

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES



Caracterización molecular y expresión de enzimas  
antioxidantes en el Isópodo gigante *Glyptonotus*  
*antarcticus* Eights, 1852 en una población de Bahía Fildes  
(Isla Rey Jorge, Antártida)

**Constanza Jiménez Contreras**

Director de Tesis: Dr. Marcelo González-Aravena  
Co-Director de Tesis: Dr. Américo Montiel San Martín

2016

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES  
EN EL ISÓPODO GIGANTE *GLYPTONOTUS ANTARCTICUS* EIGHTS, 1852 EN UNA  
POBLACIÓN DE BAHÍA FILDES, (ISLA REY JORGE, ANTÁRTIDA).

Por Constanza Jiménez Contreras

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

Fecha: 9 de junio de 2016

Dr. Víctor Díaz  
Decano Facultad Ciencias

Dr. Cristián Aldea  
Jefe de Carrera

Aprobado por Comisión de Calificación

Dr. Marcelo González-Aravena  
Director Tesis

Dr. Américo Montiel San Martín  
Co-director de Tesis

Dra. Valeria Latorre  
Evaluadora

Dra. María Luisa Salmerón  
Evaluadora

Tesis entregada como requerimiento para obtener el Título de  
Biólogo Marino en la Facultad de Ciencias.

2016

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me brindaron su ayuda, apoyo e enseñanzas de manera directa o indirecta para la elaboración de este trabajo, permitiéndome inculcarme en un ámbito desconocido, que de a poco aprendí con paciencia y dedicación a conocerlo. Agradecer el apoyo de mi tutor, el Dr. Marcelo González-Aravena, por darme la oportunidad de formarme en el área de la biología molecular bajo su amparo, gracias a su dedicación y entrega con la investigación científica. Su apoyo constante y orientación en la realización de este trabajo tanto en la teoría como en el laboratorio, confirió a abrirme muchas posibilidades y oportunidades en el quehacer científico y así permitiéndome desarrollarme profesionalmente. A mi co-tutor, el Dr. Américo Montiel, por su imprescindible ayuda, sus consejos, sus aprensiones y críticas constructivas que permitieron enfocarme en el camino satisfactorio de este trabajo y su abnegación docente que contribuyeron en las bases de mi formación académica.

A todas las personas con quien compartí y conocí en el laboratorio de Biorrecursos antárticos del Instituto antártico chileno, por su buena disposición y buenos momentos vividos en mi estadía en este.

En especial a mi familia por su apoyo incondicional en mi etapa universitaria, por soportar tensiones, enojos y decepciones, además de alentar todos mis logros con dicha y alegría. A mis padres Luis y Ester, por darme alas, por ser mis pilares fundamentales y mis guías en este camino, agradecer este logro a ellos, por sus buenas enseñanzas y costumbres, por siempre inculcarme a ser alguien más en esta vida y aprovechar cada oportunidad que se me colocaba en frente, para sacar el máximo provecho de cada una de ellas. A mis hermanos por sus buenos consejos y cariños en este proceso. A Patricio, por darme su amor y cariño. Finalmente agradezco la preocupación y cariño de mis amigos y a todas las personas que me han acompañado en este proceso y mi Jazz Anouk por ser una de mis grandes alegrías.

Por último al Proyecto Fondecyt 1131001 “*Coping with warming of Southern Ocean: Invertebrates response to thermal stress conditions*” que enmarcó esta tesis.

## RESUMEN

El isópodo gigante *Glyptonotus antarcticus* Eights, 1852, fue uno de los primeros crustáceos en ser descritos en aguas antárticas, por su extensa distribución desde la costa del continente antártico hasta las islas al sur del frente polar, siendo considerado como un importante componente biológico del ecosistema antártico bentónico. Al ser un organismo estenotermo, vive en un estrecho y estable rango de temperatura entre los -1,9 y los 2,0 °C. Al exponerse a temperaturas sobre su rango de distribución natural induce un rápido aumento en la tasa metabólica. Posteriormente esto, generará una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, produciendo un desequilibrio en el sistema pro-oxidante del organismo, también denominado como estrés oxidativo. Es como esta acción incitará la expresión de genes de enzimas antioxidantes, como la Superóxido dismutasa y Catalasa, para así reducir los niveles de especies oxidantes perjudiciales para el organismo. Es así como surge la interrogante, si este organismo antártico será capaz de demostrar una defensa nivel transcripcional, ante un inminente escenario actual y futuro de un aumento en la temperatura del agua de mar generado por el cambio climático. Esta tesis tiene como finalidad, caracterizar las secuencias de ADN de los genes superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) obtenidas mediante la técnica RNAseq. En este trabajo se evaluó la expresión transcripcional de estos dos genes en respuesta al estrés térmico en experimentos de corto y largo plazo en organismos adultos de *Glyptonotus antarcticus*. Mediante herramientas moleculares cuantitativas como lo es la RT-QPCR se evaluó la expresión de la CAT y la SOD en hemocitos y hepatopáncreas expuestos a un cinética de temperatura de 3°C y 6°C en un período corto de 1, 6 y 24 horas y un período de largo plazo a 168, 336 y 504 horas a 1°C y 3°C. Los resultados bioinformáticos presentan características conservadas para ambas secuencias de estas enzimas. Por ejemplo: sitios conservados para aminoácidos, sitios putativos, firmas proximales, regiones específicas, múltiples alineamientos y filogenia comparativa de estos genes con distintos invertebrados marinos, indican por primera vez, las características conservadas de estas enzimas para el isópodo *Glyptonotus antarcticus*.

Las cinéticas de estrés térmico, revelan que la exposición a corto plazo, de temperaturas de 3° y 6°C indica variaciones significativas en el nivel de expresión de los genes de las enzimas antioxidantes. Por el contrario la exposición a largo plazo no demuestra variaciones significativas. Por consiguiente, se demuestra que el organismo si tiene una respuesta antioxidante rápida, permitiéndole enfrentar un estrés térmico por aumento de temperatura temporal y no extensamente prolongado. Siendo así, *Glyptonotus antarcticus* presenta un mecanismo de defensa antioxidante con las enzimas la superóxido dismutasa y catalasa en tejidos y células inmunes, el cual se podría indicar como biomarcador para estudios ante un posible de aumento de temperatura de las aguas antárticas frente a un escenario de calentamiento global.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>2. MARCO TEORICO</b>	<b>13</b>
<b>1. El cambio climático como precursor de estrés oxidativo</b>	<b>13</b>
<b>2. El balance metabólico y su relación con el estrés oxidativo</b>	<b>14</b>
2.1 Moléculas blanco del daño oxidativo	19
<b>3. Estrés oxidativo</b>	<b>20</b>
3.1 Radicales libres y especies reactivas: precursores del E.O	21
3.2 Factores estimuladores de estrés oxidativo	24
3.3 Estrés oxidativo en ambientes marinos	27
3.4 Estrés oxidativo en el ecosistema marino antártico	29
<b>4. Mecanismos de defensa antioxidantes</b>	<b>30</b>
4.1 Antioxidantes enzimáticos	32
4.2 Antioxidantes no enzimáticos	38
<b>5. Estrés oxidativo en crustaceos</b>	<b>40</b>
<b>6. El isópodo gigante antártico <i>Glyptonotus antarcticus</i></b>	<b>42</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>44</b>
<b>1. Objetivos generales</b>	<b>45</b>
<b>2. Objetivos específicos</b>	<b>45</b>
<b>4. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b>	<b>46</b>
<b>1. Área de estudio</b>	<b>46</b>
<b>2. Diseño experimental</b>	<b>47</b>
<b>3. Obtención de las secuencias</b>	<b>48</b>
<b>4. Análisis bioinformático de secuencias</b>	<b>49</b>
<b>5. Extracción de RNA total y cuantificación por espectrof.</b>	<b>50</b>
<b>6. Obtención de cDNA</b>	<b>50</b>
<b>7. Diseño de partidores</b>	<b>51</b>
<b>8. Amplificación del gen</b>	<b>51</b>
<b>9. PCR en tiempo real (qPCR)</b>	<b>52</b>
<b>10. Análisis estadístico</b>	<b>53</b>

<b>5. RESULTADOS</b>	
<b>1. Análisis bioinformático de las secuencias</b>	<b>54</b>
a) Características moleculares de las secuencias superóxido dismutasa y catalasa	
b) Múltiples alineamientos de secuencias deducidas a partir de SOD y CAT	
c) Análisis de similitud mediante el programa Blast de NCBI.	
d) Árboles filogenéticos	
<b>2. Análisis de expresión relativa en cinéticas de estrés térmico</b>	<b>70</b>
<b>Cinética Corto Plazo</b>	
Expresión relativa del transcrito superóxido dismutasa (A) y catalasa (B) en tejido de hepatopáncreas.	
Expresión relativa del transcrito superóxido dismutasa (C) y catalasa (D) en células de hemocitos.	
<b>Cinética Largo Plazo</b>	
Expresión relativa del transcrito superóxido dismutasa (E) y catalasa (F) en tejido de hepatopáncreas.	
Expresión relativa del transcrito superóxido dismutasa (G) y catalasa (H) en células de hemocitos.	
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>86</b>
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Diseño experimental de tiempo de exposición y números de organismos utilizados en experimento de corto plazo.

**Tabla 2.** Diseño experimental de tiempo de exposición y números de organismos utilizados en experimento de largo plazo.

**Tabla 3.** Secuencias de “*contigs*” de SOD y CAT recuperadas del transcriptoma de *G. antarcticus*.

**Tabla 4.** Secuencia de partidores diseñados para la amplificación los genes SOD y CAT.

**Tabla 5.** Principales características de la secuencias de aminoácidos similares a la de *G. antarcticus* SODCu/Zn.

**Tabla 6.** Porcentaje de aminoácidos en secuencias similares a la de *G. antarcticus* SODCu/Zn.

**Tabla 7.** Principales características de la secuencias de aminoácidos similares a catalasa de *G. antarcticus*.

**Tabla 8.** Porcentaje de aminoácidos en secuencias similares a catalasa de *G. antarcticus*.

**Tabla 9.** Homología de secuencias de aminoácidos de la secuencia de *G. antarcticus* con otros miembros de la familia de superóxido dismutasa.

**Tabla 10.** Homología de secuencias de aminoácidos de la secuencia de *G. antarcticus* con otros miembros de la familia de catalasa.



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Temperaturas superficiales anuales del mar durante un periodo de 5 años (2006-2010) en Puerto Arthur, Isla Anvers, en la Antártida. El máximo de temporada y mínima durante el periodo de 5 años fueron de 2,9 y 1,8 °C. (Schram *et al.*, 2015).

**Figura 2.** Esquema bio-energético, comparación entre el balance energético y equilibrio metabólico de un organismo y su relación con el estrés oxidativo.

**Figura 3.** Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) durante la reducción de oxígeno molecular O<sub>2</sub>. (Modificado de Peralta y Volke, 2012).

**Figura 4.** Mecanismo de reacción de la enzima Superóxido dismutasa, en la dismutación del anión peróxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

**Figura 5.** Esquema de isóformas de Superóxido dismutasa de Fe, Mn y Cu-Zn (Hu *et al.*, 2012).

**Figura 6.** Sitios activos de superóxido dismutasa Cu-Zn, unidos por un puente imidazol (Miller, 2004).

**Figura 7.** Mecanismo de reacción de dismutación del radical peróxido mediante la acción de SOD.

**Figura 8.** Mecanismos de reacción de la catalasa para dismutar el peróxido de hidrogeno a agua y oxígeno (Díaz, 2003).

**Figura 9.** A) Catalasa pequeña de eritrocitos humanos (HEC) y B) catalasa-1 grande de *Neurospora crassa*.

**Figura 10.** *Glyptonotus antarcticus* (Fuente Kevin Lee).

**Figura 11.** Locación de la Bahía Fildes en la Isla Rey Jorge, Antártica (Modificado de Antarctica XXI).

**Figura 12.** La secuencia nucleótidos (arriba) y la secuencia deducida de aminoácidos (abajo) de cDNA de *G. antarcticus* para superóxido dismutasa.

**Figura 13.** La secuencia nucleótidos (arriba) y la secuencia deducida de aminoácidos (abajo) del cDNA de *G. antarcticus* para catalasa.

**Figura 14.** Múltiples alineamientos de la secuencia de superóxido dismutasa de *G. antarcticus* con otras secuencias de aminoácidos de superóxido dismutasa homologas.

**Figura 15.** Múltiples alineamientos de la secuencia de catalasa de *G. antarcticus* con otras secuencias de aminoácidos de catalasa homologas.

**Figura 16.** Análisis de árbol filogenético de secuencia de superóxido dismutasa de *G. antarcticus* con otras secuencias de superóxido dismutasa de organismos marinos.

**Figura 17.** Análisis de árbol filogenético de secuencia de catalasa de *G. antarcticus* con otras secuencias de superóxido dismutasa de organismos marinos.

**Figura 18.** Expresión relativa de los transcritos de superóxido dismutasa (A) y catalasa (B) en la cinética de hepatopáncreas de *Glyptonotus antarcticus* mediante QPCR.

**Figura 19.** Expresión relativa de los transcritos de superóxido dismutasa (C) y catalasa (D) en la cinética de hemocitos de *Glyptonotus antarcticus* mediante QPCR.

**Figura 20.** Expresión relativa de los transcritos de superóxido dismutasa (E) y catalasa (F) en la cinética de hepatopáncreas de *Glyptonotus antarcticus* mediante QPCR.

**Figura 21.** Expresión relativa de los transcritos de superóxido dismutasa (G) y catalasa (H) en la cinética de hemocitos de *Glyptonotus antarcticus* mediante QPCR.