

UCH-FC
MAG-B
C 764
C. 1



**PREPARACIÓN DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE
DOS MARSUPIALES QUE PRESENTAN ESTRATEGIAS
DE AHORRO ENERGÉTICO DIFERENTE (SOPOR
DIURNO VERSUS HIBERNACIÓN)**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

CAROLINA ISABEL CONTRERAS RAMOS

Junio, 2016

Director de Tesis Dr: Pablo Sabat K.



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Carolina Isabel Contreras Ramos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 01 de junio 2016

Director de Tesis:
Dr. Pablo Sabat Kirkwood



Co-Director de Tesis
Dr. Roberto Nespolo Rossi

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Rodrigo Vásquez



Dr. Francisco Bozinovic



Dedicada a mis padres, hermanas y mi sobrina Isabel.



Carolina Isabel Contreras Ramos

Nació en Valdivia, Chile en noviembre de 1988. En el año 2007 ingresó a la Universidad Austral de Chile, a estudiar Licenciatura en Ciencias Biológicas. Durante el curso de su carrera se dio cuenta de quería seguir dedicada a la docencia e investigación. Dada sus motivaciones decidió el año 2014 entrar al programa de Magister en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile, incorporándose al Laboratorio de Ecofisiología Animal, realizando su tesis bajo la dirección del Dr. Pablo Sabat K. y co-tutor Dr. Roberto Nespolo, académico de la Universidad Austral de Chile. Carolina centró sus intereses en la fisiología ecológica y evolutiva, principalmente en la fisiología de la hibernación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, Pablo Sabat por su confianza, apoyo, conocimientos y por brindarme la oportunidad de ser parte de su laboratorio.

A Roberto Nespolo por seguir confiando en mí, haberme guiado como cotutor, por la preocupación en lo académico y personal. Gracias por pagar lo del SAG y prestarme laboratorio y a tu gente cariñosa de Valdivia.

También agradezco a aquellas personas que me permitieron realizar este trabajo, desde quienes participaron activamente en él, hasta los amigos que me brindaron alguna palabra de apoyo.

Quisiera agradecer a la PDI que no nos metió presos por algunos errores al inicio de los terrenos. También me gustaría agradecer al SAG por permitirnos seguir capturando y por dejarnos algunas trampas para el terreno, aunque se requisaron 18.

En particular agradezco la ayuda directa e invaluable de Mónica Núñez, Andrés Sazo, Guido tanto en los terrenos como en el laboratorio. Y agradezco la ayuda y consejo de todos mis compañeros y profesores de laboratorio, a mis amigos dentro y fuera de la universidad; Daniela, Andrea, Gabriela, Romina, Karin, Natalia, Cristóbal, Isaac, a Sofía por la ayuda en los gráficos y las letritas, Arlet, Yulian, Paulo; compañeros desde la básica y que aún nos soportamos y amamos. También a Andrea Avila, Nathaly Catalán con su novio, Soledad y Tannia, Feñita, a Paola y Constanza que me acompañaron a terreno y no nos comió el puma, aunque confieso que fue un evento único y majestuoso verlo junto a Don Pedro. A mi pediatra Fernando gracias por todo, sobre todo el ánimo. Quisiera agradecer también a Pablo Cortés y su hermana Caro, por la confianza. Por su puesto a mi Ariel gran amigo, gracias por estar en todas! a mi compañera de casa Ingrid por soportarme en este proceso, gracias por tus consejos, los vinos de los viernes y risas.

A mi familia, tíos, primos pese a que no entienden nada de lo que hago, ponen cara de interés y fingen entender.

A mis hermanas Carlita y Magaly por motivarme en este proceso, por las palabras de aliento y a mi sobrina Isabel por brindarme cariño y por la admiración mutua.

A nuestra mascota Cejas, mi perro fiel.

En forma muy especial, doy gracias a mis padres Carlos y Alida por su esfuerzo incansable del día a día, que junto con permitirme concretar este trabajo, han sido un ejemplo motivador y un orgullo para mí.

Las capturas de animales se realizaron mediante los Permisos de Captura del Servicio Agrícola y Ganadero Resolución 1118/2015 y 1271/2015

FINANCIAMIENTO

Esta tesis de postgrado fue financiada gracias a los proyectos FONDECYT N° 1120276 (PS) y FONDECYT 1130750 (RN).

BECA DE MAGISTER NACIONAL Folio 22140997.

ÍNDICE DE MATERIAS

Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	5
3. OBJETIVOS	
3.1.1 Objetivos generales.....	6
3.1.2 Objetivos específicos.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Modelo de estudio.....	7
4.2 Captura de individuos.....	8
4.3 Aclimataciones.....	9
4.4 Preparación de muestras.....	10
4.5 Análisis estadísticos.....	13
5. RESULTADOS	
5.1 Variación masa corporal.....	14
5.2 Estrés oxidativo en <i>Dromiciops gliroides</i>	16
5.3 Estrés oxidativo en <i>Thylamys elegans</i>	22
6. DISCUSIÓN	
6.1 Protección antioxidante.....	30
6.2 Daño oxidativo.....	34
7. CONCLUSIÓN.....	40
8. REFERENCIAS.....	42

Lista de Tablas

Tabla 1. Resumen de la aclimatación térmica realizada para <i>Dromiciops gliroides</i> y <i>Thylamys elegans</i>	10
Tabla 2. Resumen de las variables a analizar en los homogeneizados de tejidos de animales aclimatados a distintos tratamientos térmicos.....	11
Tabla 3. Descripción masas corporales de individuos de <i>Thylamys elegans</i> y <i>Dromiciops gliroides</i> al inicio de la aclimatación.....	15
Tabla 4. Resumen de las variables evaluadas en tejido hepático y muscular en individuos de <i>Dromiciops gliroides</i>	21
Tabla 5. Resumen de las variables evaluadas en tejido hepático y muscular en individuos de <i>Thylamys elegans</i>	28

Lista de Figuras

- Fig.1. Variación temporal de la masa corporal en individuos de *Thylamys elegans* y *Dromiciops gliroides* aclimatados a diferentes tratamientos térmicos.....15
- Figura 2. Concentración de antioxidantes totales de individuos de *Dromiciops gliroides* evaluadas en tejido hepático y muscular, bajo dos tratamientos térmicos.....16
- Figura 3. Valores de los ensayos de TBARS en individuos de *Dromiciops gliroides* evaluados en tejido hepático y muscular.....17
- Figura 4. Concentración de nitrato total evaluada en tejido hepático y muscular de individuos de *Dromiciops gliroides*, bajo distintos tratamientos térmicos.....18
- Figura 5. Porcentaje de inhibición del antioxidante Superóxido dismutasa, evaluado en tejido hepático y muscular en individuos de *Dromiciops gliroides*.....19
- Figura 6. Concentración de glutatión total evaluados en tejido hepático y tejido muscular en individuos de la especie *Dromiciops gliroides*.....20
- Figura 7. Antioxidantes totales evaluados en tejido hepático y muscular del marsupial *Thylamys elegans*.....23
- Figura 8. Valores del ensayo TBARS de tejido hepático y muscular, en individuos aclimatados a diferentes tratamientos térmicos en de la especie *Thylamys elegans*.....24
- Figura 9. Valores promedios del ensayo nitrato total en diferentes tejidos analizados en la especie *Thylamys elegans*.....25
- Figura 10. Porcentaje de inhibición de SOD en diferentes tejidos evaluados en *Thylamys elegans*.....26
- Figura 11. Concentración de glutatión total evaluados en tejido hepático y muscular en el marsupial *Thylamys elegans*.....27

Resumen

Una de las estrategias que permiten a los micromamíferos ahorrar energía en ambientes estacionales, es el sopor diario o profundo el cual es inducido por diversos factores, tales como la disminución de la temperatura ambiental, disminución del fotoperíodo y del alimento. Los animales que realizan esta estrategia presentan altas concentraciones antioxidantes que protegen sus tejidos del daño oxidativo durante el retorno a la normotermia, la cual está acompañada con un aumento brusco de oxígeno en los tejidos produciendo un aumento de sustancias reactivas al oxígeno y radicales libres. Para el caso de marsupiales, los estudios realizados son escasos y aun cuando se ha reportado una variación inter-específica de la expresión de sistema enzimático protector, poco es conocido acerca de su respuesta durante el letargo fisiológico. Por otro lado, se ignora si los marsupiales sudamericanos presentan patrones de defensas antioxidantes similares a lo ya descrito para otros mamíferos. Más aun, se desconoce si especies que poseen distintas estrategias de ahorro energético, tales como el sopor diario y la hibernación, presentan alguna diferencia en dicha respuesta. En esta tesis se estudió, por primera vez la preparación antioxidante hibernal de dos marsupiales Sudamericanos. *Dromiciops gliroides* realiza sopor profundo o hibernación y también sopor diario en verano. En contraparte, *Thylamys elegans* se ha descrito que realiza sopor diario. Se sometió a prueba

la hipótesis que durante la preparación antioxidante existe una mayor sobre-expresión de un sistema de defensas antioxidantes en la hibernación en comparación al sopor diario. Así, se evaluó la capacidad antioxidante total (TAC), la actividad de superóxido dismutasa (SOD), así también la concentración de glutatión total (GSH) y además dos parámetros de estrés oxidativo, las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el nitrato total (NT). Los resultados revelaron que la capacidad antioxidante total está presente en ambas especies y que la GSH presenta una mayor concentración en el tejido muscular que en el tejido hepático durante el sopor en *D. gliroides*, pero no en *T. elegans*. Por el contrario, la SOD en hembras en sopor de *T. elegans* como *D. gliroides* presentaron una mayor actividad que machos activos. En cuanto al estrés oxidativo, los machos de *D. gliroides* en sopor y hembras activas presentaron una mayor concentración de TBARS en el tejido hepático lo cual no fue apreciado en el tejido muscular. En *T. elegans*, individuos en sopor y activos presentaron altas concentraciones de TBARS para ambos tejidos evaluados. Así también en *T. elegans* el NT en machos y hembras durante el sopor fue mayor que individuos activos para ambos tejidos, no así en *D. gliroides*, que solo presentaron mayor actividad de NT en el tejido hepático los machos que se encontraban en sopor. En resumen, la regulación de la respuesta antioxidante no pareciera ocurrir a un nivel orgánico global, sino más bien es tejido específica y que los tejidos metabólicamente activos presentan comparativamente mayor actividad antioxidante que los tejidos estructurales. Finalmente, la sobreexpresión de la actividad de enzimas antioxidantes representaría una adaptación frente a la posible producción de radicales libres durante los periodos de letargo metabólico para ambas estrategias de ahorro de energía.

Abstract

One of the strategies that allow micromammals save energy in seasonal environments, is the daily torpor or deep sleep, which is induced by various factors such as decreased ambient temperature, decreased photoperiod and food. Animals that perform this strategy have high antioxidants concentrations that protect the tissues from oxidative damage during the return to normothermia, which is accompanied by a sharp increase of oxygen in the tissue, producing an increase of reactive oxygen substances and free radicals. In the case of marsupials, studies are scarce and even though it has been reported an inter-specific variation of the expression of protective enzyme system, little is known about its response during physiological dormancy. On the other hand, it is ignored if the South American marsupials have similar patterns of antioxidant defenses with other mammals already described. Moreover, it is unknown whether species that have different energy saving strategies, such as daily torpor and hibernation, show any difference in the response. This study evaluated for the first time the hibernal antioxidant preparation of two South American marsupials. *Dromiciops gliroides* performs deep torpor or hibernation and daily torpor in summer. In counterpart it has been described that *Thylamys elegans* performs daily torpor. The hypothesis that states that during antioxidant preparation there is a greater over-expression of an antioxidant defense system in hibernation compared to daily torpor was tested. Thus, the total antioxidant capacity

(TAC) was evaluated, the activity of superoxide dismutase (SOD) and also the concentration of total glutathione (GSH) and also two parameters of oxidative stress, substances reactive to tiobarbituric acid (TBARS) and total nitrate (NO). The results revealed that the total antioxidant capacity is present in both species and that GSH has a higher concentration in the muscle tissue than in the liver tissue, during torpor in *D. gliroides*, but not in *T. elegans*. In contrast, SOD in *T. elegans* and *D. gliroides* females during torpor showed higher activity than active males. As for oxidative stress, male *D. gliroides* during torpor and active females had a higher concentration of TBARS in the liver tissue, which was not appreciated, in muscle tissue. In *T. elegans*, active individuals and in torpor presented high concentrations of TBARS for both tissues tested. So in *T. elegans*, the NT in males and females during torpor was higher than active individuals for both tissues, but not in *D. gliroides*, where only males in torpor had higher NT activity in the liver tissue. In summary, the regulation of the antioxidant response appears not to occur to a global organismic level, but is rather tissue specific and metabolically active tissues have comparatively a higher antioxidant activity than structural tissues. Finally, overexpression of antioxidant enzyme activity represent an adaptation to possible free radical production during periods of metabolic dormancy for both energy saving strategies.

1. INTRODUCCIÓN

Los pequeños organismos endotermos que habitan ambientes estacionales presentan estrategias que le permiten mantener la homeostasis térmica a pesar de sus altas tasas de pérdida de calor (organismos de pequeño tamaño tienen mayor superficie expuesta al ambiente en relación a su masa corporal), (McNab, 2002; Randal y Bruggren, 2002; Willmer et al., 2005) y a los cambios en las condiciones ambientales relacionadas con la temperatura y recursos alimentarios (Bozinovic y Merrit, 1991). Debido a lo anterior, estos animales tienen que realizar una serie de ajustes que les permitan sobrevivir (Körtner y Geiser, 2000). Entre de éstos, se han descrito modificaciones en la conducta desde la búsqueda de hibernáculos (Geiser, 2001; Nicol y Andersen, 2007), anidamiento comunal (Gilbert et al., 2010; Canals y Bozinovic, 2011; Franco et al., 2012) y cambio en las conductas de forrajeo (Vasquez, 1996; Careau et al., 2013). Por otro lado, se han descrito mecanismos fisiológicos compensatorios a nivel digestivo que permiten maximizar la ingesta de los nutrientes (Sabat et al., 2005; Cortes et al., 2011), como también la capacidad de abandonar la normotermia y entrar en un estado de letargo, también conocida como sopor o hibernación.

Este letargo se caracteriza por la disminución transitoria en la tasa metabólica, frecuencia cardiaca, temperatura corporal y actividad física (Humphries et al., 2003; Willmer et al., 2005; Wojciechowski et al., 2007). El sopor puede durar desde un par de minutos a horas, en cuyo caso se denomina sopor diario, pero también durar días y hasta

meses, en cuyo caso se habla de hibernación (Ruf y Geiser, 2015). Entre los principales desencadenantes del sopor y de la hibernación, está el cambio en fotoperiodo (días más cortos), disminución en las temperaturas ambientales y la disminución en la disponibilidad de alimento ((Bozinovic y Merrit, 1991; Geiser, 2011). Todas estas estrategias permiten a los organismos ahorrar energía durante los períodos con temperaturas ambientales bajas y la baja oferta trófica (Körtner y Geiser, 2000; Melvin y Andrews, 2009).

Existen diversos costos asociados a la estrategia de ahorro energético por sopor o hibernación. Por ejemplo, se ha encontrado que durante el recalentamiento que caracteriza la vuelta a la normotermia, después de un evento de sopor ocurre un aumento brusco en la producción de calor y por ende del consumo de oxígeno, lo cual libera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) debido a la reintroducción de oxígeno en los tejidos (Buzadzic et al., 1997; Vereneo, 2002). Estas sustancias son productos de algunas reacciones metabólicas las cuales varían en el tiempo de vida media, reactividad o capacidad pro-oxidante (Page et al., 2009; Pamplona y Costantini, 2011; Costantini, 2014). En presencia de algún metal u otro elemento con el cual reaccionan, las ROS pueden generar diversos grados de daño celular, tales como cambios de permeabilidad de membrana cuando se produce una reacción de peroxidación lipídica, mutaciones puntuales, desmetilación de citosinas en las hebras de ADN, y también cambios conformacionales en las proteínas (Vereneo, 2002; Starkov et al., 2004; Costantini, 2014)

Todos los organismos, incluyendo el ser humano, utilizan una serie de defensas antioxidantes que previenen el daño celular (Davies, 2000) . De hecho, los animales que

hacen frente a cambios de temperatura o largos periodos bajo anoxia presentan adaptaciones bioquímicas que les permiten tolerar el ingreso de oxígeno a sus tejidos y evitar el daño por estrés oxidativo (Storey, 1996). La generación de defensas antioxidantes, las cuales pueden ser de origen enzimático y no enzimático, interactúa con las ROS permitiendo así la reducción o la prevención del efecto oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007; Page et al., 2009). En este sentido, la presencia de actividad antioxidante es de particular importancia en especies que presentan aumentos bruscos en el metabolismo de sus tejidos y por ende aumentos en las concentraciones de ROS. Efectivamente, Avci y col. (2014) evaluaron el efecto de la hibernación sobre los eventos antioxidantes utilizando como modelo de estudio *Spermophilus xanthoprimum*, un roedor hibernante. Ellos encontraron resistencia al estrés oxidativo en diferentes tejidos sometidos a tratamientos de hibernación, despertar y no hibernación. Los autores documentaron un aumento en los niveles de óxido nítrico (NOx) en el cerebro en los individuos que se encontraban en hibernación, lo que indica que durante la hibernación se generan altas concentraciones de sustancias reactivas al oxígeno entre ellas óxido nítrico (NOx) que están relacionadas con la inflamación de los tejidos (Zhou et al., 2001).

El conocimiento que tenemos del estrés oxidativo durante la hibernación proviene mayoritariamente de estudios en mamíferos placentados y es escasa la información que existe en marsupiales. (Buzadzic et al., 1997; Shaeffer et al., 2003; Page et al., 2009; Careau et al., 2013; Franco et al., 2013; Avci et al., 2014). En estos últimos sólo se ha evaluado el estrés oxidativo en estado silvestre (Whittington et al., 1995; Shaeffer et al., 2003; Franco et al., 2013), lo que ha impedido establecer generalizaciones al respecto. Más aún, resulta interesante que los marsupiales sudamericanos presenten estrategias

fisiológicas como el sopor e hibernación aun cuando estos generalmente habitan en ambientes con fluctuaciones de temperatura y disponibilidad de alimento menos extremas que sus contrapartes nórdicos (Buzadzic et al., 1997; Avci et al., 2014). Esta tesis pretende abordar este tema, evaluando si las respuestas y capacidades antioxidantes de marsupiales sudamericanos son comunes a los presentados. Paralelamente, se desconoce si las especies que realizan sopor diario presentan respuestas similares a un animal que realiza hibernación. Para responder a estas interrogantes se propuso evaluar la preparación hibernal mediante la defensas antioxidantes en uno de los únicos marsupiales hibernante de Chile, el Monito del Monte, *Dromiciops gliroides* (Bozinovic et al., 2004; Franco et al., 2012; Ruf y Geiser, 2015). Además, para comprender si los mecanismos de respuesta son similares entre animales que poseen estrategias de sopor diferente (diario y estacional), se analizará la respuesta de protección oxidativa de la Yaca, *Thylamys elegans*, un marsupial que realiza sopor diario (Bozinovic et al., 2005). Se Comparará enzimas relacionadas al estrés oxidativo, siguiendo un diseño experimental mediante aclimatación térmica que permita inducir a los individuos de ambas especies a presentar sopor y actividad. Con los antecedentes ya expuestos se predice que los i) individuos en un letargo metabólico presentarán mayores defensas antioxidantes que las protegerá de un daño oxidativo en relación a individuos activos y ii) se espera que aquellos individuos que realizan hibernación presentan mayores concentraciones de antioxidantes que aquellos que realizan sopor diario. En resumen, el propósito de esta tesis fue evaluar la preparación antioxidante de dos marsupiales sudamericanos, de los cuales uno de ellos realiza hibernación y otro sopor diario.

2. HIPÓTESIS

Dado que en el proceso de recalentamiento durante el despertar de la hibernación, el oxígeno ingresa bruscamente a las células generando especies reactivas y radicales libres, se espera que marsupiales hibernantes disminuyan el daño celular por estrés oxidativo, mediante la producción de defensas antioxidantes de origen enzimático. Dado este escenario se espera encontrar una diferencia de la actividad total de antioxidantes de los tejidos durante el sopor al ser comparados con los tejidos en actividad. Del mismo modo, se espera encontrar que la hibernación debería ser una estrategia que presente mayor defensa antioxidante a través de mayores niveles basales y/o mayor respuesta al estrés térmico, al ser comparado con un estado de sopor diario. Esto sería un mecanismo compensatorio que permite a los organismos que realizan un abandono de la endotermia por varios días y evitar el daño por estrés oxidativo a nivel celular y molecular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Comparar las defensas antioxidantes durante el estado de letargo energético y la actividad en dos especies de marsupiales que presentan estrategias de ahorro de energía diferente: sopor diurno e hibernación.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Evaluar diferencias de defensas antioxidantes en animales en sopor y/o hibernación y actividad.
- b) Estimar si existe una variación de las variables antioxidantes en los tejidos evaluados de las dos especies de marsupiales aclimatados a dos regímenes térmicos.

4. METODOLOGÍA

4.1. Modelo de estudio

Dromiciops gliroides tiene un rango de distribución que comprende desde la Región de los Ríos hasta Chiloé en Chile, y en el sector de Neuquén en Argentina (D'Elía et al., 2016). Esta especie habita en el bosque templado lluvioso (Quijano, 2008; Cortes et al., 2011; Franco et al., 2011) y ha sido descrito como el único marsupial hibernante de Sudamérica (Bozinovic et al., 2004). Además estudios recientes demuestran que presenta sopor diario incluso en el periodo estival (Nespolo et al., 2010; Ruf y Geiser, 2014).

Thylamys elegans presenta una distribución desde la zona costera del sur de Perú (10° S) hasta el valle central de Chile (37° S río Bío-Bío), habitando en biomas abiertos y secos (Meyhnard et al., 2002). Esta especie realiza sopor diario en ausencia de alimento, la cual sería una respuesta flexible y oportunista a la variabilidad del ambiente (Sabat et al., 1993; Sabat y Bozinovic, 1994; Sabat et al., 1995; Opazo et al., 1999; Nespolo et al., 2002; Bozinovic et al., 2005)

4.2. Captura de Individuos.

Doce individuos de *D. gliroides* fueron capturados utilizando trampas Tomahawk, cebadas con banana en el sitio experimental San Martín, dependiente del Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Universidad Austral de Chile, ubicado en Valdivia (39°38'S y 73°07'O). Las trampas fueron protegidas con una bolsa plástica para evitar la exposición de lluvia al animal capturado. Dentro de la trampa se dispuso algodón sintético que le sirvió de refugio durante el período de captura. A primera hora de la mañana se procedió a revisar las trampas y cada animal capturado fue clasificado como juvenil o adulto. Posteriormente, los animales fueron trasladados al Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas de la Universidad Austral donde fueron mantenidos a condiciones ambientales a 25°C con fotoperiodo 12:12, con agua y alimentación *ad-libitum* que consistía en larvas de *Tenebrio molitor* y manzana, previo a las aclimataciones.

Doce individuos de *T. elegans* se capturaron en Quebrada de la Plata (33° 30S, 70° 54O, Universidad de Chile). Se utilizaron trampas Sherman, las cuales fueron ubicadas bajo los arbustos y cercanos a rocas. El cebo utilizado en las trampas fue una mezcla de banana con atún y avena. Al igual que el muestreo de *D. gliroides* a cada trampa se le incluyó algodón para la protección. Los individuos de *T. elegans* fueron llevados de inmediato al Laboratorio de Ecofisiología Animal de la Universidad de Chile, fueron mantenidos en condiciones ambientales de 25°C y fotoperiodo 12:12 y alimentación *ad-libitum* que consistía en larvas de *Tenebrio molitor* y manzana previa a la aclimatación.

4.3. Aclimatación térmica

Una vez concluido un periodo de habituación a las condiciones de cautividad por 10 días, para cada especie, los individuos fueron pesados y separados en dos tratamientos experimentales con seis individuos cada uno, de manera aleatoria, pero cuidando de que en cada tratamiento hubiesen 3 machos y 3 hembras. Las masas al inicio fueron estadísticamente similares entre tratamientos para cada especie (véase Tabla 2, Figura 1). De este modo, seis individuos de cada especie fueron aclimatados en el tratamiento "actividad", el que consistió en mantener a los individuos a una temperatura ambiental de 25 ± 1 °C con un fotoperiodo L:D 12:12. Por otro lado, seis individuos de cada especie fueron aclimatados al tratamiento "sopor", mantenidos a temperatura ambiente de 10 ± 1 °C y con un fotoperiodo L:D 12:12 (Tabla 1). Para ambos tratamientos, los individuos fueron mantenidos en cajas individuales de 22 l (44 x 28 x 22cm), en las que se dejaba tubos de cartón, musgo y viruta, para que la construcción de refugio y los animales fueron alimentados *ad libitum* con larvas de *Tenebrio molitor*, manzana y agua. Para corroborar si los individuos se encontraban en sopor, se realizaron observaciones directas dos veces al día y si estos se encontraban en la posición típica de los mamíferos hibernantes, es decir posición fetal, con las orejas plegadas y cabeza cercana al abdomen, se registró el tiempo en que el animal estuvo en sopor. No se realizó una medición de la temperatura corporal, para no producir una interrupción del periodo de sopor.

Tabla 1. Resumen de la aclimatación térmica realizada para *Dromiciops gliroides* y *Thylamys elegans*.

	Tratamiento Sopor Ta: 10 ± 1 °C Fotoperiodo 12L:12D	Tratamiento Activo Ta: 25 ± 1 °C Fotoperiodo 12L:12D
<i>Dromiciops gliroides</i>	♂ ♂ ♂ ♀ ♀ ♀ n=6	♂ ♂ ♂ ♀ ♀ ♀ n=6
<i>Thylamys elegans</i>	♂ ♂ ♂ ♀ ♀ ♀ n=6	♂ ♂ ♂ ♀ ♀ ♀ n=6

4.4. Preparación de muestras.

Luego de 21 días de aclimatación térmica, los animales fueron eutanasiados e inmediatamente fue extraído el hígado y el músculo de las extremidades inferiores. Los tejidos fueron pesados y almacenados a -70°C. Para el análisis de los niveles de antioxidantes, muestras de tejido fueron descongeladas, pesadas y homogeneizadas en *buffers* adecuados para cada kit comercial en un homogenizador Ultra Turrax a 12.000 rpm en hielo. Los homogenizados fueron centrifugados a 4°C y a revoluciones variables, dependiendo de los tejidos y los requerimientos específicos de cada determinación. El sobrenadante fue retirado y almacenado para las posteriores determinaciones espectrofotométricas de estrés oxidativo mediante los kits comerciales (BioVisión, Sigma-Aldrich y Fermelo). La tabla 2 presenta un resumen de los parámetros evaluados y sus respectivas funciones.



Tabla 2. Resumen de las variables a analizar en los homogeneizados de tejidos de animales aclimatados a distintos tratamientos térmicos.

Muestra	Función
Superóxido Dismutasa (SOD) Kit Sigma-Aldrich	Cataliza la dismutación de anion superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). El porcentaje de reducción con un anión superóxido está linealmente relacionada con la actividad de la xantina oxidasa (XO), y es inhibida por SOD. La actividad de inhibición de SOD, es determinada por el método de colorimetría
Nitrato Total (NT) Kit Fermelo	Es un mensajero biológico muy versátil en los sistemas biológicos, es un mediador de enfermedades vasculares, inflamación y cáncer. Pero el rol más importante es la activación de la guanilato ciclasa. Este ensayo tiene dos etapas primero es la reducción de nitrato a (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) por la nitrato reductasa luego el nitrato total es detectado por los reactivo de Griess y el producto final es determinado por absorbancia
Glutación Total (GSH) Kit Fermelo (<i>D. gliroides</i>) Kit	Encargada en la remoción de hidroperóxidos y mantiene el estado de oxidación de proteínas sulfhídricas. En este ensayo la enzima glutación reductasa reduce glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH) en presencia de NADPH. Posteriormente, un cromógeno reacciona con el grupo tiol de GSH para

BioVision (<i>T.elegans</i>)	producir un compuesto coloreado que absorbe a 405 nm, mediante espectrofotometría.
Peroxidación Lipídica, (TBARS) Kit Fermelo	Los lípidos con mayor grado insaturación, son más sensibles a la peroxidación de lípidos, que causa un estrés y daño fisiopatológicos. Para evaluar el estrés oxidativo se evalúan productos finales de la peroxidación lipídica como; malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE). Este ensayo permite evaluar la reacción de malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), que forman el aducto MDA-TBA, el cual es cuantificado mediante colorimetría.
Capacidad Antioxidante Total (TAC) Kit Sigma- Aldrich	Bajo condiciones fisiológicas normales la generación de ROS está contrarrestada por la acción de agentes antioxidantes, las cuales pueden ser enzimas o micro y macro moléculas, que se ubican transitoriamente en diferentes tejidos y células. El ensayo consiste en la formación de radical ferril mioglobina a partir de la reacción de metilbioglobina con peróxido de hidrógeno. Este radical (ferril mioglobina) reacciona con ABTS, produciendo un catión radical que es el que se determina mediante espectrofotometría.

4.5. Análisis estadísticos

Para evaluar la normalidad de los datos se procedió a realizar un test Shapiro-Wilk; si la distribución no se ajustó a la normalidad, se procedió a transformar por log 10. Para evaluar la homogeneidad de varianzas se realizó un Levene test.

Se realizó un análisis de varianza factorial utilizando como factores fijos el tratamiento térmico con dos niveles (sopor y actividad) y el factor fijo sexo con dos niveles, macho y hembra. Se realizó este análisis para los dos tejidos evaluados (hígado y músculo) y en ambas especies *T. elegans* y *D. gliroides*.

La variación temporal de la masa corporal por especie, se analizó mediante un análisis de varianza de medidas repetidas (RM ANOVA), donde el factor fijo a evaluar fue el tratamiento térmico (activo y sopor) y la masa al inicio y el final de la aclimatación, como medidas repetidas.

Todos los análisis fueron realizados mediante el programa Statistica 7 (StatSoft, <http://www.statsoft.com>) y los gráficos mediante el programa SigmaPlot versión 10.0.

5. RESULTADOS

5.1 Variación masa corporal

Al inicio de la aclimatación la masa corporal no presentó diferencias significativas entre los tratamientos experimentales en ambas especies (Tabla 3). Sin embargo, al final de la aclimatación los individuos de *T. elegans* presentaron diferencias producto del tratamiento térmico, siendo los individuos del tratamiento Activo los que presentaron un aumento en la masa corporal (RM ANOVA $F_{1,10}=9,57$ $p=0,01$). Esta variación también se vio reflejada en el tiempo, debido a que los individuos del tratamiento Activo de *T. elegans* aumentaron su masa corporal al final de la aclimatación (RM ANOVA $F_{1,10}=5,69$ $p=0,04$).

En los individuos de *D. gliroides* no se observó diferencias significativas en la masa corporal en el tiempo (RM ANOVA $F_{1,10}=1,39$ $p=0,27$). Del mismo modo, este cambio no ve reflejado en los tratamientos térmicos a lo largo del tiempo (RM ANOVA $F_{1,10}=3,04$, $p=0,11$) (Figura 1)

Tabla 3. Descripción de masas corporales de individuos de *Thylamys elegans* y *Dromiciops gliroides* al inicio de la aclimatación. Para ambas especies no hubo diferencias estadísticas al inicio del tratamiento.

Especie	Tratamiento	n	Promedio ± Error estándar	Máx.-Min
<i>Thylamys elegans</i>	Activo	n=3	24,70 ± 1,19	28,58-21,20
	Sopor	n=3	24,62 ± 0,69	27,60-22,70
<i>Dromiciops gliroides</i>	Activo	n=3	27,57 ± 4,66	42,97-17,25
	Sopor	n=3	27,47 ± 4,20	45,63-18,36

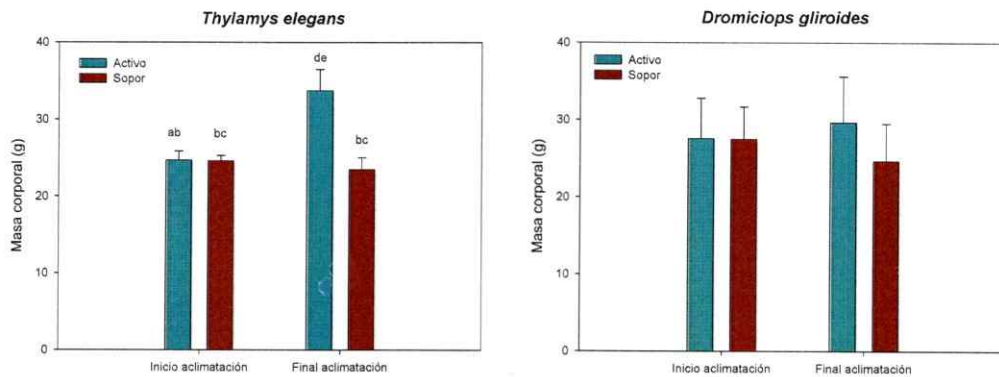


Fig.1. Variación temporal de la masa corporal en individuos de *Thylamys elegans* y *Dromiciops gliroides* aclimatados a diferentes tratamientos térmicos. Las barras muestran medias ± EE.

5.2 Estrés oxidativo en *Dromiciops gliroides*

Los antioxidantes totales evaluados en el tejido hepático de *D. gliroides* no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras (ANOVA $F_{1,8}=1,39$ $p=0,27$). De igual forma el tratamiento térmico no tuvo un efecto sobre esta actividad (ANOVA $F_{1,8}=0,22$, $p=0,65$) y la interacción tampoco evidenció diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $F_{1,8}=0,94$; $p=0,36$) (Figura 2).

La actividad de antioxidantes totales en los individuos de *D. gliroides* en el tejido muscular no presentó diferencias entre sexos (ANOVA $F_{1,8}<0,001$; $p=0,96$), o entre los tratamientos experimentales (ANOVA $F_{1,8}=0,25$; $p=0,63$). Del mismo modo, la interacción entre estos factores tampoco evidenció un efecto estadísticamente significativo (ANOVA $F_{1,8}=2,13$; $p=0,18$) (Figura 2).

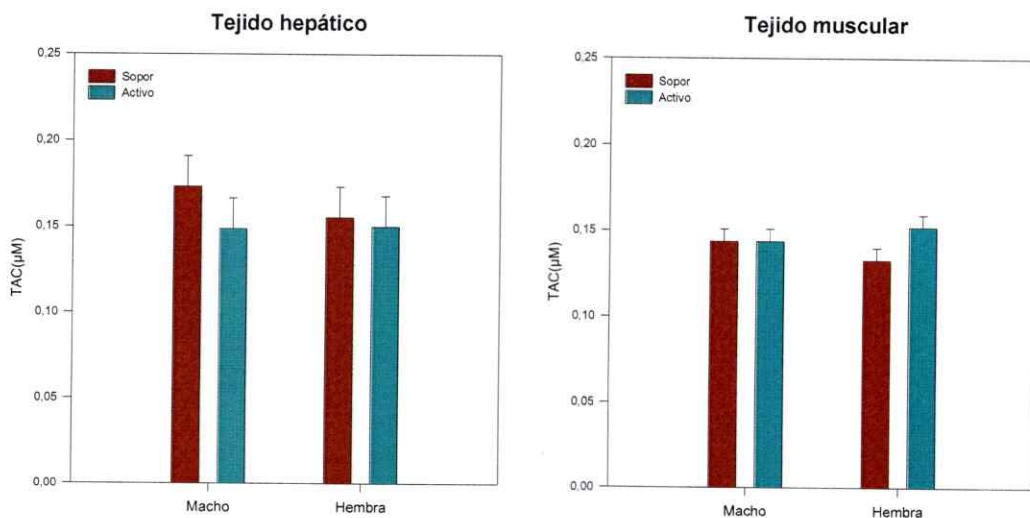


Fig. 2. Concentración de antioxidantes totales de individuos de *D. gliroides* evaluadas en tejido hepático y muscular, bajo dos tratamientos térmicos. Se grafica las medias \pm EE.

Los niveles de peroxidación lipídica en el tejido hepático en los individuos de *D. gliroides* no presentó diferencias entre sexos (ANOVA $F_{1,8}=0,00$; $p=0,99$) ni entre los tratamientos de aclimatación térmica (ANOVA $F_{1,8}=1,60$; $p=0,24$). Sin embargo, se pudo apreciar una tendencia en la interacción entre los factores evaluados; los machos en sopor presentan mayor peroxidación lipídica que sus respectivos en actividad y las hembras presentan concentraciones similares de este ensayo (Fig. 3, ANOVA $F_{1,8}=4,30$; $p=0,07$).

Al evaluar la peroxidación lipídica en el tejido muscular de individuos de *D. gliroides* no se encontró efecto del sexo (ANOVA $F_{1,8}=0,08$ $p=0,79$), ni del tratamiento térmico (ANOVA $F_{1,8}=0,17$ $p=0,69$). Del mismo modo la interacción entre estos factores no fue estadísticamente significativa (Figura 3. ANOVA $F_{1,8}=1,06$ $p=0,33$).

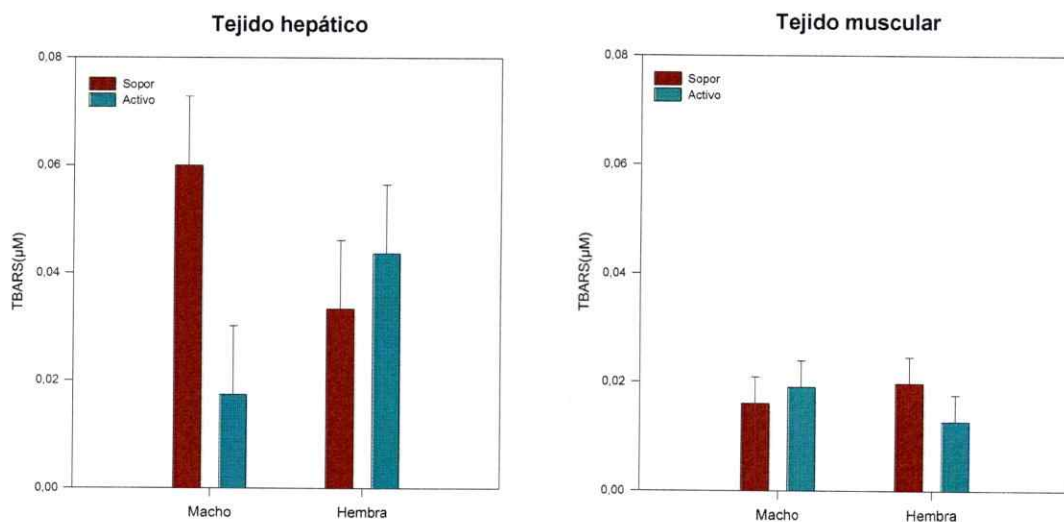


Fig. 3. Valores de los en ensayo de TBARS en individuos de *Dromiciops gliroides* evaluados en tejido hepático y muscular. Se grafican las medias \pm EE.

En el tejido hepático también evaluamos el nitrato total. No hubo diferencias entre machos y hembras (ANOVA $F_{1,8}=0,62$ $p=0,45$), ni del tratamiento térmico (ANOVA $F_{1,8}=0,10$ $p=0,76$). Del mismo modo, la interacción de estos factores no presentó diferencias estadísticas (ANOVA $F_{1,8}=0,14$ $p=0,72$) (Figura 4).

Los valores de nitrato total evaluadas en *D. gliroides* en el tejido muscular no evidenciaron diferencias significativas entre el sexo (ANOVA $F_{1,8}=0,16$ $p=0,70$). Del mismo modo, no se encontró diferencias por parte de los tratamientos térmicos (ANOVA $F_{1,8}=0,03$ $p=0,86$), ni de la interacción entre los factores (ANOVA $F_{1,8}=0,00$ $p=0,95$) (Figura 4).

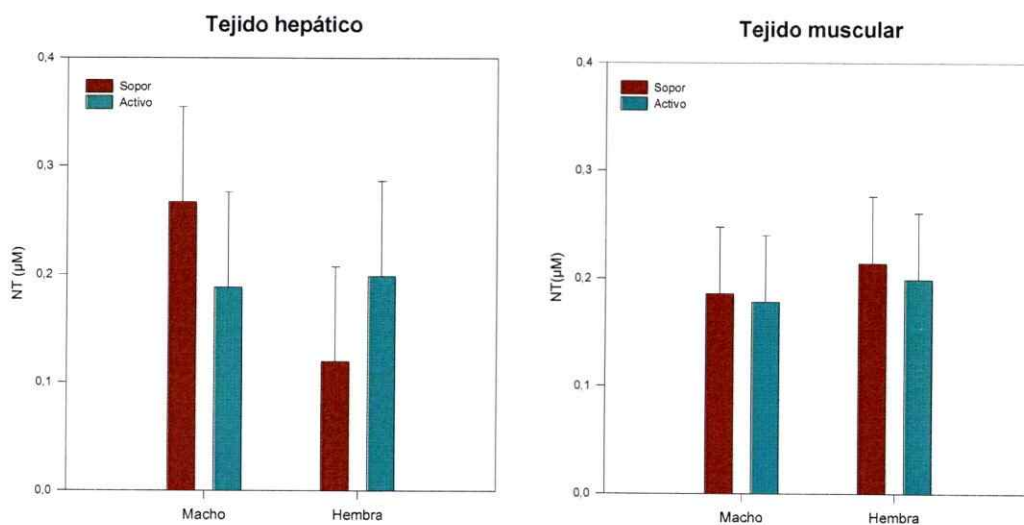


Fig.4. Concentración de nitrato total evaluada en tejido hepático y muscular de individuos de *D. gliroides*, bajo distintos tratamientos térmicos. Las barras presentan las medias \pm EE.

La evaluación del antioxidante superóxido dismutasa (SOD) en el tejido hepático de los individuos de *D. gliroides* no arrojó diferencias entre machos y hembras (ANOVA $F_{1,8}=0,20$ $p=0,66$), y tampoco se evidenció un efecto de los tratamientos térmicos (ANOVA $F_{1,8}=1,29$ $p=0,29$). Y la interacción de estos factores evidenció una tendencia, los individuos del sexo masculino en condiciones de actividad presentaron mayor porcentaje de inhibición que los individuos del mismo género en sopor. (Fig. 5. ANOVA $F_{1,8}=4,60$ $p=0,06$).

En el tejido muscular de los individuos de *D. gliroides* los valores de porcentaje de inhibición de superóxido dismutasa no evidenciaron diferencias por el sexo (ANOVA $F_{1,8}=0,21$ $p=0,66$), así también presentan respuestas similares entre sopor y actividad (ANOVA $F_{1,8}=0,11$ $p=0,74$). Del mismo modo no hubo un efecto de la interacción de estos factores (ANOVA $F_{1,8}=0,83$ $p=0,39$) (Fig.5).

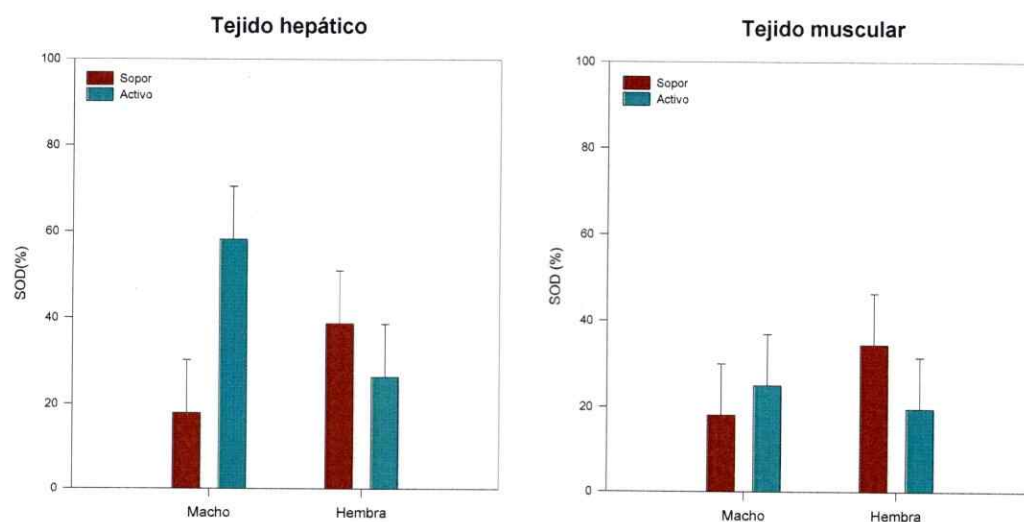


Fig.5. Porcentaje de inhibición del antioxidante superóxido dismutasa, evaluado en tejido hepático y muscular en individuos de *D. gliroides*. Las barras presentan las medias \pm EE.

El glutatión total evaluado en el tejido hepático de *D. gliroides* no presentó diferencias entre sexos (ANOVA $F_{1,8}=0,66$ $p=0,44$), como tampoco entre los tratamientos experimentales (ANOVA $F_{1,8}=1,78$ $p=0,22$). Del mismo modo, no hubo efecto de la interacción de estos factores (ANOVA $F_{1,8}=0,12$ $p=0,74$).

La evaluación de la actividad de glutatión en el tejido muscular de individuos de *D. gliroides* no reveló diferencias significativas entre sexos (ANOVA $F_{1,8}=1,90$ $p=0,21$), pero si hubo diferencias entre individuos activos y en sopor, donde estos últimos presentaban concentraciones hasta dos veces lo encontrado en los individuos activos. (Fig.6, ANOVA $F_{1,8}=21,54$ $p=0,002$). La interacción de estos factores no fue estadísticamente significativa (ANOVA $F_{1,8}=1,04$ $p=0,34$).

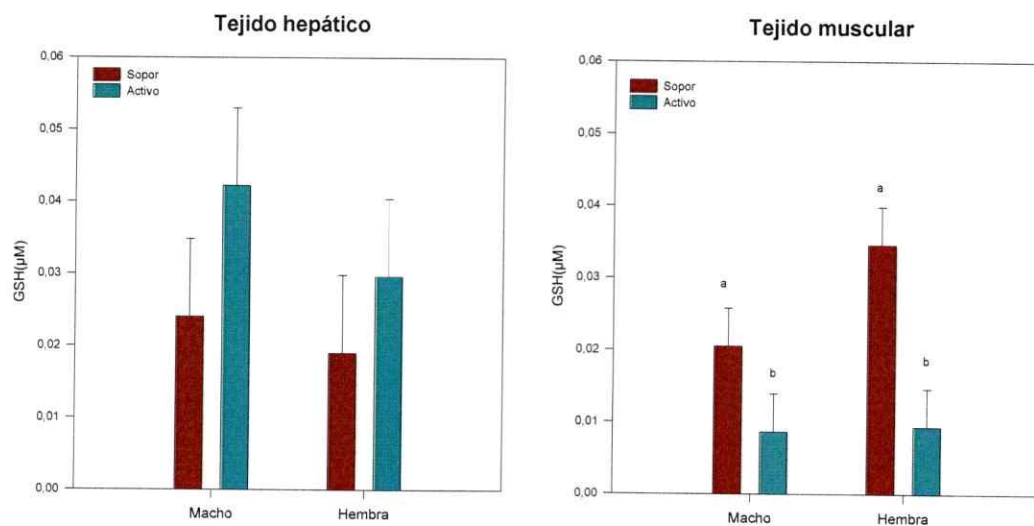


Fig.6 Concentración de glutatión total evaluados en tejido hepático y muscular en individuos de la especie *D. gliroides*. Las barras indican medias \pm EE y las letras muestran las diferencias de este antioxidante en los tratamientos térmicos (Sopor y Activo).

Tabla 4. Resumen de las variables evaluadas en *D. gliroides*. En la tabla se expresan los valores máximos y mínimos evaluados y el promedio, junto con el error estándar en cada tejido evaluado para esta especie.

<i>Dromictops gliroides</i>		Tejido hepático		Tejido muscular		
Variable	N	Max-Min	Promedio±EE	N	Max-Min	Promedio±EE
Antioxidantes Totales (µM)	12	0,202-0,108	0,157 ± 0,008	12	0,165-0,113	0,143± 0,003
TBARS (µM)	12	0,0810-0,003	0,0386 ± 0,007	12	0,0310-0,007	0,0168±0,002
Nitrato Total (µM)	12	0,549-0,066	0,193 ± 0,040	12	0,359-0,073	0,194±0,026
Superóxido (%) Dismutasa	12	90,926-9,074	35,280 ± 6,945	12	63,368-2,526	24,271±5,438
Glutación total (µM)	12	0,0632-0,004	0,0287 ± 0,005	12	0,0473-0,006	0,0183±0,003

5.3 Estrés oxidativo en *Thylamys elegans*

Los valores de antioxidantes totales analizados el tejido hepático de los individuos de *Thylamys elegans* evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras. Los machos presentaron valores más altos que las hembras (ANOVA $F_{1,8}=7,08$ $p=0,03$). El ANOVA reveló que existe una tendencia al aumento de los niveles de antioxidantes totales en los individuos activos en comparación a los individuos en sopor (ANOVA $F_{1,8}=4,99$ $p=0,06$). No se encontró un efecto significativo de la interacción entre ambos factores (ANOVA $F_{1,8}=0,02$ $p=0,90$) (Figura 7).

Los antioxidantes totales evaluados en el tejido muscular de los individuos de *T. elegans* no presentaron diferencias entre machos y hembras (ANOVA $F_{1,8}=0,53$ $p=0,49$), ni entre los tratamientos térmicos, aun cuando se pudo observar una tendencia al aumento en el grupo de animales activos en comparación al sopor (ANOVA $F_{1,8}=0,45$ $p=0,07$, Figura 7). No se encontró un efecto significativo de la interacción entre factores (ANOVA $F_{1,8}=1,50$ $p=0,26$).

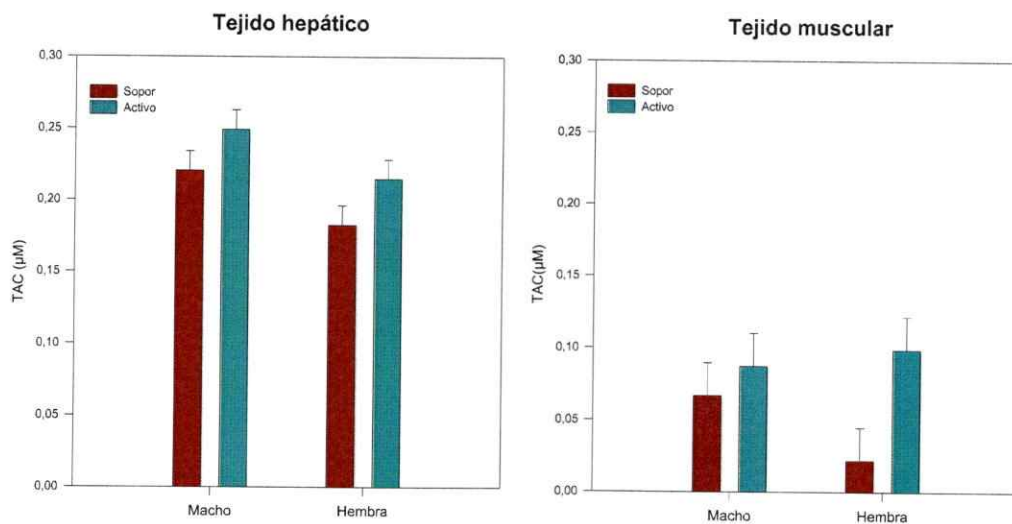


Fig. 7. Antioxidantes totales evaluados en tejido hepático y muscular en el marsupial *T. elegans*. Las letras en el tejido hepático evidencian diferencias entre machos y hembras. Datos muestran medias \pm E.E.

Al evaluar la peroxidación lipídica en tejido hepático de *T. elegans* no se encontró diferencias entre sexos (ANOVA $F_{1,8}=0,67$ $p=0,44$), como tampoco entre los tratamientos experimentales (ANOVA $F_{1,8}=0,55$ $p=0,48$). Del mismo modo, la interacción de estos factores no fue significativa (ANOVA $F_{1,8}=0,05$ $p=0,83$) (Figura 8).

Las concentraciones indicadoras de la peroxidación lipídica en el tejido muscular de los individuos de *T. elegans* no presentaron diferencias entre sexos (ANOVA $F_{1,8}=1,54$ $p=0,25$), ni del tratamiento térmico (ANOVA $F_{1,8}=1,09$ $p=0,33$). No se encontró un efecto significativo entre ambos factores (ANOVA $F_{1,8}=0,84$ $p=0,39$) (Figura 8).

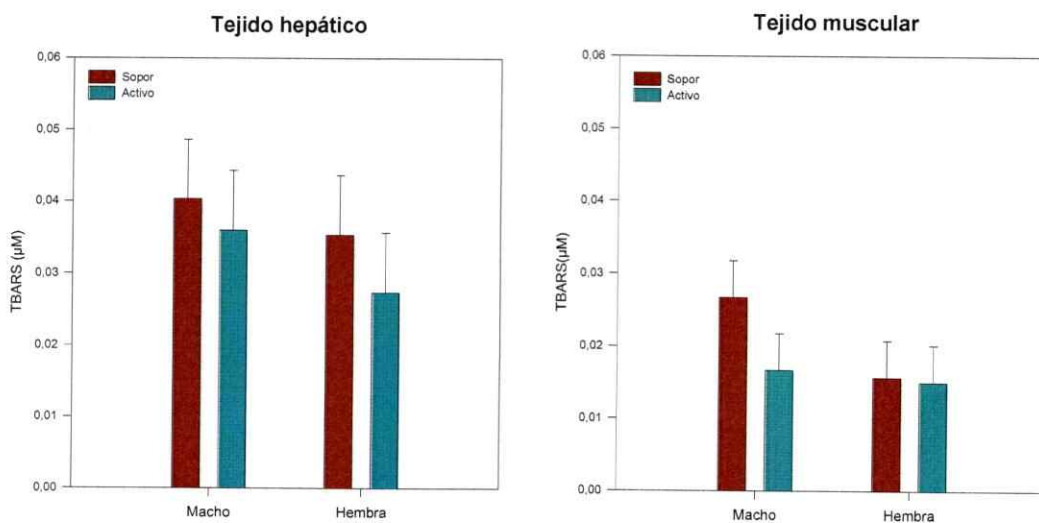


Fig.8. Valores del ensayo TBARS de tejido hepático y muscular, en individuos aclimatados a diferentes tratamientos térmicos en de la especie *T. elegans*. Datos muestran medias \pm EE.

El nitrato total (NT) evaluado en individuos de *T. elegans* en el tejido hepático no presentó diferencias significativas entre sexos, aunque si se puede observar una tendencia en el aumento de NT en los machos en comparación a las hembras (ANOVA $F_{1,8}=4,51e-7$ $p=0,07$), como tampoco entre los tratamientos térmicos, aun cuando existe una tendencia hacia un aumento en los individuos en el tratamiento en sopor al ser comparados con los individuos activos (ANOVA $F_{1,8}=4,92$ $p=0,06$. Figura 9). La interacción de estos factores no fue significativa (ANOVA $F_{1,8}=0,87$ $p=0,38$).

Los niveles de NT del tejido muscular de los individuos de *T. elegans* no fueron afectados por el sexo (ANOVA $F_{1,8}=2,98$ $p=0,12$), el tratamiento experimental (ANOVA $F_{1,8}=3,86$ $p=0,09$) ni por la interacción de estos factores (Fig. 9, ANOVA $F_{1,8}=1,71$ $p=0,23$).

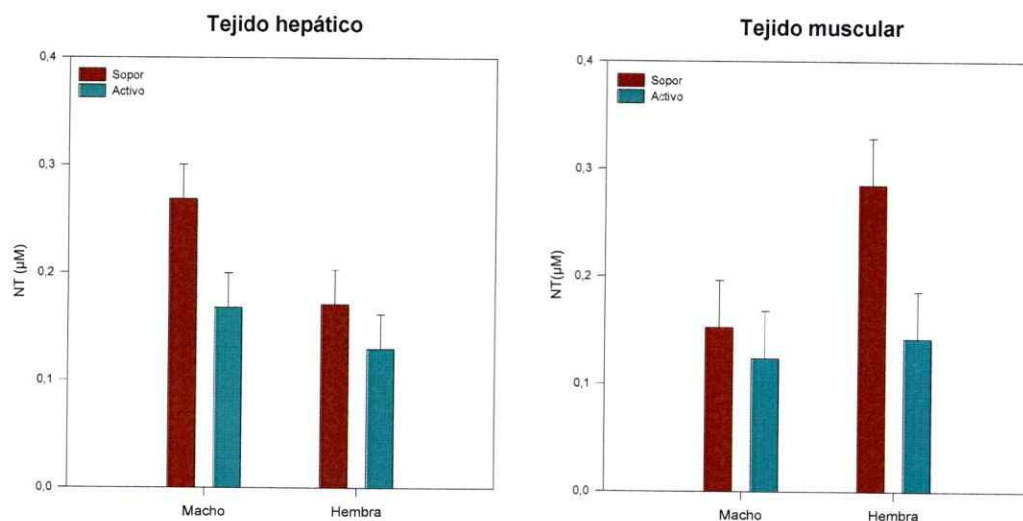


Fig.9. Valores promedios del ensayo nitrato total en diferentes tejidos analizados en la especie *T. elegans*. Las barras muestran media \pm EE.

Los niveles de SOD del tejido hepático de individuos de *T. elegans*, no presentó un efecto del sexo (ANOVA $F_{1,8}=0,27$ $p=0,62$) ni del tratamiento térmico (ANOVA $F_{1,8}=0,97$ $p=0,35$). Sin embargo, se encontró un efecto significativo en la interacción de estos factores. En sopor los machos presentaron valores menores que las hembras y por el contrario, en los individuos del tratamiento activo, los machos presentaron valores mayores que las hembras (Fig. 10, ANOVA $F_{1,8}=22,68$ $p=0,001$). Asimismo, los niveles de SOD en el tejido muscular no fueron afectados por el sexo (ANOVA $F_{1,8}=1,96$ $p=0,20$), el tratamiento experimental (ANOVA $F_{1,8}=0,67$ $p=0,44$) o la interacción entre ambos factores (ANOVA $F_{1,8}=0,50$ $p=0,50$) (Figura 10).

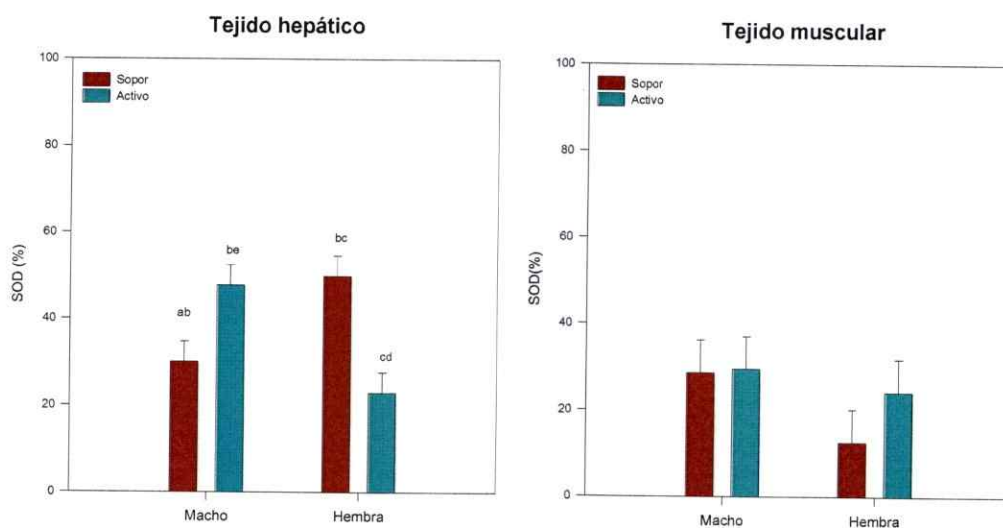


Fig.10. Porcentaje de inhibición de SOD en tejido hepático y muscular evaluado en *T. elegans*. Las letras evidencian una interacción entre los factores en el tejido hepático. Se presentan las medias \pm EE.

La concentración de glutatión total (GSH) evaluado en el tejido hepático de los individuos de *T. elegans* no presentó diferencias significativas entre sexos (ANOVA $F_{1,8}=0,00$ $p=0,95$) y tampoco hubo diferencias debidas al tratamiento térmico (ANOVA $F_{1,8}=0,00$; $p=0,99$). No se encontró un efecto significativo de la interacción (Fig.11, ANOVA $F_{1,8}=0,13$ $p=0,73$). El análisis realizado para la concentración de GSH en el tejido muscular no evidenció diferencias entre machos y hembras (ANOVA $F_{1,8}=0,00$ $p=0,95$). Por último, no se encontraron deferencias entre tratamientos experimentales, pero si una tendencia, donde los individuos activos presentaron una tendencia a concentraciones mayores de GSH que los individuos en sopor (ANOVA $F_{1,8}=4,46$ $p=0,07$). La interacción entre Sexo x Tratamiento no fue significativa (ANOVA $F_{1,8}=0,28$ $p=0,61$) (Figura 11).

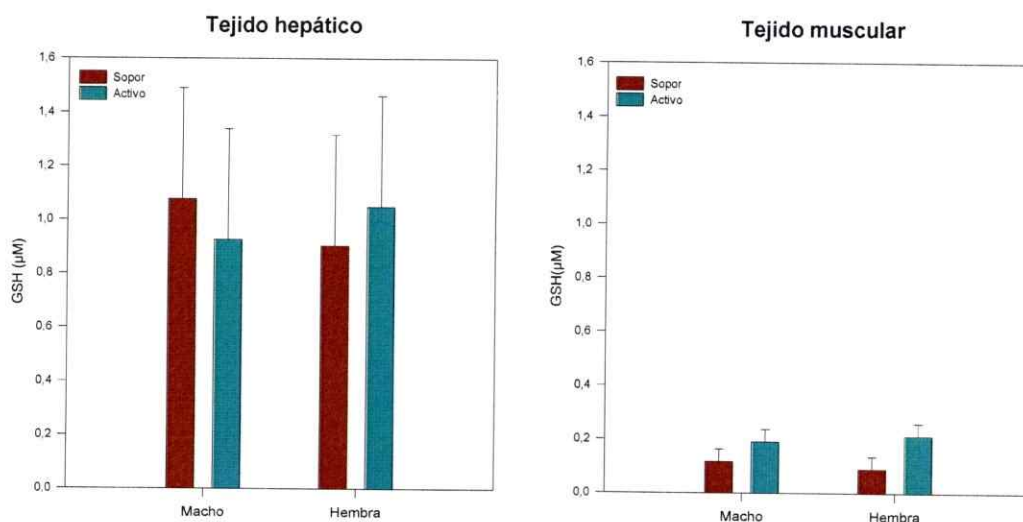


Fig. 11. Concentración de glutatión total evaluados en tejido hepático y muscular en el marsupial *T. elegans*. Se presentan los datos como media \pm EE.

Tabla 5. Resumen de las variables evaluadas en la especie *T. elegans*. En la tabla se expresan los valores máximos y mínimos evaluados y el promedio, junto con el error estándar en cada tejido evaluado para esta especie.

<i>Thylamys elegans</i>		Tejido hepático		Tejido muscular		
Variable	N	Max-Min	Promedio±EE	N	Max-Min	Promedio±EE
Antioxidantes Totales (µM)	12	0,277-0,180	0,217 ± 0,009	12	0,141-0,002	0,0685± 0,013
TBARS (µM)	12	0,052-0,012	0,0347 ± 0,003	12	0,037-0,009	0,0185±0,002
Nitrato Total (µM)	12	0,299-0,059	0,184 ± 0,020	12	0,368-0,046	0,176±0,026
Superóxido Dismutasa (%)	12	61,343-17,143	37,650 ± 3,998	12	43,013-5,556	23,630±3,820
Glutación total (µM)	12	1,872-0,099	0,988 ± 0,178	12	0,262-0,032	0,152±0,025

6. DISCUSIÓN

En esta tesis se evaluó en qué medida dos especies de marsupiales que presentan distintos estados de letargo metabólico presentan diferencias en la preparación antioxidante. La predicción general fue que individuos que entran en hibernación deberían presentar mayores concentraciones de antioxidantes que un sopor diario. Por otro lado, si los individuos poseen una respuesta general en cuanto a su preparación antioxidante, los diferentes tejidos debieran responder de manera similar, tanto en la protección como en el daño oxidativo. Los resultados indican de manera general que las respuestas de protección antioxidante en ambas especies es un mecanismo más bien específico que global. La estructura de esta sección será primero discutir los efectos del tratamiento experimental sobre la protección antioxidante y las defensas entre los diferentes tejidos analizados en ambas especies. Luego, esta discusión se centrará en evaluar cuál es el daño oxidativo que presentan estas dos especies, posterior a una exposición crítica al frío. Por último, se mencionarán algunas de las proyecciones que surgen de esta tesis, tal como la necesidad de comprender la dinámica de cambios en las actividades de antioxidantes a nivel tisular en las distintas etapas del letargo metabólico.

6.1 Protección antioxidante

Las reacciones metabólicas generan desechos que pueden ser sustancias reactivas al oxígeno (ROS), tales como superóxido, peróxido de hidrógeno o radical hidroxilo (Storey, 1996). A su vez, estas sustancias pueden generar una serie de reacciones en cadena que modifican químicamente otras moléculas, alternando aminoácidos específicos en algunas proteínas, permitiendo cambios conformacionales o rompiendo hebras de ácido desoxirribonucleico (DNA) y desencadenando mutaciones puntuales (Venereo, 2002; Pamplona y Constantini, 2011). Sin embargo, frente a estos ROS existen un sistema de defensas antioxidantes que tienen por función retrasar o prevenir el daño oxidativo. Así, los antioxidantes se encuentran en equilibrio con la formación de ROS (Storey, 1996).

Estas defensas por un lado pueden ser de origen exógeno como el ácido úrico y vitaminas E y C, las cuales pueden ser incluidas mediante la dieta. Diversos estudios han evaluado la concentración de antioxidantes en diversas condiciones (e.g; exposición crónica al frío, exposición a rayos UV, diferentes fases en el letargo metabólico y animales en estado silvestre) tanto en vertebrados (Wilhelm Filho et al., 2007; Reguera et al., 2014), como invertebrados (Giraud-Billoud et al., 2013) e incluso en plantas (Agati et al., 2013). Por ejemplo Schneeberger y col. (2014), demostraron que la variación en la dieta natural de murciélagos neotropicales se asocia a diferencias en el consumo de antioxidantes, lo que a su vez se traduce en una mayor protección de antioxidantes y bajos niveles de estrés oxidativo en las especies frugívoras. Este y otros estudios (Frank et al., 1998; Venkatraman et al., 1998; Beaulieu & Constantini 2014), nos indican la importancia de la

incorporación de antioxidantes de manera exógena y de su rol en la disminución del estrés oxidativo.

Por otro lado, y como se mencionó, las defensas antioxidantes pueden ser de origen endógeno (Storey, 1996; Venereo, 2002). Esta tesis se centró en la respuesta endógena y el posible daño oxidativo como consecuencia del letargo metabólico en dos especies de marsupiales sudamericanos que manifiestan una depresión metabólica, cuando las temperaturas ambientales y la disponibilidad de alimento disminuye (Bozinovic et al., 2004; Bozinovic et al., 2005). En este sentido, Budazic y col. (1990) fueron unos de los pioneros en proponer que durante el recalentamiento del letargo metabólico, que involucra un ingreso abrupto de oxígeno a nivel tisular, sería esperable prevenir o disminuir la afinidad de los radicales libres mediante la acción de agentes antioxidantes. Los resultados del presente indican que los individuos de las especies analizadas presentan defensas antioxidantes en los tejidos evaluados (Véase Tabla 4 y 5). También se encontró que los tejidos analizados tanto en *T. elegans* como *D. gliroides* presentan diferentes concentraciones de antioxidantes. En general, el tejido hepático presentó mayores concentraciones que el tejido muscular. Nuestros resultados encontraron que los niveles de GSH en el tejido muscular de los individuos de *D. gliroides* fueron mayores en individuos que realizaban sopor, sin embargo estas diferencias no fueron halladas en el tejido hepático (Figura 6). Para el caso de *T. elegans*, solo se observó una tendencia al aumento de GSH en el músculo en los individuos del tratamiento activos (Figura 11). Los resultados encontrados en *D. gliroides* concuerdan con lo encontrado en algunos

animales expuestos al frío, tales como ratas (Cepa Sprague–Dawley) (Yusek & Alma, 2000) o el anfibio, *Bufo melanostictus* (Sahoo & Kara, 2014). Estas especies presentan un aumento de la concentración de GSH en los tejidos evaluados (en ratas; médula adrenal e hipotálamo y en el anfibio; riñón hígado y cerebro) cuando se disminuye la temperatura ambiental. Por otro lado, los resultados encontrados en *Thylamys* presentan una similitud al trabajo de Orr y col (2009) quienes evaluando en *Spermophilus parryii* en distintas condiciones (sopor, despertar y activos) encontraron que GSH en corteza cerebral se mantiene estable en normotermia, sopor y despertar, pero los niveles de GSH en tejido hepático y grasa parda presentaron un aumento durante el sopor. Estos resultados en su conjunto sugieren que los niveles de actividad de GSH pueden ser elevados sólo en algunos tejidos y dependen de las diferentes etapas del letargo metabólico.

Por el contrario, la actividad de SOD, presentó diferencias en *T. elegans*. Los machos en sopor presentaron menor actividad que machos activos, pero las hembras en sopor presentaron mayor actividad de esta enzima en comparación a los individuos activos (Fig. 10). Sin embargo, estas diferencias no estuvieron presentes en *D. gliroides*, aunque sí se pudo observar una tendencia en la interacción de los factores evaluados en el tejido hepático: machos activos presentarían mayor actividad de SOD que machos en sopor, y las hembras en sopor presentaron una mayor actividad que las hembras activas (Fig. 5). Así, se puede concluir que en ambas especies se presenta un patrón similar, es decir, las hembras en sopor presenta mayor concentración de SOD que los machos en sopor. Wilhelm-Filho y col. (2007) encontraron que en el murciélago *Sturnira lillium* la actividad de SOD en la sangre era mayor durante el sopor en comparación a los individuos activos,

lo que no se observó en otros tejidos evaluados, tales como hígado, corazón cerebro y pulmón. Resultados similares fueron encontrados por Buzadzic y col. (1997) en *Citellus citellus* cuando estas ardillas eran expuestas al frío. En resumen, nuestros resultados apoyan el patrón general encontrado previamente, es decir, que la actividad antioxidante es altamente tejido-específica y además que las hembras de ambas especies presentan mayores niveles de este antioxidante en condiciones de sopor.

La actividad antioxidante total no difirió entre los tratamientos térmicos de actividad y sopor (Fig. 2 y 7). Estos resultados indican que probablemente no existe una regulación general y común en cuanto a la preparación antioxidante, sino más bien sería tejido-específica en respuesta a la formación de radicales que presentan cada tejido y cada especie (Petrović et al. 2008). En esta vía, Whittington y col. (1995), evaluaron defensas antioxidantes de nueve marsupiales y dos monotremas australianos, concluyendo que las especies evaluadas presentan una alta variabilidad en cuanto a los niveles de las enzimas relacionadas con el sistema de defensas antioxidantes. Resultados similares fueron encontrados por Page y col. (2009) usando como modelo de estudio la ardilla de tierra de trece franjas *Spermophilus tridecemlineatus*. Estos autores encontraron que la sobreexpresión de antioxidantes intracelulares sólo se presentaría al inicio de este estado de letargo, pero no es sostenida en el tiempo. Así también Petrović y col. (2008) trabajando con *Rattus norvegicus*, encontraron que una aclimatación prolongada a temperaturas bajas evidenciaba una sobrerregulación inicial de antioxidantes en el tejido muscular de esta rata, pero no prolongada en el tiempo. En este sentido, especies que realizan sopor como estrategia de ahorro energético deben presentar mecanismos que les permitan una

protección del daño oxidativo que se genera al momento de despertar. Es importante una preparación a nivel proteico, bioquímico, molecular y también a nivel de antioxidantes, que permitan preparación de los organismos ante cualquier estrés ambiental (Storey, 1997; Geiser, 2001; Storey y Storey, 2005; Melvin y Andrews, 2009). Futuros estudios son necesarios para determinar la dinámica de cambios en las actividades de antioxidantes a nivel tisular en las distintas etapas del letargo metabólico, en particular en las especies utilizadas en este estudio. De esta manera, y en conjunto con la determinación de los niveles de ROS en cada tejido, se podría entender cuáles de éstos son más propensos a sufrir daño oxidativo y cuáles son las defensas que participan, tanto exógenas como endógenas.

6.2 Daño oxidativo

La mayoría de las especies de animales que realizan sopor presentan una preparación pre hibernar, en donde se produce un periodo de hiperfagia que permite un aumento de la masa corporal y almacenamiento de energía para los periodos de escasez de alimento (Geiser, 2001; Franco et al., 2012). Muchos de los organismos realizan una preparación con una alta ingesta de alimentos enriquecidos en ácidos grasos polinsaturados (PUFA) que permiten cambiar la conformación de la membrana plasmática manteniendo su viscosidad a bajas temperaturas (Geiser, 2001; Carey et al., 2003; Geiser & Kortner, 2010). Sería esperable entonces, que individuos presenten un alto contenido de PUFA en las

membranas celulares, resultante de las preferencias en sus dietas, y que contengan un alto nivel de auto-oxidación. Esto implicaría una serie de formación de peróxidos lipídicos, los cuales en reacciones en cadena producen efectos citotóxicos, alteraciones en la permeabilidad de la membrana, producción de edemas y muerte celular (Huanqui, 1997; Vereneo, 2002). De hecho Frank y col (1998) estudiaron el efecto de una aclimatación a alto contenido de ácidos grasos polinsaturados en la ardilla *S. lateralis* y también la peroxidación lipídica, evaluando la preparación antioxidante en esta especie. Sus resultados revelaron que los individuos que poseían en su dieta ácidos grasos monoinsaturados en mayor proporción a los polinsaturados presentaron mayores niveles de peroxidación lipídica al inicio del experimento y posterior a un mes de aclimatación. Para esta especie la preparación pre hibernal no solo estaría dada por una alta ingesta de PUFA, sino que también de una alta concentración de Vitamina E como un agente antioxidante que previene del daño oxidativo causado por la peroxidación lipídica (Venkatraman et al., 1998).

Estudios realizados en *D. gliroides* han reportado que esta especie no presentaría una preferencia por dietas ricas en PUFA (Contreras et al., 2014), sino que es más bien de hábitos dietarios generalistas (Quijano, 2008). Al contrario, estudios realizados en *T. elegans*, han mostrado una preferencia por dietas ricas en ácidos grasos de esta especie en el invierno (Bozinovic y Mendez, 1997). De esta manera sería esperable que *T. elegans* presente mayores niveles de auto-oxidación en ambos tejidos que en *D. gliroides*, de acuerdo a su dieta. En este estudio el ensayo de peroxidación lipídica fue utilizado como un indicador de estrés oxidativo, por estimación indirecta de malondihaldehido (MDA), el cual es un radical terminal de estas reacciones, principalmente a ácidos grasos

poliinsaturados (PUFA). Los resultados indican que en ambas especies la actividad de TBARS parece ser similar en ambos tejidos (Figura 3 y 8), lo que sugiere que, o bien ambas especies presentan proporciones similares de PUFA en sus membranas o, de existir diferencias, estas pudieran ser suplidas por el consumo de antioxidantes a través de la dieta.

Por otro lado, en ambas especies, el tejido hepático presenta mayores concentraciones de TBARS en comparación al tejido muscular (Tabla 4 y 5). En *D. gliroides* se pudo apreciar una tendencia en la interacción de los factores evaluados en el tejido hepático; machos en sopor presentaron alta concentración de TBARS en comparación a los machos activos. Por el contrario, las hembras de esta especie en sopor presentaron menores valores que aquellas en actividad y en el tejido muscular no se presentaron estas diferencias. De hecho recientemente se demostró que la hibernación en *D. gliroides* es un proceso delicadamente controlado por 39 microRNAs que son regulados diferencialmente en el hígado y en el músculo, y que en conjunto regulan diversas funciones de protección celular que facilitan la hibernación y evitan la atrofia muscular (Hadj-Moussa et al., 2016). Los resultados de esta tesis son complementarios a los de estos autores, puesto que nosotros no encontramos evidencia de estrés oxidativo en estos tejidos. Al parecer la sub o sobre expresión de los microRNAs, durante la hibernación juegan un paso relevante para evitar el daño celular en esta especie. Por otro lado, *T. elegans* presentó siempre valores ligeramente mayores de estrés lipídico durante el sopor, al evaluarlo en el tejido hepático y muscular (Fig. 8). En este sentido, Wilhelm-Filho y col. (2007) evaluaron en cinco especies de murciélagos de Sudamérica la peroxidación lipídica de sus tejidos. Los resultados arrojaron que el

tejido cardíaco presentó mayores niveles de TBARS en comparación al hígado, riñón, estómago, cerebro y pulmón. En paralelo, dichos los autores reportaron que estas especies presentan una dieta basada en vegetales, lo que permite el ingreso de agentes antioxidantes como Vitamina E y C además de carotenoides. De hecho, los tejidos que presentaban altas concentraciones de α -tocoferol o vitamina E presentaron las menores concentraciones de peroxidación lipídica. Esto sugiere que estas especies impiden el estrés oxidativo mediante un sistema de defensas antioxidantes incluidos mediante la dieta, estrategia que es utilizada ampliamente entre los organismos, (Wilhelm-Filho et al., 2007; Schneeberger et al., 2014). Nuevamente, y para el caso de las especies evaluadas en esta tesis, es necesario resaltar la necesidad de estudiar i) qué tipo, ii) en qué concentración y iii) en qué condición (e.g., previo a la entrada de hibernación, o en distintas condiciones ambientales) son incorporados los antioxidantes a través de la dieta y cómo esto se traduce en distintos niveles de concentración de antioxidantes en los tejidos para prevenir el daño oxidativo. Por otro lado, durante la hibernación los animales se ven enfrentados a diversas amenazas además de la peroxidación lipídica (Storey, 1997; Melvin y Andrews, 2009). Se ha documentado que en esta condición pueden deprimir su sistema inmune, con la consecuencia de sufrir infecciones, presentar una respuesta inflamatorias o anemia, leucopenia, hipoglicemia entre otras afecciones (Sidky et al., 1969; Franco et al., 2013). De hecho estudios previos en *D. gliroides* revelan una fuerte reducción de las funciones inmunológicas y muestra algunas respuestas inflamatorias musculares, durante una exposición crónica al frío (Franco et al., 2013). En este sentido, es interesante evaluar un radical indicador de este tipo de estrés en las especies aquí estudiadas. Dicho indicador es el Nitrato total (NT), el cuál es un mediador en enfermedades vasculares e inflamatorias,

cáncer, diabetes isquemia renal y arterosclerosis (Coskun et al., 2007). Este ensayo nos permite evaluar cuan propenso se encuentran los individuos al poseer una alta concentración de intermediarios reactivos al nitrógeno, que en conjunto a otros intermediarios producen daño celular.

Los resultados mostraron que machos de *D. gliroides* en sopor presentaron un ligero aumento de NT en el tejido hepático, pero no en músculo, en comparación a los individuos activos y respecto de las hembras, (Fig. 4). Por el contrario, en el tejido hepático de *T. elegans* se puede observar que tanto machos como hembras en sopor presentan un aumento en la concentración de NT durante el sopor, en ambos tejidos (Fig. 9). Resultados concordantes del efecto de la hibernación sobre la producción de NT fueron reportados por Avci y col (2014) en la ardilla *Spermophilus xanthoprimum*. Los autores reportaron que los niveles de NT disminuyen en el corazón, riñón, hígado y pulmón, con excepción del cerebro, en individuos hibernantes en comparación al grupo no hibernante. En conjunto, lo encontrado en este y al actual estudio, demuestra que no todos los tejidos presentan un estrés oxidativo efectivo o commensurable. Así, es posible que los distintos tejidos presenten una vulnerabilidad diferencial a sufrir procesos inflamatorios o cambios a nivel vascular (Coskun et al., 2007; Pacher et al., 2007). Por otro lado, el que solo algunos tejidos presenten daño oxidativo y procesos inflamatorios pueden ser explicados por una protección de altos niveles de antioxidantes no enzimáticos circulantes previos a la hibernación. De hecho Zhou y col (2001) evaluaron el daño y la inflamación que se produce durante la hibernación en el tejido cerebral de *Spermophilus tridecemlineatus*. Los autores encontraron que durante la hibernación, los individuos no presentaron evidencia de inflamación, tales como la presencia de macrófagos o astrocitos, pero los

individuos activos presentaban altos grados de inflamación, macrófagos e inflamación axonal. Junto con ello, los autores reportaron la presencia de altas concentraciones de ascorbato en el fluido cerebro espinal durante la hibernación. En este sentido, esta especie presenta una preparación antioxidante durante su letargo energético.

Finalmente entonces, al parecer las distintas especies evaluadas a la fecha no presentan mecanismos generales, sino más bien específicos, en cuanto a la preparación a la hibernación. Lo anterior se manifiesta en la sobre-expresión de algunos antioxidantes durante la hibernación, o durante el recalentamiento para el periodo de actividad (Page et al., 2009). Otras especies presentan una preparación mediante modificaciones de su dieta, aumentando la ingesta de componentes antioxidantes que permanecen en el plasma durante la hibernación y que le permite evitar el daño oxidativo (Drew et al., 2004; Wilhelm-Filho, 2007).

7. CONCLUSIÓN

Esta tesis es uno de los primeros estudios que evalúa la preparación mediante defensas antioxidantes en marsupiales chilenos. Nuestros resultados demuestran que especies como *D. gliroides* que realiza hibernación y *T. elegans* que realiza sopor diario, presentan defensas antioxidantes, lo que ha sido reportado en otros marsupiales, principalmente australianos y algunos murciélagos sudamericanos. También se pudo demostrar que no todos los tejidos evaluados presentan concentraciones de antioxidantes similares, y del mismo modo, el estrés oxidativo también depende del tejido evaluado y la condición fisiológica analizada (sopor vs activo). En general individuos en sopor presentaron mayor estrés oxidativo evaluado como TBARS y NT. Nuestros resultados son concordantes con lo reportado en otras especies de mamíferos como ardillas y murciélagos, en cuanto a que no se genera un estrés oxidativo global, sino más bien tejido-específico. Un patrón similar fue observado en el sistema de defensas antioxidantes.

Estos resultados sugieren que para tener un conocimiento más detallado de los efectos de la condición metabólica sobre los niveles de defensa antioxidante y daño oxidativo, es necesario analizar la dinámica de producción (y de ingesta) de antioxidantes a lo largo de las distintas estaciones del año. Esto último nos permitiría tener una mejor claridad de los procesos que ocurren a nivel de defensas antioxidantes en estas especies, cuáles son los órganos más propensos al estrés oxidativo y en qué momento se produce tal estrés

oxidativo. Por último, aunque son aspectos que no se consideran en este estudio, sería interesante evaluar cómo otros factores estresantes como la contaminación, la presencia de pesticidas entre otros, pueden afectar los niveles de estrés oxidativo en este y otros taxa.

8. REFERENCIAS

- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S. y M. Tattini. 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 35-45
- Avci, E., Bulut, S., Bircan, F., Ozluk, S. A. y S.C. Cevher. 2014. Effect of hibernation on oxidative and antioxidant events under laboratory conditions in anatolian ground squirrel, *Spermophilus xanthopyrmnus* (Bennett, 1835) (Mammalia: Sciuridae) from central anatolia. *Pakistan J. Zool.* 46: 177-183.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B. y V.I. Lushchak. 2003. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *Journal of Thermal Biology* 28: 21-28
- Bozinovic, F. y M. Méndez. 1997. Role of dietary fatty acids on energetics and torpor in the chilean mouse-opossum *Thylamys elegans*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.*116: 101-104.
- Bozinovic, F. y J.F. Merrit. 1991. Conducta, estructura y función de micromamíferos en ambientes estacionales: mecanismos compensatorios. *Revista Chilena De Historia Natural.* 64:19-28.
- Bozinovic, F., Ruiz, G. y M. Rosenmann. 2004. Energetics and torpor of a South American "living fossil", the microbiotheriid *Dromiciops gliroides*. *Journal Of Comparative Physiology B.* 174: 293-297
- Bozinovic, F., Ruiz, G., Cortes, A. y M. Rosenmann. 2005. Energetics, thermoregulation and torpor in the chilean mouse-opossum *Thylamys elegans* (Didelphidae). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 78: 199-206.
- Buzadzic, B., Blagojevic, D., Korac, B., Saicic, Z.S., Spasic, M.B. y V.M. Petrovic. 1997. Seasonal variation in the antioxidant defense system of the brain of the ground squirrel (*Citellus citellus*) and response to low temperature compared with rat. *Comp. Biochem. Physiol. C.*117: 141-149
- Canals, M. y F. Bozinovic. 2011. Huddling behavior as critical phase transition triggered by low temperatures. *Complexity.* 17: 35-43.
- Carey, H.V., Andrews, M.T. y S.L. Martin. 2003. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* 83: 1153-1181.

- Careau, V., Bergeron P., Garant, D., Reale, D., Speakman, J.R. y M.M. Humphries. 2013. The energetic and survival costs of growth in free-ranging chipmunks. *Oecologia* 171: 11–23.
- Contreras, C., Franco, M., Place, N.J. y R.F. Nespolo. 2014. The effects of polyunsaturated fatty acids on the physiology of hibernation in a South American marsupial, *Dromiciops gliroides*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 177: 62–69
- Coşkun, S., Güleç, E.G., Balabanlı, B. y F. Acartürk .2007. Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing: a time-course study. *Surg Today*. 37:570-574.
- Costantini, D. 2014. Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology a marriage between mechanistic and evolutionary approaches. Springer Berlin Heidelberg. 348pp
- Cortés, P.A., Franco, M., Sabat P., Quijano, A. y R. Nespolo. 2011. Bioenergetics and intestinal phenotypic flexibility in the microbiotherid marsupial (*Dromiciops gliroides*) from the temperate forest in South America. *Comparative Biochemistry And Physiology A*. 160: 117-124.
- Davies, K.J.2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 50:279-289.
- Drew, K.L., Harris, M. B., La Manna, J. C., Smith, M. A., Zhu, X.W. and Y.L. Ma. 2004. Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms. *The Journal of Experimental Biology* 207: 3155-3162
- Drew, K.L., Tøien, Ø., Rivera, P.M., Smith, M.A., Perry, G. y M.E. Rice. 2002. Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 133:483–492.
- D'Elía, G., Hurtado, N. y A. D'Anatro. 2016. Alpha taxonomy of *Dromiciops* (Microbiotheriidae) with the description of 2 new species of monito de monte. *Journal of Mammalogy*. Doi:10.1093/jmammal/gyw068.
- Franco, M., Contreras, C., Cortes, P., Chappell, M.A., Soto-Gamboa, M. y R.F. Nespolo. 2012. Aerobic power, huddling and the efficiency of torpor in the South American marsupial, *Dromiciops gliroides*. *Biol. Open*. 1: 1178–1184.
- Franco, M., Contreras, C. y R.F. Nespolo.2013. Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 166:338–342.

Frank, C.L., Ellen S. Dierenfeld, E.S. y Storey K.B. 1998. The relationship between lipid peroxidation, hibernation, and food selection in mammals. *Amer. Zool.* 38:341-349.

Geiser, F. 2001. Hibernation: endotherm. encyclopedia of life sciences, Nature Publishing Group. 4000-Word Article Invited Review. DOI: 10.1002/97804700159

Geiser, F. y G. Körtner. 2010. Hibernation and daily torpor in australian mammals. *Australian Zoologist* 35: 204-215

Gilbert, C., Mccafferty, D., Maho, Y.L., Martrette, J.M., Giroud, S., Blanc, S. y A. Ancel. 2010. One for all and all for one: the energetic benefits of huddling in endotherms. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 85:545-569

Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Rinaldi Tosi, M.E., Abud, M.A., Calderón, M.L. y A. Castro-Vazquez. 2013. Antioxidant and molecular chaperone defences during estivation and arousal in the South American apple snail *Pomacea canaliculata*. *The Journal of Experimental Biology.* 216:614-622

Hadj-Moussa, H., Moggridge, J.A., Luu, B.E., Quiñtero-Galvis, J.F., Gaitan-Espitia, J.D., Nespolo, R.F., y K.B. Storey. 2016. The hibernating South American marsupial, *Dromiciops gliroides*, display torpor-sensitive microRNA expression patterns. *Scientific Reports.* doi:10.1038/srep24627

Halliwell, B.H. y J.M. Gutteridge. 2007. Free radicals in biology and medicine, 4th Edn. Oxford University Press, Oxford

Huanqui, C. 1997. Oxidantes-antioxidantes en reumatología. *Rev. Perú Reum.* 3: 35-40

Körtner, G y F. Geiser. 2000. torpor and activity patterns in free-ranging sugar gliders *Petaurus Breviceps* (Marsupialia). *Oecologia.* 123:350-357.

Humphries, M.M., Thomas, D.W. y D. L. Kramer. 2003. The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiological And Biochemical Zoology* 76:165-179

McNab B.K. 2002. The physiological ecology of vertebrates: a view from energetics. Cornell University Press. 575pp.

Melvin, R.G. y M.T. Andrews. 2009. Torpor induction in mammals: recent discoveries fueling new ideas. *Trends Endocrinol. Metab.* 20:490-498

Meynard, A., Palma, R. y E. Rivera-Milla. 2002. Filogeografía de las Llacas chilenas del género *Thylamys* (marsupialia, didelphidae) en base a secuencias del gen mitocondrial citocromo b. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 75: 299-306

- Morin, P.J., Zhouli Ni, Z., David C. McMullen, D.C y K.B. Storey. 2008. Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. Mol Cell Biochem. 312:121-129.
- Nespolo, R., Bacigalupe, L.D., Sabat, P. y F. Bozinovic. 2002. Interplay among energy metabolism, organ mass and digestive enzyme activity in the mouse-opossum. The role of thermal acclimation. Journal Experimental Biology. 205: 2697-2703.
- Nespolo, R.F., Verdugo, C., Cortes, P.A. y L.D. Bacigalupe. 2010. Bioenergetics of torpor in the microbiotherid marsupial, Monito del Monte (*Dromiciops Gliroides*): the role of temperature and food availability. J. Comp. Physiol. B. 180, 767-773.
- Nicol, S.C. y N.A Andersen. 2007. Cooling rates and body temperature regulation of hibernating echidnas (*Tachyglossus aculeatus*). J. Exp. Biol. 210:586-592
- Opazo, J.C., Nespolo, R.F. y F. Bozinovic. 1999. Arousal from torpor in the Chilean Mouse-Opossum (*Thylamys Elegans*): Does non-shivering thermogenesis play a role? Comparative Biochemistry And Physiology A 123: 399-408.
- Orr, A.L., Lohse, L.A., Kelly L. Drew, K.L. y M Hermes-Lima. 2009. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 153:213-221
- Pacher, P., Beckman, J.S. y L. Liaudet. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev. 87: 315-424.
- Page, M.M., Peters, C.W., Staples, J.F. y J.A. Stuart. 2009. Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. Comp. Biochem. Physiol. A. 152: 115-122.
- Pamplona, R. y D. Costantini. 2011. Molecular and structural antioxidant defences against oxidative stress in animals. Am J Physiol 301:843-863.
- Petrovic, V., Buzadzic, B., Korac, A., Vasiljevic, A., Jankovic, A., Micunovic, K. y B. Korac. 2008. Antioxidative defence alterations in skeletal muscle during prolonged acclimation to cold: role of L-arginine/NO-producing pathway. The Journal of Experimental Biology. 211:114-120.
- Quijano, S. A. 2008. Uso y selección de hábitat del Monito del Monte, *Dromiciops Gliroides* Thomas, 1894, en el bosque experimental San Martín, centro sur de Chile. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

- Randal, D. y W. Bruggren. 2002. Eckert, Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones. McGraw-Hill Interamericana. 4ª Ed.
- Ruiz-Aravena, M., Gonzalez-Mendez, A., Estay, S., Gaitán-Espitia, J., Barría Oyarzo, I., Bartheld, J. y L.D. Bacigalupe. 2014. Impact of global warming at the range margins: phenotypic plasticity and behavioral thermoregulation will buffer an endemic amphibian. *Ecology and Evolution*. 4: 4467–4475.
- Ruf, T. y F. Geiser. 2015. Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biological Reviews*. 90: 896-926.
- Sabat P, F Bozinovic & F Zambrano (1995). Role of dietary substrates on intestinal disaccharidases, digestibility and energetics in the insectivorous mouse-opossums (*Thylamys elegans*). *Journal of Mammalogy* 76:603-611.
- Sabat P & F Bozinovic (1994). Cambios estacionales en la actividad de enzimas digestivas en el pequeño marsupial chileno *Thylamys elegans*: disacaridasas intestinales. *Revista Chilena de Historia Natural*. 67: 221-228.
- Sabat P, F Bozinovic & F Zambrano (1993). Insectivoría en *Marmosa elegans* (Marsupicarnívora): ¿Una restricción fisiológica-evolutiva? *Revista Chilena de Historia Natural*. 66: 87-92.
- Sabat, P., Riveros, J.M. y C. Lopez-Pinto. 2005. Phenotypic flexibility in the intestinal enzymes of the african clawed frog *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry And Physiology A*. 140: 135–139.
- Schaeffer, P. J., Villarin, J.J. y S.L. Lindstedt .2003. Chronic cold exposure increases skeletal muscle oxidative structure and function in *Monodelphis domestica*, a marsupial lacking brown adipose tissue. *Physiological and Biochemical Zoology*.76: 877–887.
- Schneeberger, K., Czirják, G.A. y C.C.Voigt.2014. Frugivory is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats. *Naturwissenschaften*.101:285-290.
- Sidky, Y.A., Daggett, L.R. y R. Auerbach.1969. Brown fat: its possible role in immunosuppression during hibernation. *Proc Soc Exp Biol Med*.132:760 –763
- Starkov, A.A., Chinopoulos, C. y G. Fiskum. 2004. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediator of ischemic brain injury. *Cell Calcium*.36:257-264
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal Of*

- Medical And Biological Research. 29:1715-1733.
- Storey, K.B. 1997. Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations. *Comp. Biochem. Physiol, Part A.*118:1115–1124.
- Storey, K.B y J. Storey. 2005. Integrative physiology in the proteomics and post-genomics age. Editors Wolfgang Walz, chapter 10 *Biochemical Adaptation to Extreme Environments*
- Superina, M. y G.A. Jahn. 2013. Effect of low-quality diet on torpor frequency and depth in the pichi *Zaedyus pichiy* (Xenarthra, Dasypodidae), a South American armadillo. *J. Therm. Biol.* 3: 280–285.
- Tøien Ø, Drew KL, Chao ML, and Rice ME. 2001. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281:572-583.
- Vasquez, R.A. 1996. Patch utilization by three species of Chilean rodents differing in body size and mode of locomotion. *Ecology.* 77: 2343–2351
- Venereo- Gutierrez J.2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil.* 31:126-133.
- Whittington, A.T., Parkinson, A.L., Spencer, P.B.S., Grigg, G., Hinds, J.L., Gallagher, C.H., Kuchel, P.W. y N. S. Agar. 1995. Comparative study of the antioxidant defence systems in the erythrocytes of Australian marsupials and monotremes. *Comp. Biochem. Physiol, Part C.* 110: 267-272.
- Wilhelm Filho, D., Luiz Althoff, S., Luiz Dafré, A. y A. Boveris. 2007. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.*146:214–220.
- Willmer, P., Stone, G. y I. Stone. 2005. *Environmental physiology of animals.* 2th Edition. Blackwell Publishing. Oxford, U.K. 754pp.
- Wojciechowski, M.S., Jefimow, M. y E. Tęgowska. 2007. Environmental conditions, rather than season, determine torpor use and temperature selection in large mouse-eared bats (*Myotis Myotis*). *Comparative Biochemistry And Physiology, Part A.*147 : 828–840.
- Zhou, F., Zhu, X., Castellani, R.J., Stimmelmayer, R., Perry, G., Smith, M.A. y K.L. Drew. 2001. Hibernation, a model of neuroprotection. *American Journal Of Pathology.*158:2145-2151.