissues were collected from the control, on day 2 of phase 1 and at the culmination of phase 2 for gene expression evaluation. The PNR₅₀ of *A. purpuratus* against hypoxia plus H₂S was 2.5 and 2 days of exposure for large and small individuals respectively ($p > 0.05$), while against hypoxia the PNR₅₀ was 3 and 1.5 days of exposure for large and small individuals ($p < 0.05$). Under hypoxia, genes related to catabolic processes were identified, while under hypoxia plus H₂S, genes associated with apoptosis and necrosis were found. Finally, it was concluded that the combined exposure to hypoxia and H₂S affects the recovery capacity of *A. purpuratus*, as evidenced by a lower PNR₅₀ than in hypoxia.

KEYWORDS

SURVIVAL, EXPOSURE, ECOPHYSIOLOGY, RECOVERY, SULFIDE.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1. *Argopecten purpuratus* “concha de abanico”

Argopecten purpuratus es un molusco bivalvo de interés comercial que se distribuye a lo largo de la costa peruana. Sus principales bancos naturales se ubican en la Bahía de Sechura, Lobos de tierra y la Bahía de Independencia en Pisco (Mendo et al., 2008). Estos ambientes son áreas de asentamiento larval y reclutamiento, usados como fuente de semillas para los cultivos de la especie, principalmente en las zonas de Sechura (Mendo et al., 2016). La venta del músculo y de las gónadas es el producto final de la concha abanico a nivel nacional e internacional, lo que hace a esta especie un recurso demandado e importante para el crecimiento económico del sector artesanal y de los acuicultores (Kluger et al., 2019). Como muestra, se tiene registro de la exportación realizada en los cinco primeros meses del año 2022, con un envío mayor a 50 millones de dólares (PRODUCE, 2022).

1.1.2. Eventos y registros de hipoxia

El sistema de surgencia de Humboldt a lo largo de la costa peruana aporta una gran concentración de nutrientes (Graco et al., 2007) relevantes para la producción primaria, que sustenta el desarrollo de especies como *A. purpuratus*. No obstante, la poca ventilación, el exceso de materia orgánica y las altas tasas de respiración aeróbica (Ulloa et al., 2012) que ocurren en la columna de agua, conlleva el agotamiento de oxígeno (O₂) y producción de la hipoxia.

Aguirre-Velarde et al. (2019b) realizaron registros de alta frecuencia de la saturación de oxígeno (SO) en la bahía de Paracas entre setiembre del 2012 a marzo del 2013 y evidenció que *A. purpuratus* está expuesta continuamente a eventos de hipoxia (<20%), e inclusive en mayor medida para aquellos organismos del fondo en comparación con individuos en suspensión. Además, Aguirre-Velarde et al. (2016) reportaron en la misma área de estudio entre enero y marzo del 2013, una SO promedio de 18% y una variación de 0 a 112% a 20 cm en cultivos de fondo.

Respecto al tiempo de exposición, se ha reportado condiciones de hipoxia severa (~5% saturación de oxígeno) con una duración de 2,4 y 4 días; registrados para la bahía de Sechura y Paracas respectivamente (Cueto-Vega et al., 2022). Por su parte, Igarza et al. (2024) realizaron una evaluación de alta frecuencia del OD al noreste de la bahía de Paracas durante el 2015 al 2016, donde se evidenció un mayor porcentaje en la frecuencia de condiciones de hipoxia letales y severas, con concentraciones de OD menor a 0.5 mg/L con duraciones de hipoxia mayor a 100 horas.

1.1.3 Respuesta fisiológica de *A. purpuratus* frente a la hipoxia

Hasta la actualidad, estudios experimentales sobre la respuesta fisiológica de *A. purpuratus* frente a la hipoxia, demostraron que la exposición a la hipoxia cíclica puede reducir significativamente la tasa de crecimiento y el comportamiento alimenticio (tasa de aclaramiento) en individuos de 30 mm (Aguirre-Velarde et al., 2018), además de la actividad reproductiva, el crecimiento somático y gonadal (Aguirre-Velarde et al., 2019b). Por otro lado, a partir de un modelo bioenergético se ha propuesto una posible explicación de la respuesta de la especie frente a la

hipoxia, donde se considera que el uso de energía se direcciona prioritariamente a procesos de mantenimiento (Aguirre-Velarde et al., 2019a).

1.1.4. Eventos y registros de hipoxia más sulfuro de hidrógeno (H₂S)

El H₂S es un compuesto tóxico que forma parte del ciclo de azufre, el cual se genera a partir de la reducción del sulfato (SO₄²⁻) por la actividad de bacterias reductoras de SO₄²⁻ (Callbeck et al., 2021). La formación de este compuesto ocurre con el descenso de la temperatura y del OD (Solís et al., 2012; Chauca, 2018), además de la disminución de la concentración de nitratos y sulfuros asociados al hierro, el incremento de materia orgánica en el fondo y la atenuación de la velocidad del viento (Flores et al., 2023).

Frente a la costa peruana se han realizado diversos estudios sobre la presencia y cuantificación del H₂S. Los reportes rondan desde el 1977, con el estudio realizado por Dugdale et al. (1977) frente a Pisco, donde se reconoció el olor característico del H₂S en muestras de agua extraídas con botellas Nansen a más de 100 m de profundidad, y el trabajo de Fossing (1990) quien reportó concentraciones de H₂S de hasta 6 mMolar a 150 m. Solís et al. (2012), reportaron frente al Callao concentraciones de 4 µM a 50 m, mientras que Schunck et al. (2013) realizaron una evaluación entre Callao y Pisco a 100 m, reportando una concentración máxima de 6 µM.

La presencia de H₂S en el ecosistema marino frente a la costa peruana se ha relacionado en la superficie con los eventos de plumas de azufre. Schunck et al. (2013) reportaron la presencia de estos eventos frente a la ciudad de Pisco a partir de una imagen satelital (MODIS). Del mismo modo, Ohde (2018) reportó en las

zonas de afloramiento de Pisco y Callao, plumas de agua de coloración lechosa o turquesa. Por otro lado, Chauca (2018), a partir de una evaluación de imágenes satelitales del 2000 al 2016 entre los 13°-15°S y el uso de un algoritmo, evidenció que los eventos de agua blancas (aguas con H₂S) son más frecuentes en el otoño, y que el mes de mayo es el periodo en el cual ocurren más eventos de aguas blancas con un desarrollo espacial superficial de 3 a 4000 km² aproximadamente.

Las aguas blancas, lechosas o también llamadas aguas turquesas se han relacionado con los eventos de hipoxia en áreas de cultivo de la *A. purpuratus*. Aguirre-Velarde et al. (2019b), observaron la decoloración del agua con una tonalidad turquesa lechosa en la bahía de Paracas durante el mes de febrero del 2013 y asoció con registros de SO menor a 20% durante tres días, y la reducción de la supervivencia de organismos ubicados en el fondo. Con ello, se asume que, *A. purpuratus* es una especie que se encuentra eventualmente coexpuesta al H₂S como a la hipoxia. En el año 2024 se comprobó esta hipótesis, con el registro de una concentración de 6,79 µmol/L de H₂S en la columna de agua en la bahía de Paracas, el cual se asoció con una duración de hipoxia de 18 h (Rioual et al., 2025).

1. 1.5. Respuesta fisiológica de *A. purpuratus* frente a la hipoxia más el H₂S

Existen pocos recursos bibliográficos y trabajos en desarrollo sobre los efectos de la hipoxia más el H₂S en la respuesta fisiológica de *A. purpuratus*. No obstante, estudios en otros bivalvos, se describen una serie de efectos negativos que experimentan los organismos. Nagasoe et al. (2011) evidenciaron en la almeja de Manila *Ruditapes philippinarum*, daños en el epitelio ciliar y una menor tasa de aclaramiento a causa de la exposición de altas concentraciones de H₂S. Por su parte Zhang et al. (2024) reportó en *Mercenaria mercenaria* la reducción en la capacidad

alimentaria, respiratoria y de excreción. A nivel celular, el trabajo de Liu et al. (2022), reportó que el H₂S puede afectar el sistema inmunológico a partir de la reducción de la fagocitosis en la sangre. Por otro lado, respecto al efecto letal del H₂S, Vaquer-Sunyer y Duarte (2010) menciona que la exposición de organismos bentónicos al H₂S puede reducir la probabilidad de supervivencia hasta en un 30% más que frente a la hipoxia.

1.1.6. Respuesta molecular (transcriptoma) de *A. purpuratus* frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S

El análisis molecular a nivel genes como es el caso del estudio del transcriptoma, permite conocer el conjunto de mecanismos biológicos o respuestas que realiza una especie en un momento específico a partir del análisis del ARN. Para el caso de *A. purpuratus* se ha evaluado el transcriptoma para el ensamblaje del genoma (Li et al., 2018) y genes relacionados a la respuesta frente al cobre (Zapata et al., 2009), coloración del músculo aductor (Song y Wang, 2019), células germinales (óvulo y espermatozoide) (Hidalgo-Cabrera et al., 2022), disminución del pH y aumento de temperatura (Benítez et al., 2022), resistencia frente a infecciones virales (Jeria et al., 2023) y al envejecimiento (Zhao et al., 2025). Sin embargo, hasta la fecha de este documento no se ha evaluado la expresión de genes de *A. purpuratus* frente a la exposición de la hipoxia e hipoxia más H₂S.

En otras especies de bivalvos, existe una serie de estudios sobre el transcriptoma frente a la hipoxia. En la almeja *Anadara kagoshimensis*, se reportó el gen HIF-1 α como regulador principal en la respuesta frente a la hipoxia y además de otros genes asociados a la respiración anaeróbica (Hatano et al., 2025). Por su parte, en el Mejillón *Mytilus chilensis* se ha identificado genes asociados al ciclo de citrato y

apoptosis, como evidencia de la alteración metabólica e inmunológica de los individuos bajo hipoxia (Montúfar-Romero et al., 2024). Por último, en la ostra *Tegillarca granosa* en esta misma condición se han reportado genes como los GPx que participan en la síntesis de proteínas antioxidantes y otros asociados al uso activo de la glucosa y señalización de calcio (Cheng et al., 2024).

Por otro lado, referente a la exposición de hipoxia más H₂S en *Anadara broughtonii* se ha reportado la expresión de genes asociados al sistema inmunológico, inflamación, reparación del ADN y activación de vías metabólicas (Wang et al., 2019), mientras que en *Tegillarca granosa* se identificaron genes relacionados a la apoptosis y activación de la vía MPAK (señalización celular) (Yang et al., 2023). Esta respuesta de los organismos frente a la hipoxia más H₂S representa el deterioro de la fisiología y la viabilidad de la especie en el ecosistema, lo que conlleva en corto o largo plazo a la muerte del organismo (Cheng et al., 2024). No obstante, en bivalvos adaptados que viven en ambientes ricos en sulfuro como *Gigantidas platifrons* (mejillón) se ha identificado genes encargados de metabolizar el azufre y sulfuros a partir de la síntesis de enzimas como la mercaptopiruvato sulfurtransferasa, quinona oxidorreductasa, tiosulfato sulfurtransferasa y persulfuro dioxigenasa (Sun et al., 2022).

La solubilidad del H₂S en los lípidos permite que este compuesto traspase las membranas biológicas y pueda actuar como un agente tóxico a nivel molecular (Riesch et al., 2015). Con capacidad de unirse al anillo de porfirina de la mioglobina y hemoglobina, y formar a la sulfahemoglobina y a la sulfamioglobina (estados de oxidación irreversible), compuestos que no son funcionales para el transporte de O₂ (Bagarinao, 1992). El H₂S se relaciona al bloqueo de la actividad de la proteína

transmembranal citocromo c oxidasa, lo que afecta el proceso de transporte de electrones y la producción de ATP (Cooper & Brown, 2008). Esto genera impactos metabólicos a razón de los cambios de las funciones enzimáticas, producción de metabolitos y cofactores, además de la alteración de la permeabilidad de membrana y el desarrollo de radicales libres (Bagarinao, 1992).

1.1.7. Evaluación en la recuperación posterior a la hipoxia e hipoxia más H₂S en bivalvos

Posterior a una exposición de condición estresante, como la hipoxia o el H₂S, los organismos pueden desarrollar secuelas temporales o permanentes. En *Anadara bringonii*, se ha evidenciado que en la reoxigenación se produce el daño oxidativo y se atenúa más aún en organismos expuestos previamente al H₂S, además se reportó que, en la reoxigenación se incrementó la producción de peróxidos (Wang et al., 2021). También se ha reportado en *Crassostrea virginica* durante la reoxigenación, daños a nivel del ADN con un número mayor de sitios apurínicos (pérdida de bases) (Kurochkin et al., 2009). Estos pocos reportes son solo una muestra de la condición que experimentan los organismos posteriores a la exposición y la evidencia de daños prevalentes durante la recuperación (reoxigenación).

1.1.8. Evaluación del punto de no retorno (PNR₅₀)

La evaluación de la tolerancia en *A. purpuratus* frente a una condición letal se ha desarrollado comúnmente con el uso del Tiempo letal medio (TL₅₀). Cueto-Vega et al. (2022) determinaron que el TL₅₀ frente a la hipoxia es de $3,9 \pm 0,25$ días para individuos de 33 mm de longitud y $2,7 \pm 0,35$ días para individuos de 80 mm de

longitud. Respecto al H_2S , no existe información disponible sobre la tolerancia de la especie; no obstante, se consideraron evaluaciones en curso sobre la temática para la elección de las concentraciones del H_2S para el presente trabajo.

Evaluar la capacidad de recuperación de los organismos posterior a la exposición y comprobar la probabilidad de la supervivencia que señala el TL_{50} no ha sido desarrollado hasta el momento. Considerar los posibles daños irreparables o letales que pueden generarse durante la exposición a la hipoxia y el H_2S en bivalvos podría ser relevante para diseñar medidas de mitigación a estresores. Esta capacidad de recuperación puede aproximarse mediante el concepto del PNR_{50} . En los inicios del uso del concepto del PNR_{50} se realizaron trabajos de evaluación sobre la inanición. Blaxter y Hempel (1963) definieron al PNR_{50} como la pérdida de la capacidad de recuperación de una especie posterior a la inanición a pesar de tener alimento. Este indicador se ha utilizado en peces, como el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* y el cangrejo braquiuros, con el objetivo de determinar el tiempo en donde el 50% de las larvas hambrientas no tengan la probabilidad de sobrevivir al agregar el alimento (PNR_{50}) (Anger et al., 1981; Dou et al., 2005). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el PNR_{50} con factores ambientales como el O_2 y el H_2S .

1.1.9. Influencia del calentamiento global en la desoxigenación de los océanos

El cambio climático y la pérdida de la calidad del agua generan cambios considerables sobre las propiedades fisicoquímicas de los cuerpos de agua marina a nivel global. Los océanos más cálidos son más propensos a perder el O_2 , además al ser menos densos tienen mayor facilidad de estratificarse y reducir la ventilación en la columna de agua (Limburg et al., 2020). Tal como se mencionó en secciones anteriores, este escenario es propicio para el desarrollo de eventos más frecuentes

de hipoxia y mayor exposición al H_2S . Si bien esta problemática del calentamiento se evalúa a nivel global, en zonas locales muy costeras, como bahías, el efecto del calentamiento del mar puede magnificar y esto, aún más, si se agrega el impacto que genera la carga orgánica que producen los cultivos de moluscos como la de *A. purpuratus* (Bakit et al., 2022).

1.2. Planteamiento del problema

A. purpuratus es una especie de interés comercial de la macrofauna bentónica del litoral peruano que se encuentra eventualmente expuesta a la hipoxia (Cueto-Vega et al., 2022) y aguas lechosas o turquesas que se asocian a la presencia de H₂S (Aguirre-Velarde et al., 2019b). El desarrollo de las condiciones sulfurosas sucede episódicamente, sin embargo se espera que estos eventos sean más frecuentes, debido a la desoxigenación (Espinoza-Morriberón et al., 2021), calentamiento global y eutrofización del ecosistema marino (Schunck et al., 2013; Naumov et al., 2023). *A. purpuratus* es tolerante bajo concentraciones mínimas de oxígeno; no obstante, eventos prolongados de hipoxia pueden afectar negativamente la condición del organismo y su capacidad de recuperación hasta un punto de no retorno. Una exposición conjunta de hipoxia más H₂S puede ser aún más crítico y desarrollar un efecto magnificado. Esto resulta contraproducente para las poblaciones de *A. purpuratus* de bancos naturales y zonas de cultivo y en consecuencia, a los productores del recurso, debido a la disminución del stock, comercio e ingresos económicos.

Por otro lado, respecto a la respuesta transcriptómica, hasta la actualidad se desconoce la expresión de genes frente a la exposición y recuperación a la hipoxia e hipoxia más H₂S de la especie. Esto evidencia un vacío de información y el estado del estudio de genes potenciales como marcadores moleculares.

1.3. Justificación

Los eventos de hipoxia e hipoxia más H_2S son una amenaza creciente para los ecosistemas marinos costeros, especialmente en zonas de afloramiento y productividad primaria donde se desarrolla la especie *A. purpuratus*. Comprender la capacidad de recuperación y expresión de genes a partir del PNR₅₀ y el transcriptoma respectivamente en este bivalvo de interés comercial (Mendo et al., 2008; Kluger et al., 2019) es fundamental para predecir potenciales tiempos de rescate para la hipoxia e hipoxia más H_2S . La presente investigación se da en el marco de la ecofisiología y la biología molecular de *A. purpuratus* cuyos resultados brindan una herramienta teórica para el sector acuícola y el manejo sostenible los ecosistemas costeros.

1.4. Pregunta de investigación

En este contexto, la pregunta científica de esta investigación es ¿Cuál es el efecto de la exposición a la hipoxia e hipoxia más sulfuro de hidrógeno sobre la supervivencia, capacidad de recuperación y la expresión de genes en dos tamaños de *A. purpuratus* (Lamarck, 1819)?

2. OBJETIVOS

2.1. General

Determinar el efecto de la exposición de la hipoxia e hipoxia más sulfuro de hidrógeno sobre la supervivencia, capacidad de recuperación y la expresión de genes en dos tamaños de *A. purpuratus*.

2.2. Específicos

- Evaluar la supervivencia a diferentes tiempos de exposición y en la recuperación de dos tamaños de *A. purpuratus* en condiciones de hipoxia e hipoxia más sulfuro de hidrógeno.
- Determinar el PNR₅₀ de dos tamaños de *A. purpuratus* frente a la hipoxia e hipoxia más sulfuro de hidrógeno.
- Evaluar y comparar la expresión de genes de un solo tamaño de *A. purpuratus* bajo normoxia, hipoxia, hipoxia más sulfuro de hidrógeno y en el proceso de la recuperación posterior a la exposición de la hipoxia e hipoxia más sulfuro de hidrógeno.

3. HIPÓTESIS

- Se plantea la hipótesis de que la supervivencia disminuirá en el proceso de recuperación y que a un mayor tiempo de exposición a la hipoxia e hipoxia más H₂S el organismo presentará una menor capacidad de recuperación o hasta un PNR₅₀.
- Se espera que el PNR₅₀ sea menor bajo la hipoxia más H₂S que solo a la hipoxia.
- Por último, la expresión de genes será temporalmente diferencial, en la fase de exposición se expresarán genes relacionados a mecanismos de adaptación o muerte celular frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S, mientras que en la fase de recuperación los organismos expresarán genes asociados al estrés o reparación celular.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 *Argopecten purpuratus*

La clasificación taxonómica de la especie es:

- Filo: Molusco.
- Clase: Bivalve.
- Orden: Pectínido.
- Género: *Argopecten*.
- Especie: *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819).

Esta especie de bivalvo es llamada también “concha de abanico”, un recurso de interés comercial y ecológico que se encuentra en las costas del Pacífico de Perú y Chile (Wolff y Mendo, 2000). Su rol ecológico conlleva a remover partículas en suspensión, control de las poblaciones de microalgas y ser una fuente de alimento para otras especies de depredadores. Su importancia comercial se debe a que es un recurso pesquero con un alto valor en el mercado nacional e internacional y por su industria acuícola (Mendo et al., 2016).

La concha de abanico habita en la zona submareal en un rango de profundidad y temperatura de 3 a 30 m y de 12 a 22 °C respectivamente, con una distribución entre 5° y 40°S, concentrada en zonas de alta productividad primaria como las zonas de afloramiento (Wolff, 1988; Brand, 2006).

Esta especie presenta un manto que secreta la concha, dos valvas convexas con crestas radiales, un cuerpo blando y un pie muscular (músculo aductor) bien desarrollado que le permite desplazarse y escapar de sus depredadores (Mendo et al., 2016).

La alimentación de la concha de abanico se basa en la filtración, básicamente de microalgas y partículas en suspensión (Navarro et al., 2000), lo que permite el aclaramiento de agua y reciclaje de nutrientes. Su actividad alimentaria puede verse afectada por el cambio de las variables ambientales como la temperatura y la concentración del alimento (Riascos et al., 2009 ; Mendo et al., 2016).

Este bivalvo es una especie hermafrodita, es decir cuenta con dos sexos. Presenta una reproducción externa y la liberación de sus células germinales son estimuladas por los cambios de las condiciones ambientales como las mareas y la temperatura (Loor y Sonnenholzner, 2014). Su ciclo de vida inicia en la columna de agua con una fase de vida planctónica para luego pasar al fondo marino a través de una metamorfosis a la fase bentónica donde se desarrolla como juvenil (10 mm) y logra su madurez sexual (15-30 mm).

4.2 Sulfuro de hidrógeno (H₂S)

El ciclo del azufre es un proceso biogeoquímico importante que ocurre activamente en las zonas de mínimas de oxígeno (ZMO). Como parte de este ciclo, se produce el H₂S a partir de la reducción del sulfato SO₄⁻² en ausencia o concentraciones muy bajas de OD (Callbeck et al., 2021). El H₂S es un compuesto tóxico e inestable que puede ser oxidado con el nitrato a partir de bacterias reductoras de nitrato (NO₃⁻), y producir azufre elemental (Schunck et al., 2013; Dale et al., 2019). El ascenso del S⁰ por medio del afloramiento hacen posible el acoplamiento bentopelágico y la extensión de las plumas de sulfuro o manchas blancas (Figura 1) desde la costa al mar abierto (Ohde, 2018; Ohde et al., 2007).

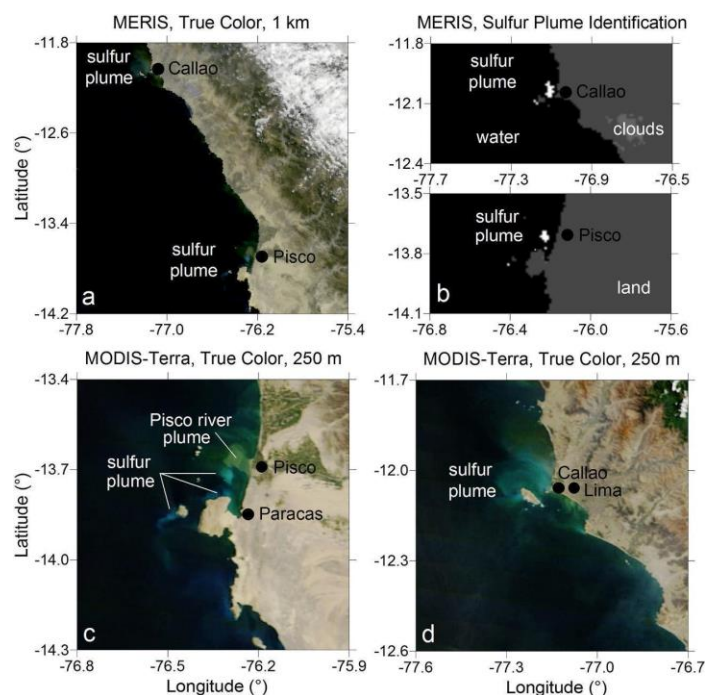


Figura 1. Plumas de azufre identificados a partir de imágenes satelitales en la costa de Pisco y Callao (Tomado de Ohde, 2018).

La presencia del H_2S ambiental generalmente es producida por la degradación bacteriana de la materia orgánica en condiciones anóxicas, en ambientes con depósitos de petróleo, actividad geotérmica (Riesch et al., 2015), depósito continuo del carbono orgánico en el fondo marino, biomasa microbiana y el aumento del consumo de O_2 heterótrofo (Rabalais et al., 2014). Por otro lado, el incremento de la temperatura generada por el cambio climático y la eutrofización producen ambientes pobres en O_2 y condiciones más frecuentes para la presencia del H_2S (Grote et al., 2012). A una temperatura y presión ambiental, el H_2S es un compuesto gaseoso incoloro con un aroma olor a huevos podridos, es tóxico, inflamable, soluble en agua y lipofílico (Li & Lancaster, 2013).

4.3. Hipoxia

El O_2 disuelto en el ecosistema marino es un compuesto demandado por la respiración (metabolismo heterótrofo), degradación de la materia orgánica, los procesos de re-oxidación (metano y sulfuro) y la quimioautotrofia (oxidación del amonio) que ocurren en la columna de agua (Zhang et al., 2010) (Figura 2). La disminución de este compuesto por debajo de la capacidad de tolerancia y desarrollo de la asfixia en los organismos es conocido como la hipoxia (Diaz, 2001). Esta condición ocurre a una concentración de $O_2 < 1.4\text{ml/L}$, $< 60\mu\text{m/L}$, $< 2\text{mg/L}$ o $< 30\%$ (Ekau et al., 2010). Cabe precisar que este valor no está generalizado, debido a que la hipoxia puede empezar en otras especies a concentraciones mayores a la señalada (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2010).

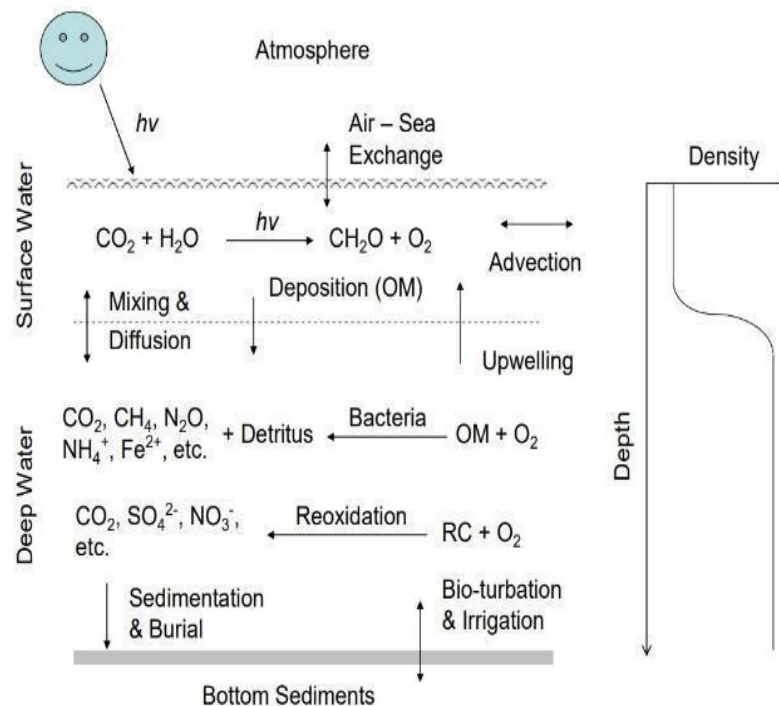


Figura 2. Procesos de producción y consumo de oxígeno en la columna de agua. (Tomado de Zhang et al., 2010).

4.4. Punto de no retorno (PNR₅₀)

El PNR₅₀ es usado comúnmente para la evaluación del efecto de la inanición (prohibición de alimento) sobre la supervivencia (Paschke et al., 2004). Bajo esta temática se entiende por PNR₅₀, como el tiempo en donde el 50% de individuos en inanición no logran recuperarse a pesar de otorgarle el alimento posterior al periodo de inanición (Anger et al., 1981). La aplicación de este indicador también es usado generalmente en estudios con estadios larvarios, y no sólo se evalúa la supervivencia larval si no también el punto o el umbral en donde las larvas (e.g. equinodermos) no son capaces de asentarse a pesar de proporcionar alimento (Steinberg, 2018). El concepto del PNR₅₀ podría aplicarse también para el estudio de otras condiciones letales como la hipoxia y H₂S (Figura 5). Tal como se ha descrito anteriormente estos factores pueden generar daños considerables a los organismos durante los eventos de exposición; sin embargo, aún se desconoce qué sucede posteriormente con la supervivencia y la capacidad de recuperación.

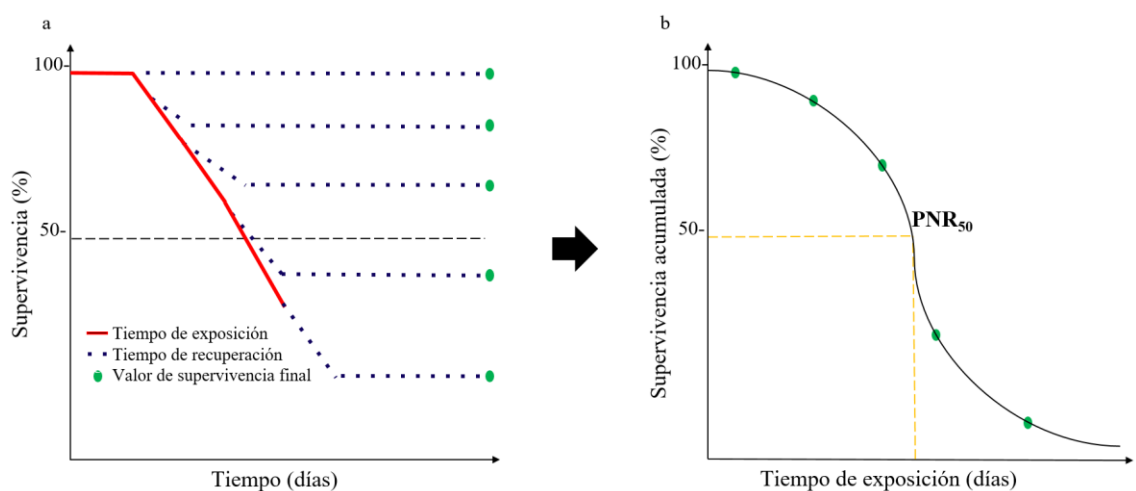


Figura 5. Representación esquemática de la estimación del punto de no retorno (PNR₅₀). (a) La línea roja continua representa el tiempo de exposición y la línea discontinua azul el tiempo de recuperación. Los puntos verdes redondos indican los valores finales de la supervivencia al término de la recuperación. (b) Estos datos son usados para la elaboración de la curva de supervivencia acumulada o final y estimar el PNR₅₀ representado por la línea amarilla (Elaboración propia).

4.6. Transcriptoma

Mide la totalidad de transcripciones de ARN generadas en un tiempo o célula específica para determinar genes funcionales, procesos biológicos y características celulares de una especie (Wang y Huo, 2022). Las moléculas de ARN que incluye la muestra para el análisis del transcriptoma son el ARN mensajero, ARN ribosómico, ARN de transferencia y ARN no codificante (Heux et al., 2015), no obstante para la secuenciación se realiza la técnica ARN-seq, la cual toma en cuenta solo el ARN mensajero para la formación del AND complementario (Tebani y Bekri, 2020). En estudios experimentales, la evaluación del transcriptoma por tratamientos permite comparar que grupos de genes se activan o se reprimen en ciertas condiciones y cuantificar la expresión diferencial (Chavan-Guatam et al., 2017).

5. METODOLOGÍA

5.1 Procedimientos y técnicas para la determinación del PNR₅₀

5.1.1 Aclimatación de los organismos

Se transportaron 1200 conchas de *A. purpuratus* (600 de 63 ± 0.91 mm y 600 de 45 ± 1.92 mm) provenientes de la playa el dorado (Chimbote) hacia el Laboratorio de Ecofisiología Acuática del Instituto del mar del Perú-IMARPE (La Punta-Callao). Posteriormente, los organismos se aclimataron en un sistema de acondicionamiento (Figura 6) que disponía de alimento y aireación permanente (96.61 ± 1.40 % de saturación de O₂) a una temperatura de 16.42 ± 0.11 °C y un pH de 7.7 ± 0.06 .

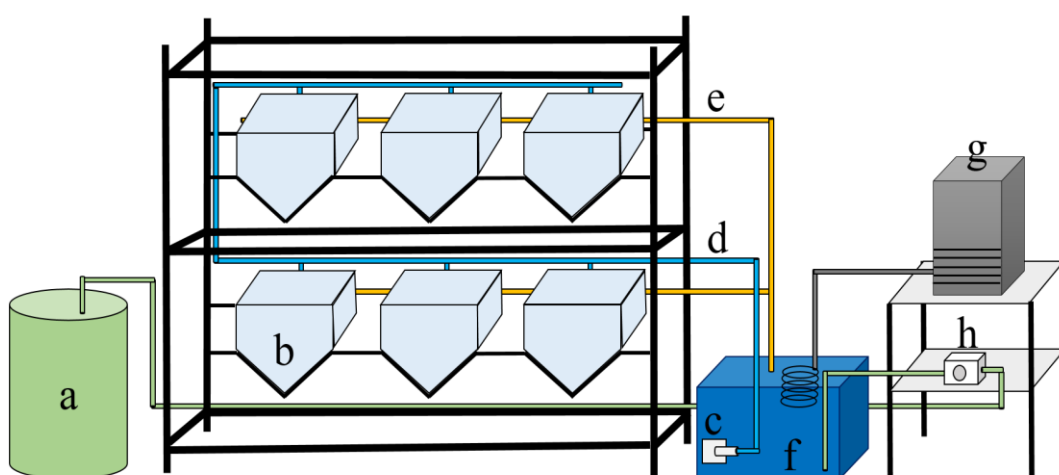


Figura 6. Esquema del sistema de aclimatación. (a) Cilindro verde con la microalga *Isochrysis galbana* y *chaetoceros calcitrans* las cuales eran transportadas (conducto verde) al sistema de recirculación a través de una (h) bomba peristáltica. (g) El enfriador (chiller) estuvo configurado para que mantenga la temperatura del sistema a 16°C. (d) El conducto celeste representa el envío de agua hacia los (b) tanques

por acción de la (c) bomba de agua sumergible y el (e) conducto amarillo representa el retorno del agua hacia (f) tanque azul (tanque de depósito).

5.1.2. Diseño experimental para la evaluación del PNR₅₀

Se prepararon 10 canastas de malla plástica en la cual se distribuyeron 15 conchas de 45mm y 15 conchas de 63 mm en cada una. Cada canasta representó un tiempo de exposición (días) (0.5 d, 1 d, 1.5 d, 2 d, 2.5 d, 3 d, 3.5 d, 4 d, 4.5 d, 5 d) (Figura 7). Los organismos (cada canasta) se mantuvieron en condiciones combinadas de hipoxia más H₂S según su tiempo de exposición (E) y luego fueron transportados a una fase de recuperación. Esto mismo proceso se desarrolló para la exposición a la hipoxia. La fase de recuperación culminó cuando ya no se registraron mortalidades.

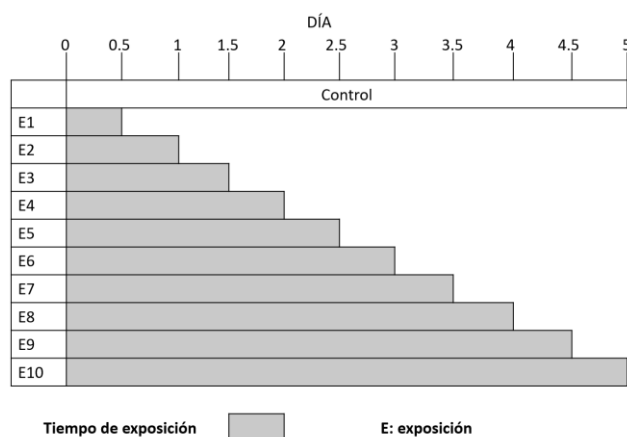


Figura 7. Esquema de los tiempos de exposición de *Argopecten purpuratus*.

5.1.3. Fase de exposición.

5.1.3.1. Exposición a la hipoxia más H₂S

Se utilizó un tanque cuadrangular (tanque de exposición) con un volumen de agua de mar de 320 L con 10 unidades experimentales (n=15 por tamaño) y un envase

adicional de 60 L (tanque matriz) para la dilución del H_2S al tanque de exposición. Se colocaron tres sensores de O_2 y un sensor de pH en el tanque de exposición, además de un sensor de O_2 en el tanque matriz conectados a un multiparámetro de la marca WTW. Luego, se inyectó N_2 gaseoso en ambos tanques para mantener la condición de hipoxia ($\text{OD} = 2.5\%$). Posteriormente, se agregó 5 y 1.5 g de sulfuro de sodio monohidratado al 98% - S2006-500G (An et al., 2020) en el tanque matriz y en el tanque de exposición respectivamente. Para más especificaciones revisar el protocolo de la preparación y recambio del H_2S (Anexo 1). El periodo de exposición al H_2S inició con el encendido de la bomba peristáltica programada a 49 RPM (revoluciones por minuto), encargada de mantener el flujo continuo de H_2S del tanque matriz al tanque de exposición por dos días (Figura 5). Posterior a este periodo el flujo de agua solo fue de agua de mar hipóxica hasta el día cuatro. Para más especificaciones revisar el protocolo de la medición del H_2S (Anexo 1).

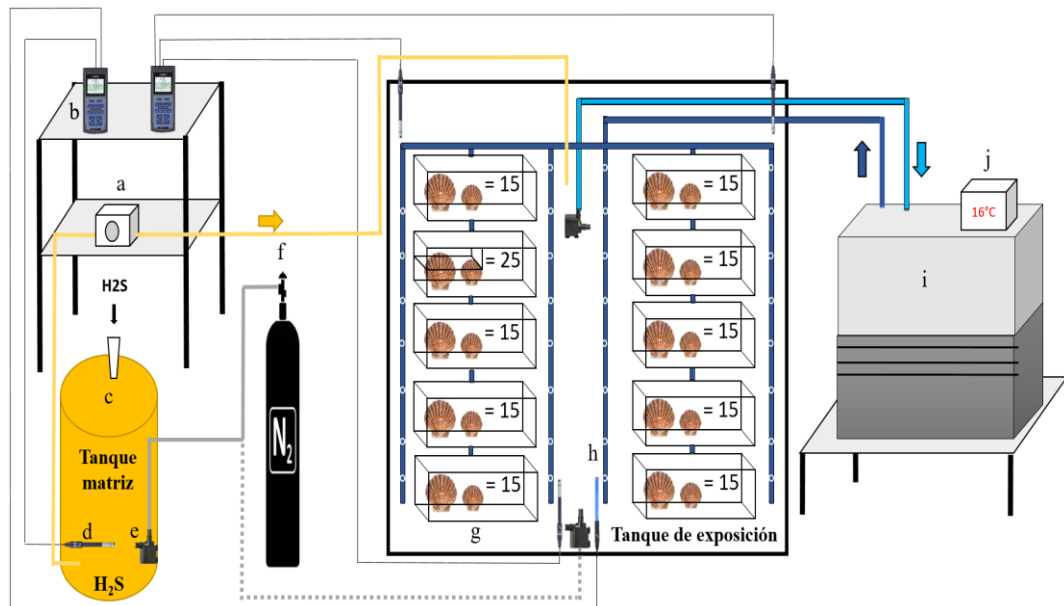


Figura 5. Diagrama del sistema de exposición al H_2S . (a) Bomba peristáltica, (b) multiparámetro WTW, (c) tanque matriz, (d) sensor de oxígeno, (e) bomba de agua,

(f) tanque de nitrógeno, (g) , canastas de malla plástica, (h) sensor de pH, (i) chiller y (j) controlador de temperatura del chiller. El agua de mar es enviada por el conducto celeste y retorna por la vía azul al tanque de exposición. La línea amarilla representa el transporte del agua de mar con H_2S hacia el tanque de exposición. La línea gris continua y discontinua representa el flujo del gas N_2 hacia el tanque matriz y al tanque de exposición respectivamente.

5.1.3.2. Exposición a la hipoxia

Una vez culminado el experimento de la exposición combinada de la hipoxia más el H_2S se realizó la exposición única de la hipoxia. Se lavó el tanque de exposición, se acondicionó a 16 °C y se redujo la saturación de oxígeno con el mismo método utilizado en la exposición anterior. Asimismo, se utilizó el mismo número de organismos por tamaño. Para mantener la hipoxia se utilizó una computadora Raspberry con un software que registraba y regulaba la concentración de la saturación de O_2 a partir de la información registrada por los sensores WTW. El programa se configuró para la apertura automática de las llaves peristálticas que transportaban N_2 al tanque de exposición en caso la saturación de O_2 sea mayor a 2% (Figura 6).

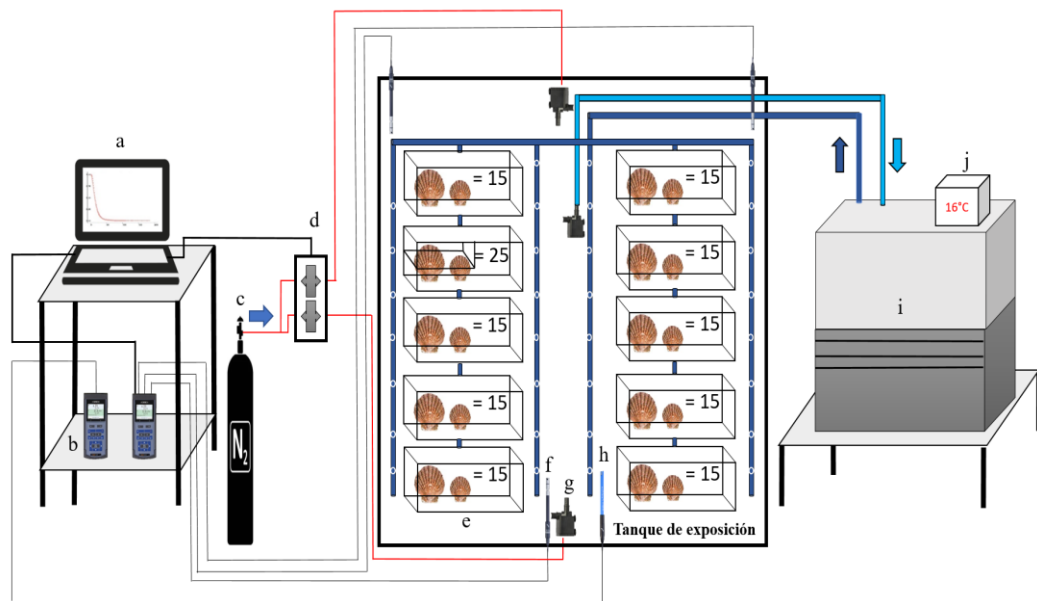


Figura 6. Diagrama del sistema de exposición a la hipoxia. (a) Computadora Raspberry, (b) multiparámetro WTW, (c) tanque de N₂, (d) válvulas solenoide, (e) canastas de malla plástica, (f) sensor de oxígeno, (g) bomba de agua, (h) sensor de pH, (i) chiller (enfriador) y (j) controlador de temperatura del chiller. El conducto celeste representa el transporte del agua de mar hacia el chiller mientras que el conducto azul representa el retorno hacia el tanque de exposición. La línea roja representa el flujo de N₂ hacia el tanque de exposición.

5.1.4. Fase de recuperación

Para ambas condiciones de exposición y tamaño, los organismos fueron retirados en sus canastas según su tiempo de exposición. Luego se trasladaron al sistema de aclimatación para su recuperación. En esta fase se registró la supervivencia cada doce horas. La muerte se confirmó cuando el organismo no juntaba las valvas ante las pulsaciones que se realizaban con una bagueta sobre las conchas. A cada organismo muerto, se realizó la medición de la altura valvar, disección y registro

del peso de la gónada y el soma. Estas muestras fueron rotuladas y almacenadas en una congeladora para posteriores análisis.

5.1.5. Determinación del PNR₅₀

En la presente investigación, se definió el concepto de PNR₅₀ como el tiempo de exposición límite frente a la hipoxia y al H₂S, donde posteriormente los organismos pierden la capacidad de recuperarse a pesar de encontrarse en un medio con normoxia (Yan et al., 2009). El PNR₅₀ se determinó con los datos de la supervivencia final registrada en la fase de recuperación de cada tiempo de exposición para hipoxia e hipoxia más H₂S según el tamaño (Paschke et al 2004)

5.2. Determinación del factor de estado energético (FEE)

Se diseccionó y se pesó el soma y las gónadas de todos los organismos evaluados para cada condición (control (normoxia), hipoxia e hipoxia más H₂S). Se ubicaron por separado las gónadas y el soma en un papel aluminio y se secaron en una estufa a 60°C por 72h. Luego, se pesó el tejido seco en una balanza analítica y registraron los pesos para el cálculo del factor de estado a partir de la siguiente fórmula.

$$FEE = \left(\frac{\text{peso seco de la gónada}}{\text{peso seco del soma}} \right) * 100$$

5.3. Análisis estadístico:

5.3.1. PNR₅₀

Se utilizó el modelo no paramétrico de Kaplan Meier del paquete estadístico survival para la elaboración de la curva de supervivencia (Therneau, 2023) y la

prueba de chi-cuadrado para la evaluación de las diferencias significativas entre los PNR₅₀ con el programa R-studio (R Core Team, 2020).

5.3.2. Factor de estado energético

Se analizó la distribución normal con la prueba de Shapiro-Wilks y las diferencias de medias de los grupos de datos de factor de estado energético por tamaño para el control (normoxia), la hipoxia e hipoxia más el H₂S con la prueba de Mann Whitney en el R-studio (R Core Team, 2020).

5.4. Procedimientos y técnicas para el análisis molecular

5.4.1. Obtención de fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen). Para evaluar el nivel de integridad del ARN, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE (1X). La visualización del ARN se realizó con GelRed en un transiluminador UV-VIS.

5.4.4. Preparación de muestras para secuenciación y procesamiento de lecturas

De las cinco muestras procesadas por tratamiento se seleccionaron 3 de cada una (control, exposición a la hipoxia, exposición al H₂S, recuperación a la hipoxia y recuperación al H₂S), con el mayor índice de calidad y cantidad del ARN. Un total de 15 muestras, fueron construídas las librerías TruSeq Stranded mRNA y secuenciadas en la plataforma NovaSeq 6000 150PE (2x150bp) de Illumina, considerando aproximadamente 20M de reads, en Macrogen (Korea).

A partir de los transcriptomas secuenciados, el primer paso consistió en evaluar la calidad de las lecturas con el software FastQC (Andrews, 2010). Las lecturas de

baja calidad se eliminaron y se filtraron las secuencias de adaptadores de las librerías, con el programa Trimmomatic v0.40 (Bolger et al., 2014).

5.4.5. Análisis de anotación y enriquecimiento y expresión diferencial

Se generó un ensamble *de novo* con Trinity (Grabherr et al., 2011), el cual fue optimizado con la eliminación de las redundancias a partir del programa cd-hit. El mapeo de lecturas se realizó con Kallisto v0.44.0, se cuantificaron los transcritos y se identificaron los genes expresados diferencialmente. Los valores de fold-change positivos y negativos fueron considerados como sobre y sub expresión. La anotación y el enriqueciendo se realizó en el programa OmicsBox 3.3 (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), y se evaluaron Blast, GO Mapping, GO annotation, Combined Pathway Analysis.

Finalmente, se elaboraron los mapas de calor para determinar los grupos de genes encendidos y apagados entre el control (normoxia) y la hipoxia, la hipoxia más el H₂S, así como entre recuperaciones de la hipoxia e hipoxia más H₂S a partir de la función heatmap del paquete dplyr (Wickham et al., 2023) en el programa R-studio (R Core Team, 2020).

6. RESULTADOS

6.1. Supervivencia

Durante la fase de exposición a la hipoxia más el H_2S las conchas de 63 y 45 mm mostraron una supervivencia menor al 50% a partir del día 3 de exposición, mientras que frente a la hipoxia en conchas de 63 mm y 45 mm fue a partir de los 3.5 y 2.5 días de exposición respectivamente.

Al culminar la fase de recuperación para los organismos expuestos previamente a la hipoxia más el H_2S se observó una supervivencia del 100 % en conchas de 63 y 45 mm derivados de 0.5 y 1 día de exposición, mientras que en la hipoxia solo se evidenció esta condición para los organismos de 63 mm que estuvieron expuestos a 0.5 y 1.5 días.

Frente a la hipoxia más H_2S al terminar la fase de recuperación la supervivencia fue menor al 50% para conchas de 63 mm a partir de 2.5 días y de 45 mm fue a los 2 días de exposición, mientras que para los individuos expuestos previamente a la hipoxia la supervivencia fue menor a un 50% para conchas de 63 y 45 mm a partir del día 3 y 1.5 respectivamente (Figura 7).

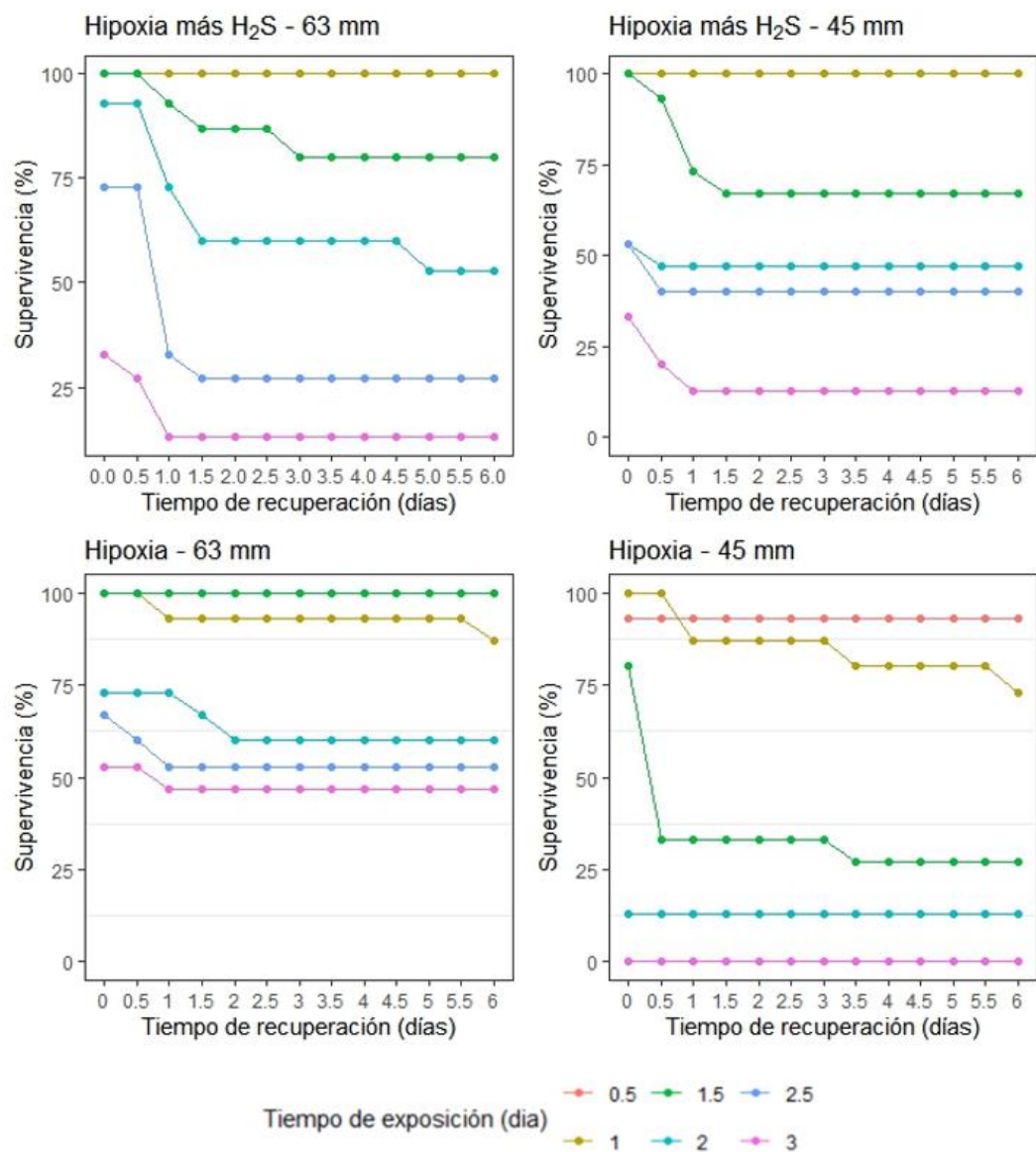


Figura 7. Supervivencia de *A. purpuratus* en función al tiempo de recuperación para cada tiempo de exposición frente a la hipoxia e hipoxia más sulfuro según tamaño.

6.2. PNR₅₀

Se determinó que el PNR₅₀ de *A. purpuratus* frente a la hipoxia más H₂S fue 2.5 y 2 días de exposición para conchas 63 y 45 mm, respectivamente ($p > 0.05$) (Figura 8), mientras que frente a la hipoxia el PNR₅₀ fue de 3 y 1.5 días de exposición para conchas de 63 y 45 mm ($p < 0.05$) (Figura 9). Los PNR₅₀ de las curvas de supervivencia para las conchas de 63 mm frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S, no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 10). Caso contrario se observó para las conchas de 45 mm, donde los PNR₅₀ si presentaron diferencias -- significativas ($p < 0.05$) (Figura 11).

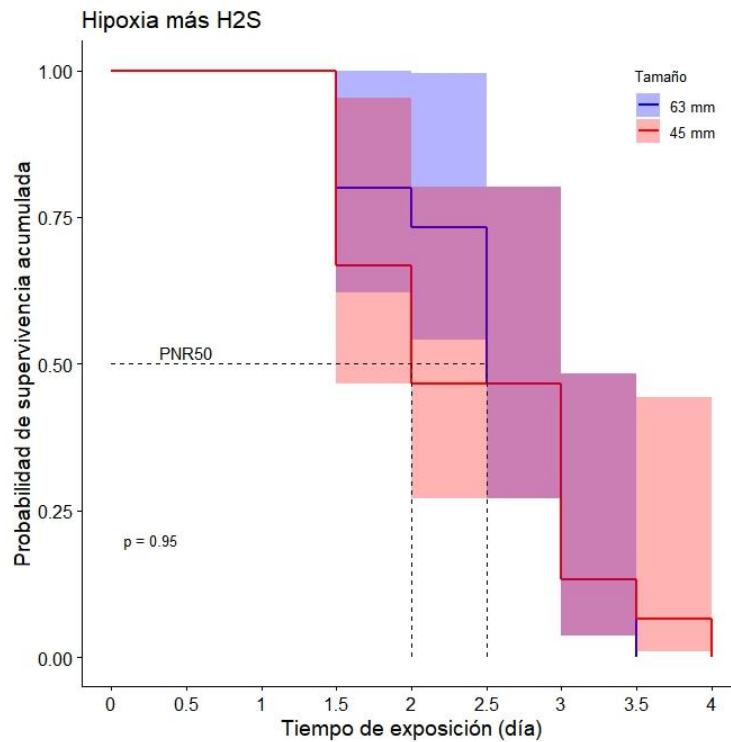


Figura 8. Curva de supervivencia de Kaplan Meier para dos tamaños de *A. purpuratus* frente a la exposición a la hipoxia más el H₂S.

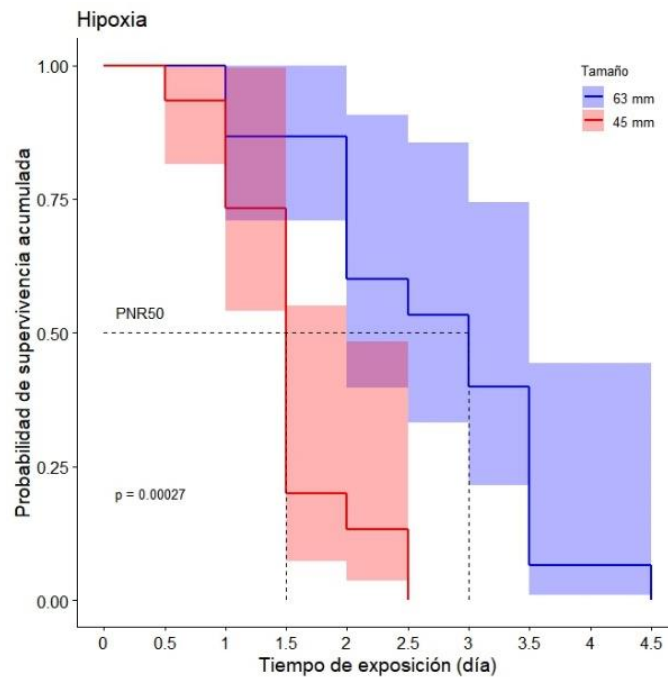


Figura 9. Curva de supervivencia de Kaplan Meier para dos tamaños de *A. purpuratus* frente a la exposición a la hipoxia.

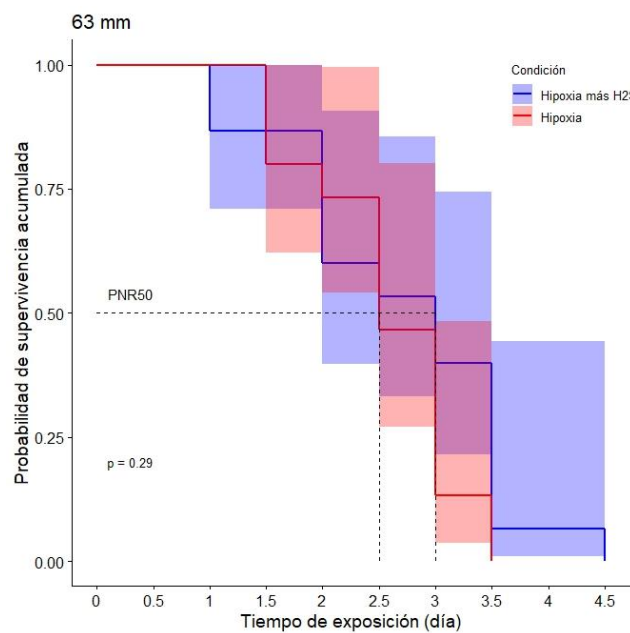


Figura 10. Curva de supervivencia de Kaplan Meier para organismos de 63 mm de *A. purpuratus* frente a la exposición a la hipoxia e hipoxia más H₂S.

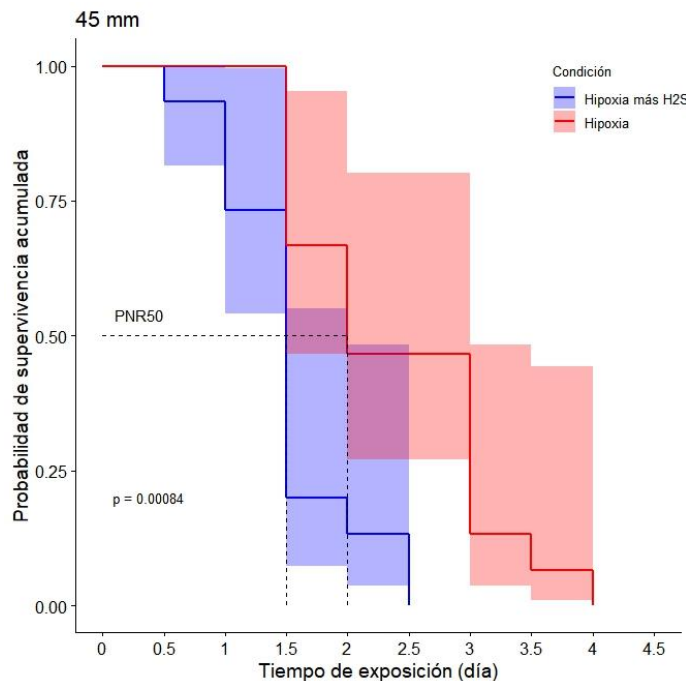


Figura 11. Curva de supervivencia de Kaplan Meier para organismos de 45 mm de *A. purpuratus* frente a la exposición a la hipoxia e hipoxia más H₂S.

6.3. Expresión génica a partir de transcriptoma

6.3.1. Lecturas y transcritos

Como resultado del análisis de la expresión de genes del transcriptoma de *A. purpuratus* se obtuvo un número total de reads (lecturas) de 497, del mismo modo se determinó este valor para los reads limpios (lecturas finales). Respecto al número de contigs (transcritos) este fue de 300624 y los contigs optimizados (cluster) fueron un total de 186264.

6.3.2. Anotación funcional

El número de términos GO fue mayor en comparación a los términos KEGG en la exposición y recuperación a la hipoxia. Se observaron dos categorías para la

exposición a la hipoxia con un mayor porcentaje de secuencias y número de términos GO para la categoría de función molecular, mientras que en la recuperación a la hipoxia las tres categorías (función molecular, componente celular y procesos biológicos) presentaron altos porcentajes de secuencias pero un mayor número de términos GO relacionados a funciones moleculares (Figura 12). Frente a la exposición de la hipoxia más el H₂S se observó de la misma manera un mayor número de términos GO en comparación a los KEGG pero no más que lo observado en la exposición y recuperación a la hipoxia. En esta oportunidad solo se encontraron las categorías para la exposición a la hipoxia más el H₂S y no en la recuperación (Figura 13).

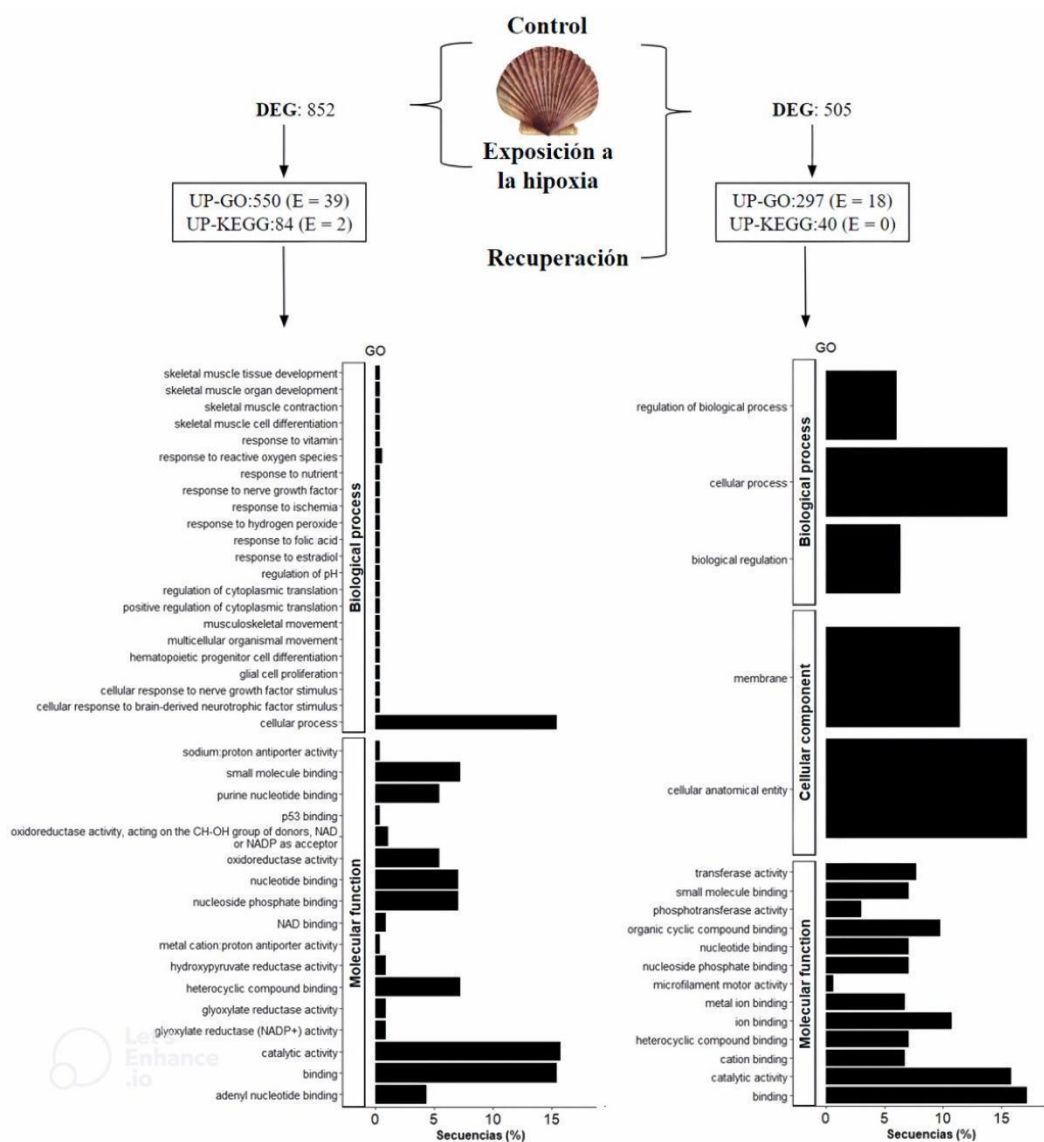


Figura 12. Número de genes con expresión diferencial (DEG), términos totales y enriquecidos (E) de GO y KEGG subestimados (UP-GO y UP-KEGG), entre la exposición a la hipoxia y el control, así mismo entre la recuperación a la hipoxia y el control.

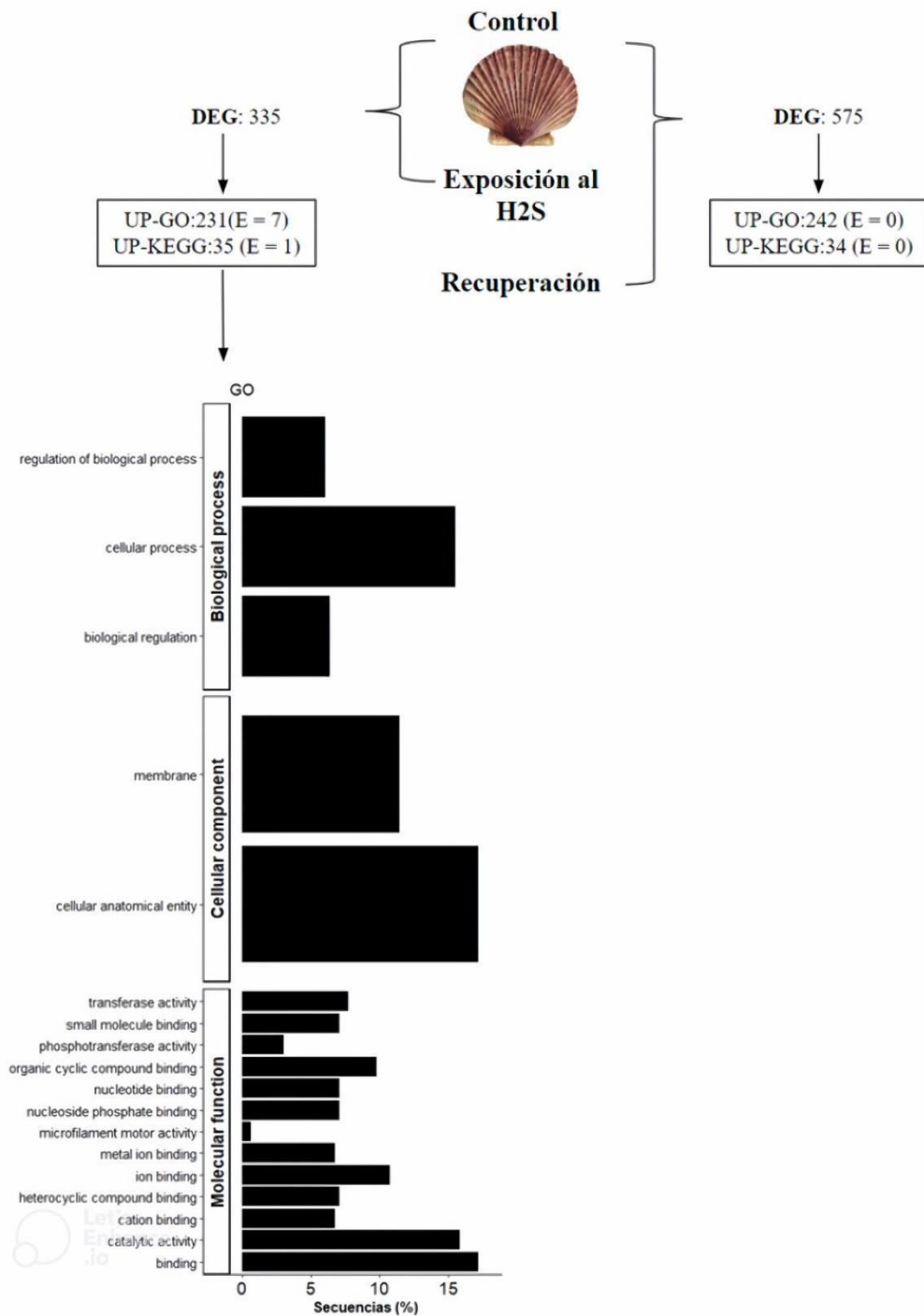


Figura 13. Número de genes con expresión diferencial (DEG), términos totales y enriquecidos (E) de GO y KEGG subestimados (UP-GO y UP-KEGG), entre la exposición al H₂S y el control, así mismo entre la recuperación al H₂S y el control.

6.3.3. Expresión diferencial

Se encontró un mayor número de genes con expresión diferencial comunes entre el grupo de organismos de la exposición y de la recuperación, tanto para la hipoxia (n = 416) como en la hipoxia más el H₂S (n=131). Además, se observó que los individuos de la exposición (n=318) y recuperación (n=823) de la hipoxia, presentaron un mayor número de genes con expresión diferencial con respecto al grupo de la exposición (n=157) y la recuperación (n=307) de la hipoxia más el H₂S. Por otro lado, el enriquecimiento de categorías GO fue mayor en la exposición a la hipoxia (n=34) y solo 5 de estas categorías fueron comunes para la exposición a la hipoxia más el H₂S (Figura 14).

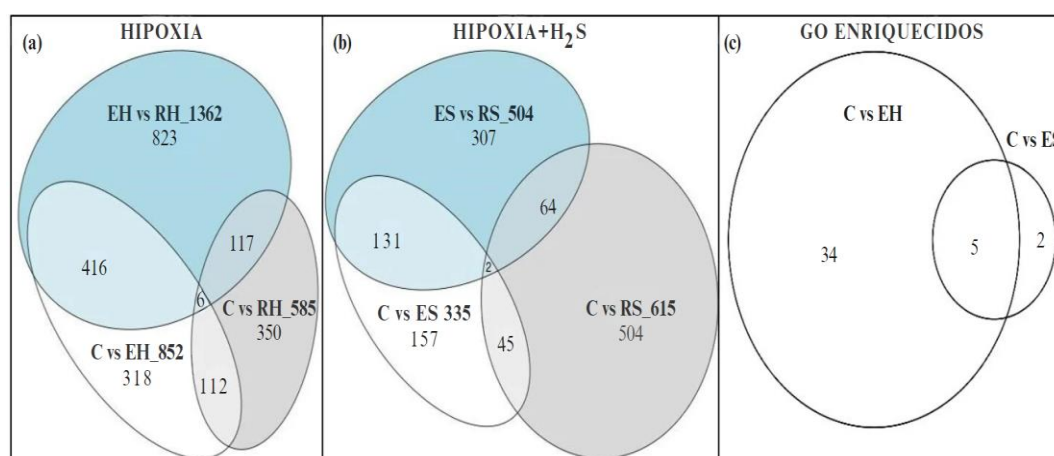


Figura 14. (a) Diagrama de Venn sobre el número de genes con expresión diferencial totales (en negrita), comunes y únicos entre el control y la exposición a la hipoxia (C vs EH), entre la exposición y la recuperación a la hipoxia (EH vs RH)

y entre el control y la recuperación a la hipoxia (C vs RH). (b) Número de genes con expresión diferencial totales (en negrita), comunes y únicos entre el control y la exposición a la hipoxia más el H₂S (C vs ES), entre la exposición y la recuperación a la hipoxia más el H₂S (ES vs RS) y entre el control y la recuperación a la hipoxia más el H₂S (C vs RS). (c) Número de términos ontológicos GO enriquecidos únicos entre la exposición a la hipoxia y el control (C vs EH), entre la hipoxia más el H₂S y el control (C vs ES) y los términos GO que comparten ambos grupos.

En los mapas de calor se observó para cada comparación (control vs hipoxia, control vs hipoxia más H₂S, control vs recuperación a la hipoxia y el control vs recuperación a la hipoxia más H₂S) dos grupos (clados) de genes encendidos y apagados según la condición (Anexo 3, figura 1 al 4). De este grupo de genes encendidos con expresión diferencial para la exposición a la hipoxia se identificó una lista de genes asociados al metabolismo del piruvato, metabolismo del glucógeno, metabolismo de pirimidina, actividad de la hidrolasa, fosforilasa, monooxigenasa, oxidoreductasa y quinasa (Figura 15). En la exposición a la hipoxia más el H₂S la lista de genes se centró en su mayoría a procesos de regulación a la apoptosis y necrosis (Figura 16). En la recuperación a la hipoxia se encontraron genes de respuesta al estrés como la Hsp70 y en la recuperación al H₂S genes de reparación celular (Figura 17 y 18).

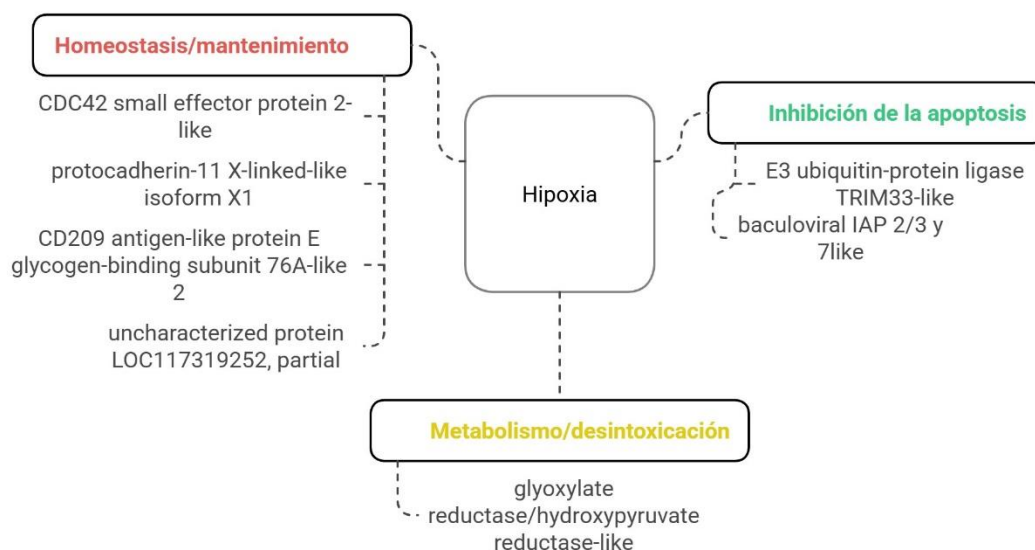


Figura 15. Genes con expresión diferencial por cada función de *A. purpuratus* de 63 mm frente a la hipoxia. Los procesos biológicos de color rojo contienen genes con mayor expresión, amarillo mediamente y verde en menor medida.

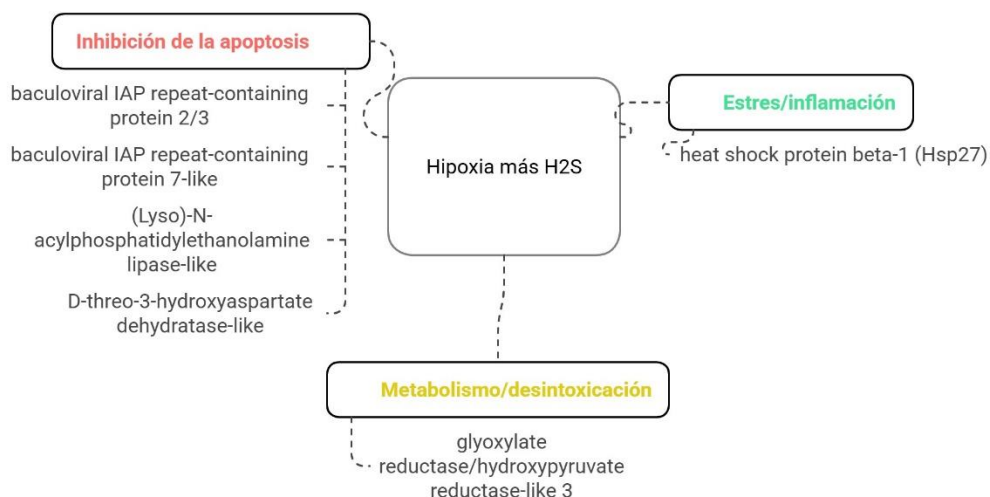


Figura 16. Genes con expresión diferencial por cada función de *A. purpuratus* de 63 mm frente a la hipoxia más H₂S. . Los procesos biológicos de color rojo contienen genes con mayor expresión, amarillo mediamente y verde en menor medida.

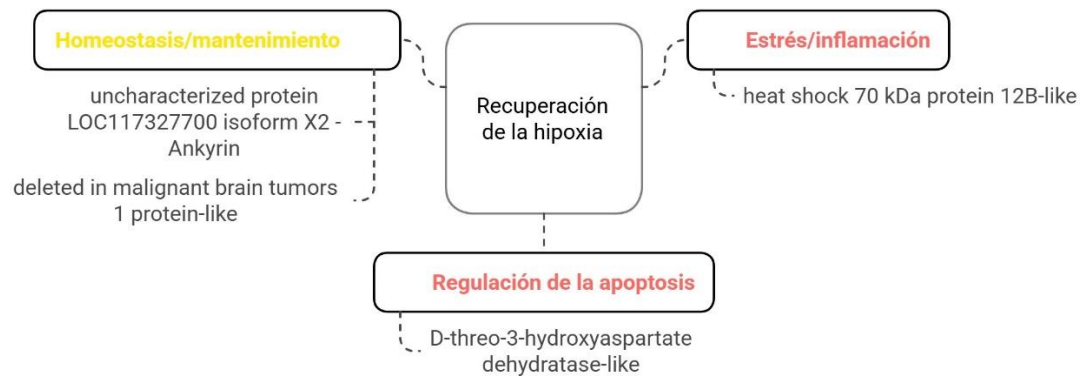


Figura 17. Genes con expresión diferencial por cada función de *A. purpuratus* de 63 mm posterior a la exposición de la hipoxia. Los procesos biológicos de color rojo contienen genes con mayor expresión y amarillo mediamente.

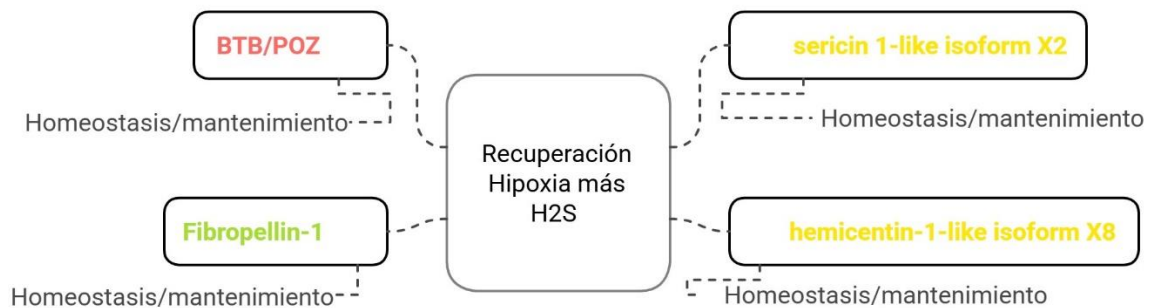


Figura 18. Genes con expresión diferencial por cada función de *A. purpuratus* de 63 mm posterior a la exposición de la hipoxia más H₂S. Los procesos biológicos de color rojo contienen genes con mayor expresión, amarillo mediamente y verde en menor medida.

A partir del análisis de grupos de genes se determinaron funciones comunes y únicas para la exposición y recuperación. En la exposición a la hipoxia se observó que los organismos buscan el equilibrio para hacer frente a la ausencia de oxígeno, con el uso de energía a partir del metabolismo e inhibición de la muerte celular. Al terminar la exposición y pasar a la fase de recuperación los organismos presentaron aún estos dos últimos procesos, pero con un estrés permanente. En la exposición a la hipoxia más H₂S los organismos mostraron una actividad metabólica activa, regulación de la apoptosis y una experimentación de estrés por efecto del proceso de inflamación frente a esta condición. Por su parte durante la fase de recuperación predominó la homeostasis proceso encargado de la posible desintoxicación que desarrollaron los individuos (Figura 19).

Hipoxia	• CDC42 small effector protein 2-like • Protocadherin-11 X-linked-like isoform X1 • CD209 antigen-like protein E glycogen-binding subunit 76A-like 2	• Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase-like	• E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33-like • Baculoviral IAP 2/3 y 7like	• Uncharacterized protein LOC117327700 isoform X2 -Ankyrin • Deleted in malignant brain tumors 1 protein-like	• D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase-like	• Heat shock 70 kDa protein 12B-like
Hipoxia + H2S	• Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase-like 3	• Baculoviral IAP repeat-containing protein 2/3 • Baculoviral IAP repeat-containing protein 7-like • (Lyso)-N-acylphosphatidylethanolamine lipase-like • D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase-like	• Heat shock protein beta-1 (Hsp27)	• BTB/POZ • Fibropellin-1 • Sericin 1-like isoform X2 • Hemicentin-1-like isoform X8		
Exposición				Recuperación		

Homeostasis/mantenimiento

Metabolismo

Inhibición de la apoptosis

Estrés/inflamación

Figura 19. Esquema sobre el grupo de funciones determinadas según la composición de genes para la exposición a la hipoxia, hipoxia más H₂S y en la recuperación de *A. purpuratus* de 63 mm.

7. DISCUSIÓN

7. 1. PNR₅₀

La supervivencia determinada de *A. purpuratus* durante la exposición combinada de la hipoxia más el H₂S es una evidencia novedosa y aproximada sobre la tolerancia de la especie; no obstante, existen investigaciones en curso que buscan determinar la tolerancia media, a partir del cálculo del TL₅₀. Respecto al efecto único de la hipoxia en los organismos de 63 mm es cercano al valor del LT₅₀ (2.7 días) reportado para la especie (Cueto-Vega et al., 2022). Sin embargo para el caso de los organismos de 45 mm se observó un efecto contrario. Los organismos de 63 mm durante la exposición presentaron mayor capacidad para hacer frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S a diferencia de los de 45 mm, lo cual se contradice con lo reportado por Cueto-Vega et al (2022) y Vaquer-Sunyer y Duarte (2010). Una explicación frente a este resultado podría basarse en el estado o condición que presentaron los individuos de 45 mm, debido a que el factor de estado energético de este grupo de individuos de fue menor a la de los de 63 mm ($p < 0.05$).

La evaluación de una fase de recuperación posterior a la exposición de la hipoxia e hipoxia más H₂S permitió observar cómo la supervivencia continuó reduciéndose a pesar de que los organismos se encontraban en condición de normoxia y con alimento. Este resultado es relevante, debido a que demuestra como el organismo pierde la capacidad de recuperarse según el tiempo de exposición previo que experimenta. Los resultados demuestran que en un menor tiempo de exposición en comparación con lo que señala el LT₅₀, se pueden alcanzar valores de supervivencia por debajo del 50% tanto para la hipoxia como en la hipoxia más sulfuro. Esto indicaría que no sólo se debería determinar la tolerancia media de una población a

partir de la evaluación de la supervivencia durante la exposición, sino que, se debe tener en cuenta el monitoreo y viabilidad de la especie en el ecosistema durante la recuperación. Los reportes señalan que la exposición a la hipoxia más el H₂S pueden reducir la tasa de respiración, la tasa de excreción y posibles daños a nivel del epitelio ciliar en las estructuras branquiales (Nagasoe et al., 2011, Zhang et al., 2024). Es posible que estos efectos puedan haber ocurrido e influido desfavorablemente en la actividad alimenticia y en la obtención de energía de *A. purpuratus* (63 mm) durante la fase de recuperación, lo que explicaría la pérdida de la capacidad de recuperación y en consecuencia el incremento de la probabilidad de muerte.

El presente trabajo es el primer reporte que se utiliza el concepto del PNR₅₀, como un indicador sobre el límite de la capacidad de recuperación de un organismo, en función a un tiempo de exposición frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S. No obstante este indicador se ha aplicado en estudios sobre la tolerancia a la inanición y la evaluación en la capacidad de recuperación en fase larval en moluscos posterior a la privación del alimento. En larvas del gasterópodo *Babilonia habei* el PNR₅₀ frente a la inanición es de 2 días (Zheng et al., 2005), sin embargo el PNR₅₀ varía ampliamente en bivalvos y puede extenderse inclusive a más de dos semanas sin alimento y no llegar a su PNR₅₀ (Moran y Manahan, 2004).

Al inicio de la investigación se presumió que existía un tiempo de exposición para la hipoxia e hipoxia más H₂S, en el cual, la mitad de los organismos perdían la capacidad de recuperarse posterior a la exposición. A partir de la evaluación de la supervivencia durante la fase de recuperación se logró evidenciar este supuesto, con registros de supervivencias menores al 50 % tal como se mencionó anteriormente.

Además, se comprobó sólo en organismos de 63 mm, que la capacidad de recuperación se vio más comprometida cuando los organismos se encontraron en condiciones combinadas de hipoxia más H₂S que sólo a la hipoxia.

Este indicador de supervivencia propone una nueva manera de comprender la posible respuesta de *A. purpuratus* en el medio natural frente a eventos de hipoxia y H₂S. Su aplicación traería consigo un mejor entendimiento del efecto separado y conjunto de la hipoxia y el H₂S sobre las poblaciones de cultivo de la especie. Por otro lado, dicha información es una herramienta potencial para la elaboración de futuros métodos de rescate de cultivos de *A. purpuratus*. Se espera que el uso de los PNR₅₀ determinados sean aplicados como límites de tiempos de exposición frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S, con el objetivo de evitar pérdidas económicas. No obstante, mediciones de las concentraciones de hipoxia y H₂S de alta frecuencia y en tiempo real son fortalezas que pueden aún optimizar el manejo del recurso frente a estas condiciones.

7.2. Expresión génica

El análisis transcriptómico reveló un mayor número de genes con expresión diferencial, y categorías enriquecidas en la exposición a la hipoxia que a la hipoxia más el H₂S. Esto quizás está asociado a que pocas rutas relacionadas al sulfuro han sido estudiadas. Los resultados mostraron que *A. purpuratus* activa procesos biológicos y moleculares para hacer frente a la hipoxia. El gen CDC42SE2-like (CDK small effector protein 2-like) y el gen GRHPR-like (glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase-like) identificados en la exposición a la hipoxia están relacionados a procesos de regulación de la transducción de señales de la proteína Rho, unión de GTPasa (citoesqueleto) y metabolismo del piruvato.

Lacal (1997) menciona que la GTPasa regula la proliferación celular y la apoptosis, lo cual concuerda con otras funciones de genes encontrados en los resultados, como es el caso del gen BIRC7-like (baculoviral IAP repeat-containing protein 7-like) y baculoviral IAP repeat-containing protein 2/3 y 7/8. Carroll y Well (1995) señalan que el metabolismo del piruvato en bivalvos se basa en la conversión del piruvato a lactato a través de la piruvato sintasa. Este proceso está relacionado con la función del gen glycogen-binding subunit 76A-like descrito en el presente trabajo, por la relación en la unión al glucógeno y la proteína fosfatasa que son esenciales para la obtención de glucosa y piruvato a partir del glucógeno. Esto podría explicar cómo *A. purpuratus* tolera la condición de hipoxia y activa estas herramientas moleculares para mantener la supervivencia, así mismo como este influye sobre el PNR₅₀.

Durante la fase de recuperación a la hipoxia, la expresión diferencial señala un conjunto de genes asociados a procesos de reparación, plegamiento de proteínas y la actividad de la Hsp 70. El reporte de esta chaperona en el proceso de recuperación es comparable con lo obtenido por Giannetto et al., (2017), quien reportó este tipo de chaperona en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* con una expresión de once veces mayor en comparación al control. Esta tendencia puede deberse a la respuesta de la chaperona frente al estrés producto de la una acumulación de especies reactivas de oxígeno ocurridas en la reoxigenación (Kregel 2002). La presencia de Hsp70 en la fase de recuperación, demuestra que los organismos siguen presentando signos de estrés o daños permanentes por la exposición previa a la hipoxia y que pueda seguir viéndose comprometida la capacidad de recuperación de la especie. Esta interpretación permite comprender, no solo la respuesta

molecular que experimenta la especie durante la recuperación, sino también para no considerar únicamente la ausencia de muertes para culminar la fase de recuperación.

Por otro lado, los genes con expresión diferencial identificados en la exposición a la hipoxia más el H₂S demuestran que *A. purpuratus* intensifica la activación de la vía de señalización de VEGF y MAPK, responsables de la apoptosis, necrosis o inflamación, además de proteínas encargadas de la prevención de la apoptosis. Cabe mencionar que durante la exposición a la hipoxia e hipoxia más el H₂S está presente el gen del tipo BIRC encargado de la prevención de la apoptosis y necrosis, no obstante, este gen está sobre expresado en mayor medida frente a la exposición en condiciones combinadas de hipoxia más H₂S que solo en la hipoxia. El efecto de necrosis e inflamación identificado frente a ambos estresores puede confirmarse a partir de la observación de ampollas y tejido inflamado que se encontraron en los organismos muertos. La sobre expresión del gen BIRC ha sido reportada también en otros bivalvos frente al H₂S, como es el caso de *Anadara broughtonii* y *Tegillarca granosa* (Wang et al., 2019; Yang et al., 2023). Por otro lado, Lin et al., (2019) reportaron que las vías de señalización de MAPK se pueden activar como respuesta al alto nivel de producción de ROS en el interior de la célula provocando la apoptosis y el efecto letal sobre el individuo.

En la recuperación posterior a la exposición a hipoxia más el H₂S el gen que codifica a la proteína BTB/POZ domain-containing protein 2-like fue el que presentó mayor expresión. Esta proteína presenta un dominio relacionado a la apoptosis, el crecimiento celular, la migración y diferenciación celular (Liu et al., 2011). Del mismo modo que se observó en la recuperación posterior a la hipoxia,

A. purpuratus aunque no presentó mortalidades posterior a los 7 días de recuperación, a nivel molecular los organismos presentan rezagos de la exposición, que pueden afectar comprometer aún más la supervivencia en un largo periodo.

8. CONCLUSIONES

Se cumplió la hipótesis respecto a que la supervivencia de *Argopecten purpuratus* frente a la hipoxia e hipoxia más H₂S, disminuye durante y después de la exposición a estos estresores, tanto en organismos de 63 mm como de 45 mm.

Respecto a la capacidad de recuperación, se cumplió la hipótesis de que el PNR₅₀ fue menor frente a la exposición a la hipoxia más H₂S que solo a la hipoxia. Esto sólo se cumplió en organismos de 63 mm aunque no se utilizaron replicas por cada tiempo de exposición. Respecto a los organismos de 45 mm no se logró comparar y evidenciar el efecto de ambas condiciones debido a que el factor de condición energética fue muy bajo, es decir los organismos presentaron un masa gonádica (energía disponible) menor en función al soma.

Se identificó que solamente en organismos de 63 mm expuestos a la hipoxia se expresó un grupo de genes relacionados principalmente a la homeostasis y al metabolismo, y en menor medida a la inhibición de la apoptosis, mientras que frente a la exposición combinada de la hipoxia y el H₂S se expresaron genes asociados principalmente a la regulación de la apoptosis, necrosis y el metabolismo, y en menor grado al estrés. Finalmente, en la fase de recuperación posterior a la hipoxia los organismos expresaron diferencialmente genes de estrés, mientras que en la fase de recuperación posterior a la hipoxia más H₂S se identificaron solo genes encargados de la homeostasis.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuros estudios considerar parámetros fisiológicos como la tasa de aclaramiento o filtración, tasa de excreción y tasa de respiración como variables que expliquen la recuperación de los organismos. Además, se recomienda desarrollar análisis complementarios de histología de los tejidos gonadales y el hepatopáncreas que permitan corroborar los daños físicos observados durante la exposición a la hipoxia más el H₂S

En el presente estudio se recomienda desarrollar un sistema de monitoreo en tiempo real de las concentraciones de oxígeno disuelto y monitoreo diario del H₂S y a partir de los PNR₅₀ calculados elaborar un sistema de método de rescate de cultivos e identificación de áreas no adecuadas para la producción de *A. purpuratus*.

Respecto a la parte molecular se recomienda evaluar en futuros trabajos desarrollar estudios moleculares sobre la validación de los genes identificados para mejorar la comprensión de la respuesta del transcriptoma de la especie y proponer indicadores moleculares que permitan identificar el estado de los organismos durante y después de una exposición frente a la hipoxia e hipoxia más el H₂S.

Por otro lado se recomienda conocer el PNR₅₀ en diferentes tamaños o etapas de vida de *A. purpuratus* y comparar la capacidad de recuperación y respuesta del transcriptoma. Por último, es de suma importancia tener en cuenta la condición del

organismo para este tipo de estudios experimentales con el objetivo de evidenciar el efecto único del factor de exposición.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre-Velarde, A., Jean, F., Thouzeau, G., y Flye-Sainte-Marie, J. (2016). Effects of progressive hypoxia on oxygen uptake in juveniles of the Peruvian scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 451, 385-389. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.030>

Aguirre-Velarde, A., Jean, F., Thouzeau, G., y Flye-Sainte-Marie, J. (2018). Feeding behaviour and growth of the Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) under daily cyclic hypoxia conditions. *Journal of Sea Research*, 131, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.11.001>

Aguirre-Velarde, A., Pecquerie, L., Jean, F., Thouzeau, G., y Flye-Sainte-Marie, J. (2019a). Predicting the energy budget of the scallop *Argopecten purpuratus* in an oxygen-limiting environment. *Journal of Sea Research*, 143, 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2018.09.011>

Aguirre-Velarde, A., Thouzeau, G., Jean, F., Mendo, J., Cueto-Vega, R., Kawazo-Delgado, M., Vásquez-Spencer, J., Herrera-Sanchez, D., Vega-Espinoza, A., y Flye-Sainte-Marie, J. (2019b). Chronic and severe hypoxic conditions in Paracas Bay, Pisco, Peru: Consequences on scallop growth, reproduction,

and survival. *Aquaculture*, 512, 734259.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734259>

An, B., Zhang, H., Peng, J., Zhu, W., Wei, N., y Zhang, Y. (2020). A highly sensitive ratiometric fluorescent probe for imaging endogenous hydrogen sulfide in cells. *New Journal of Chemistry*, 44(46), 20253-20258.
<https://doi.org/10.1039/D0NJ04786D>

Andrews, S. (2010). FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data.

Anger, K., Dawirs, R. R., Anger, V., y Costlow, J. D. (1981). Effects of early starvation periods on zoeal development of brachyuran crabs. *The Biological Bulletin*, 161(2), 199-212. <https://doi.org/10.2307/1540799>

Bagarinao, T. (1992). Sulfide as an environmental factor and toxicant: Tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 24(1), 21-62.
[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90015-F](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90015-F)

Bakit, J., Álvarez, G., Díaz, P. A., Uribe, E., Sfeir, R., Villasante, S., y Castillo-Venenciano, J. (2022). Disentangling environmental, economic, and technological factors driving scallop (*Argopecten purpuratus*) aquaculture in Chile. *Fishes*, 7(6), 380. <https://doi.org/10.3390/fishes7060380>

Benítez, S., Figueroa, Á., Lagos, N, A., Silva, A, X., Duarte, C., Vargas, C, A., Lardies, M, A., Cardenas, L. (2022). La variabilidad del pH y la temperatura conduce a la expresión génica diferencial y la regulación de las vías metabólicas en la vieira *Argopecten purpuratus* cultivada bajo influencias de surgencia. Disponible en SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4210583>

- Blaxter, J. H., y Hempel, G. (1963). The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 28(2), 211-240.
- Bolger, A. M., Lohse, M., y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Brand, A. R. (2006). Chapter 12 Scallop ecology: Distributions and behaviour. In *Developments in aquaculture and fisheries science* (pp. 651–744). [https://doi.org/10.1016/s0167-9309\(06\)80039-6](https://doi.org/10.1016/s0167-9309(06)80039-6)
- Callbeck, C. M., Canfield, D. E., Kuypers, M. M. M., Yilmaz, P., Lavik, G., Thamdrup, B., Schubert, C. J., y Bristow, L. A. (2021). Sulfur cycling in oceanic oxygen minimum zones. *Limnology and Oceanography*, 66(6), 2360-2392. <https://doi.org/10.1002/lno.11759>
- Carroll, J, L., y Wells, R, M,G. (1995) Strategies of anaerobiosis in New Zealand infaunal bivalves: Adaptations to environmental and functional hypoxia, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 29(2), 137-146. <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.1995.9516649>
- Chauca,V, Z. (2018). *Caracterización de los eventos de aguas blancas frente a Pisco y Chincha (entre los 13-15 S)* [Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. Repositorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/3751>

- Chavan-Gautam, P., Shah, T., Joshi, K., Patwardhan, B., y Chaguturu, R. (2017). Transcriptomics and Epigenomics. Innovative Approaches in Drug Discovery: Ethnopharmacology, Systems Biology and Holistic Targeting. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801814-9.00008-8>
- Cheng, H., Peng, Z., Zhao, C., Jin, H., Bao, Y., y Liu, M. (2024). The transcriptomic and biochemical responses of blood clams (*Tegillarca granosa*) to prolonged intermittent hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 270, 110923.
- Cooper, C. E., y Brown, G. C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: Chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 533-539. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9166-6>
- Cueto-Vega, R., Flye-Sainte-Marie, J., Aguirre-Velarde, A., Jean, F., Gil-Kodaka, P., y Thouzeau, G. (2022). Size-based survival of cultured *Argopecten purpuratus* (L, 1819) under severe hypoxia. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(1), 151-173. <https://doi.org/10.1111/jwas.12777>
- Dale, A. W., Bourbonnais, A., Altabet, M., Wallmann, K., y Sommer, S. (2019). Isotopic fingerprints of benthic nitrogen cycling in the Peruvian oxygen minimum zone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 245, 406-425. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.10.025>

- Diaz, R. J. (2001). Overview of Hypoxia around the World. *Journal of Environmental Quality*, 30(2), 275-281.
<https://doi.org/10.2134/jeq2001.302275x>
- Dou, S. Z., Masuda, R., Tanaka, M., y Tsukamoto, K. (2005). Effects of temperature and delayed initial feeding on the survival and growth of Japanese flounder larvae. *Journal of Fish Biology*, 66(2), 362-377.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00601.x>
- Dugdale, R. C., Goering, J. J., Barber, R. T., Smith, R. L., y Packard, T. T. (1977). Denitrification and hydrogen sulfide in the Peru upwelling region during 1976. *Deep Sea Research*, 24(6), 601-608.
- Ekau, W., Auel, H., Pörtner, H.-O., & Gilbert, D. (2010). Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeosciences*, 7(5), 1669-1699.
<https://doi.org/10.5194/bg-7-1669-2010>
- Espinoza-Morriberón, D., Echevin, V., Gutiérrez, D. et al. (2021). Evidences and drivers of ocean deoxygenation off Peru over recent past decades. *Sci Rep* 11, 20292.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99876-8>
- Flores, E., Mendoza, U., Callbeck, C. M., Díaz, R., Aguirre-Velarde, A., Böttcher, M. E., y Graco, M. (2023). Attenuation of wind intensities exacerbates anoxic conditions leading to sulfur plume development off the coast of Peru. *Plos one*, 18(8), e0287914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287914>
- Fossing, H. (1990). Sulfate reduction in shelf sediments in the upwelling region off Central Peru. *Continental shelf research*, 10(4), 355-367.

- Giannetto, A., Maisano, M., Cappello, T., Oliva, S., Parrino, V., Natalotto, A., ... & Fasulo, S. (2017). Effects of oxygen availability on oxidative stress biomarkers in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biotechnology*, 19, 614-626. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9780-6>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... y Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Graco, M. I., Ledesma, J., Flores, G., y Girón, M. (2007). Nutrientes, oxígeno y procesos biogeoquímicos en el sistema de surgencias de la corriente de Humboldt frente a Perú. *Revista Peruana de Biología*, 14(1), 117-128.
- Grote, J., Schott, T., Bruckner, C. G., Glöckner, F. O., Jost, G., Teeling, H., Labrenz, M., y Jürgens, K. (2012). Genome and physiology of a model *Epsilonproteobacterium* responsible for sulfide detoxification in marine oxygen depletion zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 506-510. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111262109>
- Hatano, K., Orita, R., Kimura, K., Nagano, Y., y Suzuki, N. (2025). Gene expression dataset of the blood clam *Anadara kagoshimensis* in relation to anoxic stress. *Data in Brief*, 59, 111341. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2025.111341>

- Heux, S., Meynial-Salles, I., O'Donohue, M. J., y Dumon, C. (2015). White biotechnology: state of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology advances*, 33(8), 1653-1670. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.004>
- Hidalgo-Cabrera, A., Bustos, P., Vidal-Pérez, D., Schmitt, P., Brokordt, K., Brown, D. I., y Farlora, R. (2022). Analysis and gonadal localization of speedy a mRNA transcript, a novel gene associated with early germline cells in the scallop, *Argopecten purpuratus*. *Animal Reproduction Science*, 236, 106909.
- Igarza, M., Aguirre-Velarde, A., Tam, J., Cueto-Vega, R., Flye-Sainte-Marie, J., Gutiérrez, D., y Colas, F. (2024). Characterization of hypoxic events in PARACAS bay (Peru, 13.8° s) through intensity and biological effect indexes. *Journal of Marine Systems*, 244, 103978. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2024.103978>
- Jeria, E., Oyanedel, D., Rojas, R., Farlora, R., Lira, G., Mercado, A.,... y Schmitt, P. (2023). Resistance of *Argopecten purpuratus* scallop larvae to vibriosis is associated with the front-loading of immune genes and enhanced antimicrobial response. *Frontiers in immunology*, 14, 1150280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1150280>
- Kluger, L. C., Taylor, M. H., Wolff, M., Stotz, W., y Mendo, J. (2019). From an open-access fishery to a regulated aquaculture business: The case of the most important Latin American bay scallop (*Argopecten purpuratus*). *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 187-203. <https://doi.org/10.1111/raq.12234>

- Kregel KC (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92(5):2177–2186. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01267.2001>
- Kurochkin, I. O., Ivanina, A. V., Eilers, S., Downs, C. A., May, L. A., y Sokolova, I. M. (2009). Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(5), R1262-R1272.
- Lacal, J. C. (1997). Regulation of proliferation and apoptosis by Ras and Rho GTPases through specific phospholipid-dependent signaling. *FEBS letters*, 410(1), 73-77. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00444-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00444-4)
- Li, Q., y Lancaster, J. R. (2013). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, 35, 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.07.001>
- Li, C., Liu, X., Liu, B., Ma, B., Liu, F., Liu, G., ... y Wang, C. (2018). Draft genome of the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus*. *GigaScience*, 7(4), giy031. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy031>
- Lin, W., Jiang, R., Hu, S., Xiao, X., Wu, J., Wei, S., y Ouyang, G. (2019). Investigating the toxicities of different functionalized polystyrene nanoplastics on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 180, 509-516. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.036>
- Limburg, K. E., Breitburg, D., Swaney, D. P., y Jacinto, G. (2020). Ocean deoxygenation: *A primer*. *One Earth*, 2(1), 24-29.

- Loor, A., y Sonnenholzner, S. (2014). Reproductive cycle of the scallop *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae) in Ecuador. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 283–296. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200008>
- Liu, H., Zha, S., Yang, Z., Zhang, W., Lin, Z., Wang, S., y Bao, Y. (2022). Acute sulfide exposure induces hemocyte toxicity and microbiota dysbiosis in blood clam *Tegillarca granosa*. *Aquatic Toxicology*, 249, 106224. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106224>
- Liu, Q., Yao, F., Wang, M., Zhou, B., Cheng, H., Wang, W., Jin, L., Lin, Q., y Cun, J. W. (2011). Novel human BTB/POZ domain-containing zinc finger protein ZBTB1 inhibits transcriptional activities of CRE. *Mol Cell Biochem*, 357(1-2), 405–414. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0911-5>
- Navarro, J. M., Leiva, G. E., Martínez, G., y Aguilera, C. (2000). Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247(1), 67–83. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00139-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00139-3)
- Mendo, J., Wolff, M., Carbajal, W., Gonzáles, I., y Badjeck, M. (2008). Manejo y explotación de los principales bancos naturales de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa Peruana. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20-24.

- Mendo, J., Wolff, M., Mendo, T., y Ysla, L. (2016). Chapter 28—Scallop Fishery and Culture in Peru. En S. E. Shumway & G. J. Parsons (Eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 40, pp. 1089-1109). *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62710-0.00028-6>
- Montúfar-Romero, M., Valenzuela-Muñoz, V., Valenzuela-Miranda, D., y Gallardo-Escárate, C. (2024). Hypoxia in the Blue Mussel *Mytilus chilensis* Induces a Transcriptome Shift Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Metabolism, and Immune Response. *Genes*, 15(6), 658. <https://doi.org/10.3390/genes15060658>
- Moran, A. L., y Manahan, D. T. (2004). Physiological recovery from prolonged ‘starvation’ in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 306(1), 17-36. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.021>
- Nagasoe, S., Yurimoto, T., Suzuki, K., Maeno, Y., y Kimoto, K. (2011). Efectos del sulfuro de hidrógeno en la actividad alimentaria de la almeja de Manila *Ruditapes philippinarum*. *Aquat Biol*, 13, 293-302. <https://doi.org/10.3354/ab00374>
- Naumov, L., Neumann, T., Radtke, H., y Meier, H. E. M. (2023). Limited ventilation of the central Baltic Sea due to elevated oxygen consumption. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1175643. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2023.1175643>

- Ohde, T. (2018). Coastal Sulfur Plumes off Peru During El Niño, La Niña, and Neutral Phases. *Geophysical Research Letters*, 45(14), 7075-7083. <https://doi.org/10.1029/2018GL077618>
- Ohde, T., Siegel, H., Reißmann, J., y Gerth, M. (2007). Identification and investigation of sulphur plumes along the Namibian coast using the MERIS sensor. *Continental Shelf Research*, 27(6), 744-756. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2006.11.016>
- Paschke, K. A., Gebauer, P., Buchholz, F., y Anger, K. (2004). Seasonal variation in starvation resistance of early larval North Sea shrimp *Crangon crangon* (Decapoda: Crangonidae). *Marine Ecology Progress Series*, 279, 183-191. <https://doi.org/10.3354/meps279183>
- PRODUCE. (2022). Exportación peruana de conchas de abanico supera los US\$ 50 millones a mayo del 2022. Obtenido de: <https://www.gob.pe/institucion/mincetur/noticias/632710-exportacion-peruana-de-conchas-de-abanico-supera-los-us-50-millones-a-mayo-del-2022>
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rabalais, N. N., Cai, W.-J., Carstensen, J., Conley, D. J., Fry, B., Hu, X., Quiñones-Rivera, Z., Rosenberg, R., Slomp, C. P., Turner, R. E., Voss, M., Wissel, B., y Zhang, J. (2014). Eutrophication-Driven Deoxygenation in the Coastal Ocean. *Oceanography*, 27(1), 172-183.

- Riascos, J. M., Carstensen, D., Laudien, J., Arntz, W. E., Oliva, M. E., Güntner, A., y Heilmayer, O. (2009). Thriving and declining: Climate variability shaping life-history and population persistence of *Mesodesma donacium* in the Humboldt Upwelling System. *Marine Ecology Progress Series*, 385, 151–163. <https://doi.org/10.3354/meps08042>
- Riesch, R., Tobler, M., y Plath, M. (2015). Hydrogen Sulfide-Toxic Habitats. En R. Riesch, M. Tobler, y M. Plath (Eds.), *Extremophile Fishes: Ecology, Evolution, and Physiology of Teleosts in Extreme Environments* (pp. 137-159). *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13362-1_7
- Rioual, F., Flye-Sainte-Marie, J., Point, D., Colas, F., Cuellar-Martinez, T., Tam, J.,... y Aguirre-Velarde, A. (2025). Sulfides as environmental stressors in Paracas Bay, Peru. *Marine Pollution Bulletin*, 212, 117550. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.117550>
- Schunck, H., Lavik, G., Desai, D. K., Großkopf, T., Kalvelage, T., Löscher, C. R., Paulmier, A., Contreras, S., Siegel, H., Holtappels, M., Rosenstiel, P., Schilhabel, M. B., Graco, M., Schmitz, R. A., Kuypers, M. M. M., y LaRoche, J. (2013). Giant Hydrogen Sulfide Plume in the Oxygen Minimum Zone off Peru Supports Chemolithoautotrophy. *PLOS ONE*, 8(8), e68661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068661>
- Solís, A J., Carhuapoma, W., Velazco, C, F., y Graco, M. (2012). Validación y cuantificación de sulfuros de hidrógeno (H₂S) en agua intersticial de sedimentos marinos recientes. *Inf Inst Mar Perú*, 39,1-2.

- Song, J., y Wang, C. (2019). Transcriptomic and proteomic analyses of genetic factors influencing adductor muscle coloration in QN Orange scallops. *BMC genomics*, 20, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5717-y>
- Steinberg, C. E. W. (2018). Dietary Restriction, Starvation, Compensatory Growth – ‘Short-Term Fasting Does Not Kill You: It Can Make You Stronger’. En C. E. W. Steinberg (Ed.), *Aquatic Animal Nutrition: A Mechanistic Perspective from Individuals to Generations* (pp. 137-287). *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91767-2_4
- Sun, Y., Wang, M., Zhong, Z., Chen, H., Wang, H., Zhou, L., ... y Li, C. (2022). Adaptación a ambientes ricos en sulfuro de hidrógeno: Estrategias para la desintoxicación activa en mejillones simbióticos de aguas profundas, *Gigantidas platifrons*. *Science of The Total Environment*, 804, 150054. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150054>
- Tebani, A., y Bekri, S. (2020). High-throughput omics in the precision medicine ecosystem. In *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers* (pp. 19-31). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819178-1.00003-4>
- Therneau, T. (2023). *_A Package for Survival Analysis in R_*. R package version 3.5-5, <<https://CRAN.R-project.org/package=survival>>
- Ulloa, O., Canfield, D. E., DeLong, E. F., Letelier, R. M., y Stewart, F. J. (2012). Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 15996-16003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205009109>

- Vaquer-Sunyer, R., y Duarte, C. M. (2010). Sulfide exposure accelerates hypoxia-driven mortalit. *Limnology and Oceanography*, 55(3), 1075-1082.
<https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.3.1075>
- Wang, N., y Huo, Y. X. (2022). Using genome and transcriptome analysis to elucidate biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 75, 102708. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102708>
- Wang, Y., Zheng, Y., Dong, J., y Zhang, X. (2021). Two-sided effects of prolonged hypoxia and sulfide exposure on juvenile ark shells (*Anadara broughtonii*). *Marine Environmental Research*, 169, 105326.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105326>
- Wang, Y., Zhou, S., Liu, T., Chen, M., Li, W., y Zhang, X. (2019). The transcriptomic responses of the ark shell, *Anadara broughtonii*, to sulfide and hypoxia exposure. *Molecular biology reports*, 46(4), 4245-4257.
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., y Vaughan, D. (2023). *_dplyr: A Grammar of Data Manipulation_*. R package version 1.1.4, <<https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>>.
- Wolff, M. (1988). Spawning and recruitment in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus*. Marine ecology progress series. *Oldendorf*, 42(3), 213-217.
<https://doi.org/10.3354/meps042213>
- Wolff, M., y Mendo, J. (2000). Management of the Peruvian bay scallop (*Argopecten purpuratus*) metapopulation with regard to environmental change. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 10(2),

117-126.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0755\(200003/04\)10:2<117::AID-AQC399>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0755(200003/04)10:2<117::AID-AQC399>3.0.CO;2-T)

Yan, X., Zhang, Y., Huo, Z., Yang, F., y Zhang, G. (2009). Effects of starvation on larval growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Acta Ecologica Sinica*, 29(6), 327-334.

Yang, Z., Wang, Y., Jiang, P., Xia, F., Xu, Y., Tian, X., y Zhang, X. (2023). Physiological and transcriptomic analyses reveal critical immune responses to hypoxia and sulfide in the haemolymph of clam *Tegillarca granosa*. *Front. Mar. Sci.*, 10, 1139973. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1139973>

Zapata, M., Tanguy, A., David, E., Moraga, D., y Riquelme, C. (2009). Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. *Gene*, 442(1-2), 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.04.019>

Zhang, J., Gilbert, D., Gooday, A. J., Levin, L., Naqvi, S. W. A., Middelburg, J. J., y Van der Plas, A. K. (2010). Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development. *Biogeosciences*, 7(5), 1443-1467.

Zhang, X. Z., Yang, M. J., Zhou, C., Song, H., Dong, S. P., Guo, Y. J., y Zhang, T. (2024). Effect of sulfide on the physiological energetics of *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, 581, 740396. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740396>

Zhao, Y., Ning, J., Wang, Y., Liu, G., Xu, X., Wang, C., y Lu, X. (2025). Potential roles of the sirtuins in promoting longevity for larger *Argopecten* scallops.

Marine Life Science & Technology, 7, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s42995-024-00269-3>

Zheng, H., Ke, C., Zhou, S., y Li, F. (2005). Effects of starvation on larval growth, survival and metamorphosis of Ivory shell *Babylonia formosae habei* Altena et al., 1981 (Neogastropoda: Buccinidae). *Aquaculture*, 243(1-4), 357-366. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.010>

11. ANEXOS

12.1 Anexo 1

PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DEL H₂S EN EL TACHO

1. Botar el agua del tacho (abrir /desenroscar la salida de la toma de muestra de agua).
2. Llenar el tacho con agua de mar hasta el nivel marcado (línea blanca).
3. Prender la bomba.
4. Abrir la llave general del tanque de Nitrógeno, luego abrir la llave pequeña solo hasta obtener burbujas pequeñas.
5. Colocar la tapa de foam dentro del tanque que encaje con el espacio para los cables.
6. Colocar la tapa plástica propia del tacho logrando que el tubo ingrese dentro del agujero del foam.
7. Esperar que el WTW registre 2.5% de saturación de oxígeno para cerrar el flujo de nitrógeno (cerrar todas las llaves).
8. Pesar 5 g de sulfuro de sodio monohidratado en una lámina de papel aluminio
9. Extraer 50 ml de agua en un beaker del tacho por la salida inferior(manguera pegada al beaker- inclinado)
10. Agregar los 5 g de sulfuro de sodio monohidratado al beaker (con agua hipóxica) y mezclar con una bagueta lentamente hasta eliminar todo los cristales del fondo.

11. Agregar la mezcla con un embudo por el tubo transparente.
12. Esperar 2 minutos
13. Luego apagar la bomba

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE VIALES PARA LA FIJACIÓN DE H₂S

1. Agregar acetato de zinc en un beaker pequeño según la cantidad a utilizar.
2. Agregar en cada vial (limpio) 2.5 ml (2500 u/l) de acetato de zinc con la micropipeta.
3. Rotular

PROTOCOLO PARA TOMAR MUESTRA DE AGUA CON SULFURO

1. Tener listo los viales con 2.5 ml de acetato de zinc.
2. Lavar la pipeta de vidrio con agua destilada.
3. Levantar la tapa pequeña de cada cuadrante 1 y hundir la pipeta hasta el número 0 ml (dibujado en la pipeta).
4. Tomar la primera muestra de agua (10ml) y luego eliminarla
5. Volver a tomar la muestra por segunda vez (10ml) y agregar en los viales 7.5 ml (con la punta de pipeta pegada a la pared del vial sin tocar el acetato de zinc y dejar caer el agua suavemente para evitar el burbujeo).
6. Hacer lo mismo para cada cuadrante pequeño (2,3 y 4).

PROTOCOLO DEL MANEJO DE REACTIVOS PARA LA LECTURA DE H₂S

1. Colocar papel doble en el área de trabajo (mesa de trabajo).
2. Usar guantes y mandil
3. Abrir el reactivo 1 (color azul oscuro / negro)
4. Tomar con la micropipeta 250 uL
5. Agregar en cada vial.
6. Luego de a ver usado el reactivo 1, se debe cerrar y guardar el envase.
7. Posteriormente, se debe abrir el envase del reactivo 2.
8. Tomar con la micropipeta 250 uL.
9. Agregar en cada vial.
10. Luego esperar 1 hora para leer la muestras en el espectrofotómetro.



Figura 1. Distribución aleatoria de las canastas en el tanque de exposición para el H₂S.

1.5	4	5	3	3.5
1	2	0.5	2.5	4.5

Figura 2. Distribución aleatoria de las canastas en el tanque de exposición para la hipoxia.

11.2.Anexo 2

Tabla 1. Resultado del procesamiento de las muestras en el Nanodrop respecto al control, exposición al sulfuro de hidrógeno (ES), exposición a la hipoxia (EH), recuperación al sulfuro de hidrógeno (RS) y recuperación a la hipoxia.

Condición	Nanodrop (ng/ul)	A260/A280	A260/A230	Qubit (ng/uL)
Control	639.5	1.93	1.87	56.8
Control	1252.3	1.94	2.02	37
Control	1301.4	1.93	1.91	87.4
ES	1856.1	1.94	1.67	52.6
ES	1856.1	1.94	1.67	52.6
ES	1856.1	1.94	1.67	52.6
EH	2048.7	1.95	1.85	192
EH	1402.4	1.94	2.07	51
EH	975.1	1.96	2.26	50
RS	1709.4	1.96	1.97	200
RS	1334.2	1.93	1.89	32.4
RS	1631.2	2.01	1.8	82
RH	1429	2	2.11	44.4
RH	1518	2.03	1.72	44.8
RH	1675.4	1.95	2.24	110

11.3. Anexo 3:

Tabla 1. Valores promedio de las condiciones fisicoquímicas del agua.

Eventos	O ₂ (%)	pH	T° C
Exposición al H ₂ S	0.41 ± 0.62	7.77 ± 0.42	15.81 ± 0.71
Exposición a la Hipoxia	0.44 ± 0.47	7.61 ± 0.16	15.93 ± 0.08
Recuperación	100.56 ± 3.03	7.86 ± 0.07	16.32 ± 0.13

Tabla 2. Valores promedios de la altura valvar (Av), y factor de estado (FEE).

Tratamiento	Av (mm)	Factor de estado energético (media±ds)
Control	62.53 ± 1.41	7.21 ± 2.82
	47.13 ± 0.83	7.03 ± 4.29
H₂S	62.14 ± 1.78	8.83 ± 3.64*
	43.39 ± 7.21	8.05 ± 4.26*
Hipoxia	63.88 ± 3.81	9.27 ± 5.21*
	44.48 ± 4.07	5.68 ± 5.91*

*Presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).



Figura 1. Mapa de calor de la expresión diferencial de genes entre la exposición a la hipoxia (EH) vs el control.

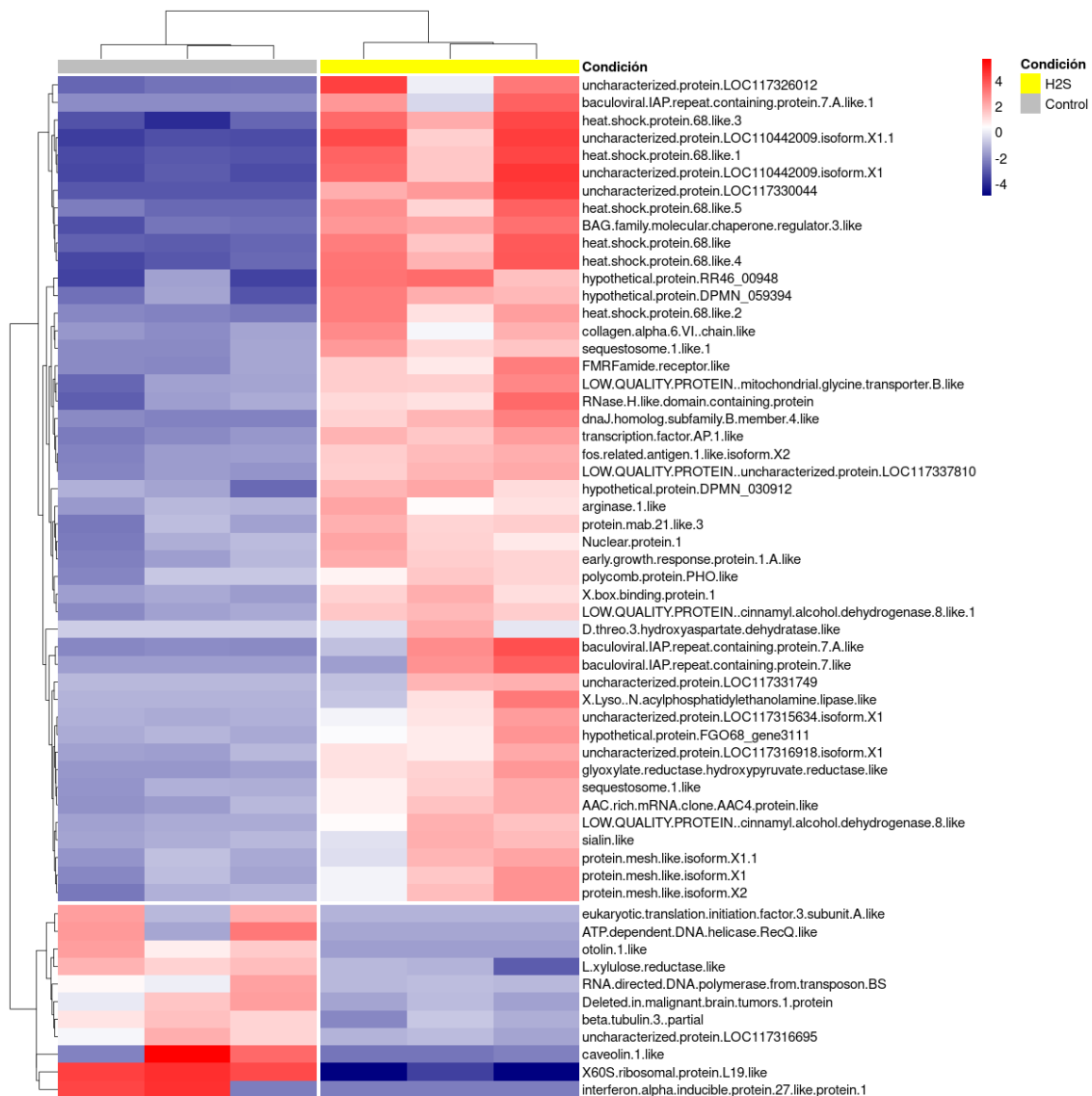


Figura 2. Mapa de calor de la expresión diferencial entre la exposición a la hipoxia más sulfuro de hidrógeno (H₂S) vs el control en organismos de 63 mm de *A. purpuratus*.



Figura 3. Mapa de calor de la expresión diferencial de genes entre la recuperación a la hipoxia (EH) vs el control.

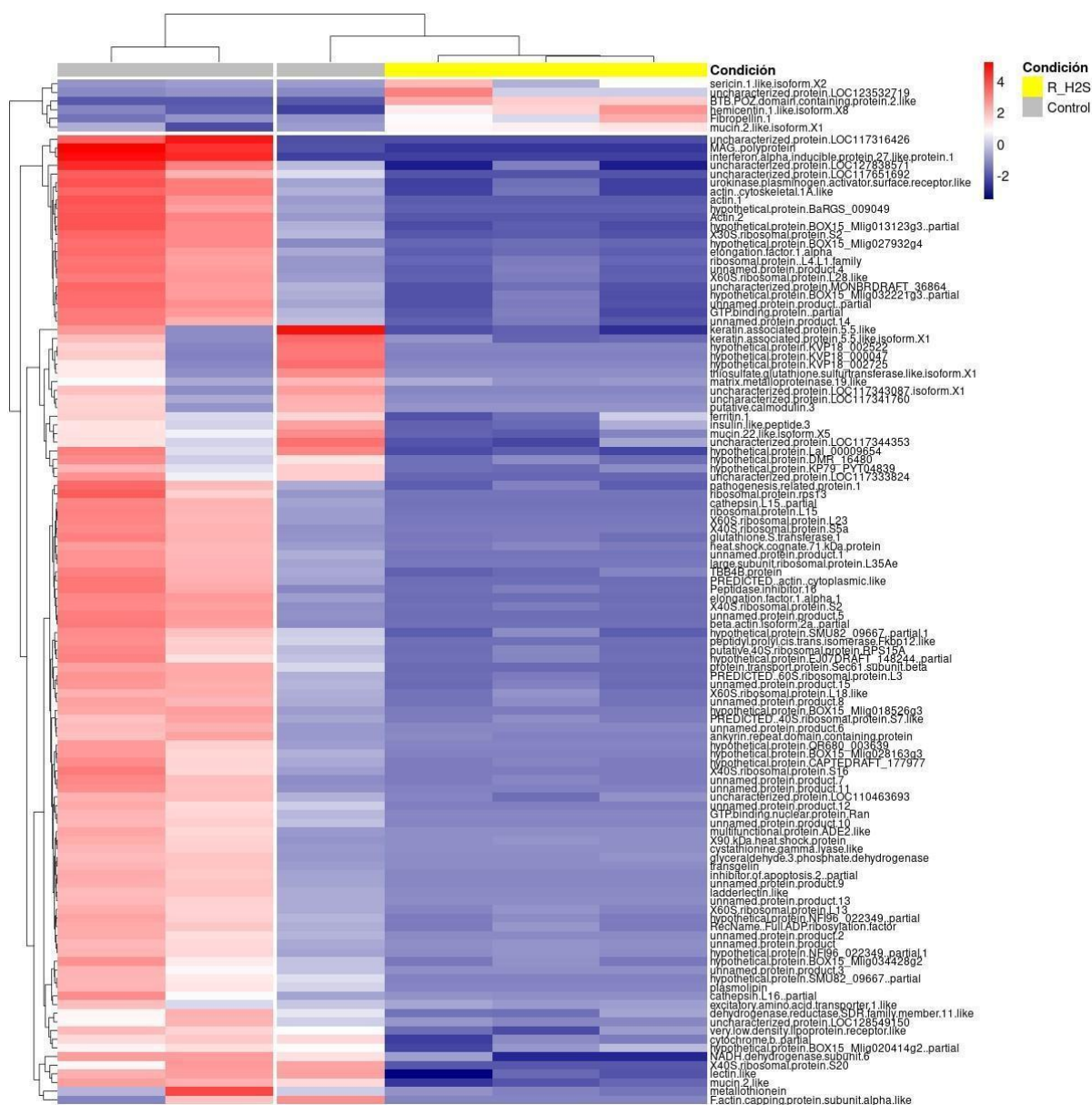


Figura 4. . Mapa de calor de la expresión diferencial de genes entre la recuperación a la hipoxia más el sulfuro de hidrógeno (H₂S) vs el control en organismos de 63 mm *A. purpuratus*.