



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**ACTIVACIÓN DE PEROXIRREDOXINAS EN RESPUESTA
AL ESTRÉS OXIDATIVO CAUSADO POR COBRE EN LAS
MACROALGAS *SCYTOSIPHON GRACILIS* Y *LESSONIA
NIGRESCENS* (PHAEOPHYCEAE)**

**Tesis para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica,
área de especialización Bioquímica Ambiental.**

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico.

CARLOS DANIEL LUIS LOVAZZANO BRAVO

Directores de tesis:

Juan Alberto Correa Maldonado

Loretto Matilde Contreras Porcia

Santiago de Chile

2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster presentada por el candidato

CARLOS DANIEL LUIS LOVAZZANO BRAVO

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para obtener el grado de Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Ambiental y el Título Profesional de Bioquímico, en el examen de defensa de tesis rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Juan Correa Maldonado

Dra. Loretto Contreras Porcia

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez Armijo

Dr. Davor Cotoras Tadic

Dr. Claudio Vásquez Guzmán

“Algunos hombres ven las cosas como son y se preguntan por qué. Otros sueñan cosas que nunca fueron y se preguntan por qué no.”

George Bernard Shaw (1856 – 1950), premio Nobel de literatura

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis: El Dr. Juan Correa, por la guía, consejos y correcciones de este trabajo. Muchas gracias a la Dra. Loretto Contreras por su apoyo día a día, su amistad, su infinita paciencia, y todos sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Todo el “grupo de algas” del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica, por sus consejos y ayuda tanto en las actividades diarias de laboratorio como en las salidas a terreno y por su amistad. Al Dr. Santiago Andrade (Departamento de Ecología) por su ayuda en todo lo relacionado a los cultivos con cobre. A la Dra. Carolina Serrano (Departamento de Genética Molecular y Microbiología, UC), la Sra. Verónica Flores (Departamento de Ecología) y el Sr. Alejandro Munizaga (Servicio de Microscopía UC), por su ayuda en la realización del experimento de inmunofluorescencia. También agradezco las facilidades y la ayuda entregada por el Dr. Rodolfo Paredes (Laboratorio de Salud de Ecosistemas, UNAB) para la realización del experimento de “Western Blot”.

A mi familia: Mis padres, Carlos y Mónica. Mis hermanos, Franco, Melanie, Florencia y Javier. Mis abuelos, Oriana y Julio, y mis tíos, César, Claudia, Patricio. Gracias por su amor y apoyo incondicional. A mis compañeros de carrera y amigos, que me acompañaron en todo este proceso.

Finalmente agradezco el financiamiento que permitió la realización de esta tesis: FONDECYT 11085019 (Dra. Loretto Contreras), FONDAP 1501-0001 (CONICYT) a Center for Advanced Studies in Ecology & Biodiversidad (CASEB) Programa 7 e ICA (Dr. Juan Correa).

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1. Estrés oxidativo inducido por cobre	1
1.1.2. Peroxirredoxinas	6
1.1.3. Peroxirredoxinas en algas	10
1.2. HIPÓTESIS	11
1.3. OBJETIVO GENERAL	11
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. METODOLOGÍA	12
2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	12
2.1.1. Objetivo 1	12
2.1.2. Objetivo 2	13
2.1.3. Objetivo 3	13
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	14

2.2.1. Recolección de muestras, agua de mar y preparación del material de vidrio	14
2.2.2. Tratamientos de <i>Scytosiphon gracilis</i> y <i>Lessonia nigrescens</i> con cobre	15
2.2.3. Obtención y cuantificación de extractos proteicos	17
2.2.4. Ensayo de actividad peroxirredoxina	17
2.2.5. Ensayo de actividad catalasa	19
2.2.6. Ensayo de actividad peroxirredoxina acoplada a tiorredoxina	20
2.2.7. Ensayo de actividad peroxirredoxina acoplada a glutarredoxina	21
2.2.8. Determinación de lipoperóxidos	21
2.2.9. Medición de eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m)	22
2.2.10. Detección de PRXs mediante inmunofluorescencia	23
2.2.11. Detección de PRXs mediante "Western Blot"	24
2.2.12. Análisis estadístico de los resultados	26
3. RESULTADOS	27
3.1. OBJETIVO 1	27
3.1.1. Actividad Basal PRX en <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i>	27
3.1.2. Actividad PRX en <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i> frente a estrés por cobre	28
3.1.3. Control de especificidad de la actividad PRX	30

3.1.4. Actividad PRX acoplada a TRX en <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i>	31
3.1.5. Actividad PRX acoplada a GRX en <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i>	31
3.1.6. Evaluación de marcadores de daño oxidativo en <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i>	33
3.1.6.1. Lipoperóxidos	33
3.1.6.2. Eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m)	33
3.2. OBJETIVO 2	35
3.2.1. Velocidad de activación PRX en <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i>	35
3.3. OBJETIVO 3	37
3.3.1. Detección de PRXs en <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i> por inmunofluorescencia	37
3.3.2. Control de especificidad de los anticuerpos empleados en el experimento de inmunofluorescencia	38
3.3.2.1. Anticuerpo secundario	38
3.3.2.2. Anticuerpo primario	38
4. DISCUSIÓN	41
5. CONCLUSIÓN	49
6. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Hábito de individuos juveniles de <i>S. gracilis</i> y <i>L. nigrescens</i>.	4
1.2. Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional en <i>S. gracilis</i>.	5
1.3. Mecanismo de reacción de 1-Cys PRX	7
1.4. Mecanismo de reacción de 2-Cys PRX	8
1.5. Mecanismo de reacción de PRX Q	8
1.6. Mecanismo de reacción de PRX II	8
2.1. Sitios de recolección de las especies de macroalgas usadas como modelo biológico	15
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> realizado en individuos juveniles de <i>L. nigrescens</i>	16
2.3. Reacción de formación del complejo entre ácido bicinconínico y cobre (BCA Cu⁺) para la cuantificación de proteínas.	18
2.4. Determinación de consumo de H₂O₂ mediante la formación del complejo ferrotiocianato (FeSCN²⁺)	19
2.5. Determinación de la actividad PRX, usando TRX o GRX como agente reductor	20
2.6. Reacción de formación del aducto entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA)	21
2.7. Representación gráfica de los parámetros medidos mediante fluorimetría	22
3.1. Actividad basal PRX	27
3.2. Actividad PRX a las 96 h de tratamiento con distintas concentraciones de cobre	29
3.3. Control de actividad catalasa	30
3.4. Actividad PRX en su reacción acoplada a TRX y GRX	32

3.5. Cuantificación de lipoperóxidos y medición de eficiencia máxima del fotosistema II	34
3.6. Velocidad de activación de peroxirredoxinas	36
3.7. Detección de PRX mediante inmunofluorescencia	39
3.8. Control de especificidad de los anticuerpos empleados en inmunofluorescencia	40
4.1. Protección frente a la formación de lipoperóxidos mediada por peroxirredoxinas	45

ÍNDICE DE TABLAS

1.1. Resumen de las distintas peroxirredoxinas estudiadas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
---	----------

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ABC	Transportador tipo ATP binding cassette
ANOVA	Análisis de varianza
AP	Ascorbato peroxidasa
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grados Celsius
CAT	Catalasa
Cys	Cisteína
DTT	Ditiotreitol
<i>F_o</i>	Fluorescencia basal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>F_m</i>	Fluorescencia máxima
FSII	Fotosistema II
<i>F_v</i>	Fluorescencia variable
g	Gramos
<i>g</i>	Fuerza centrífuga
GR	Glutación reductasa
GRX	Glutarredoxina
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
h	Hora

kDa	KiloDalton
L	Litro
LPX	Lipoperóxido
m	Metro
M	Molaridad
mA	MiliAmperio
MDA	Malondialdehído
min	Minuto
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Tampón salino fosfato
pH	Unidad de acidez
<i>pI</i>	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PRX	Peroxirredoxina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Segundo
<i>t</i>-BOOH	Ter-butil hidroperóxido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TrR	Tiorredoxina reductasa
TRX	Tiorredoxina
UV	Ultravioleta
V	Voltio
ϵ	Coefficiente de extinción molar

RESUMEN

El cobre es un micronutriente esencial, pero a altas concentraciones puede inducir la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando una condición de estrés oxidativo. En sitios costeros contaminados por cobre, prevalecen sólo algunas especies de macroalgas, como *Scytosiphon lomentaria* y *Ulva compressa*, las que presentan mecanismos eficientes de tolerancia al metal. Contrariamente, la macroalga parda *Lessonia nigrescens*, ecológicamente importante en la zona intermareal, se encuentra ausente en sitios contaminados por cobre y presenta mecanismos de tolerancia al metal insuficientes. Recientemente, en *Scytosiphon gracilis*, macroalga parda que presenta mecanismos de tolerancia similares a los descritos en *S. lomentaria*, se identificaron proteínas involucradas en la tolerancia al estrés por cobre, entre las que se encuentran las peroxirredoxinas (PRXs), enzimas capaces de reducir peróxido de hidrógeno, alquilhidroperóxidos y peroxinitritos, escasamente estudiadas en macroalgas. Estas enzimas reaccionan a bajas concentraciones de peróxidos en comparación a otras enzimas como catalasa y son susceptibles a inactivación a elevadas concentraciones de peróxidos. En el presente trabajo, se estudió la activación PRXs en respuesta al estrés oxidativo generado por cobre en las algas pardas *S. gracilis* y *L. nigrescens*, cultivadas en presencia de concentraciones crecientes del metal (5 a 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, más un control sin adición de cobre) durante 96 h. Se evaluó marcadores de daño oxidativo, como la generación de lipoperóxidos y la pérdida de eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m). Adicionalmente, se realizó estudios de inmunofluorescencia para detectar PRXs en ambas especies.

Los resultados indicaron que las PRXs mostraron afinidad tanto por peróxido de hidrógeno como por ter-butil hidroperóxido como sustratos y se observó un aumento de la actividad usando DTT como agente reductor a partir de 5 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. Los niveles de actividad PRX en *S. gracilis* fueron superiores a los de *L. nigrescens* en todas las concentraciones del metal evaluadas e incluso en individuos no expuestos al metal (i.e.

actividad basal). Los valores máximos de actividad PRX se registraron en $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ en *S. gracilis* y en $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ en *L. nigrescens*. En ambas especies se detectó un aumento de la actividad PRX acoplada a tiorredoxina, pero la actividad PRX acoplada a glutarredoxina sólo aumentó en *S. gracilis*. Se observó inhibición de la actividad PRX a partir de $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ en *L. nigrescens* y en *S. gracilis* a partir de $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$. Este fenómeno coincidió en ambas especies con un aumento de lipoperóxidos, lo que sugiere que las PRXs controlarían los niveles de lipoperóxidos generados por estrés oxidativo. Respecto a la medición de eficiencia fotosintética, si bien se observó un efecto del cobre sobre los fotosistemas en ambas especies, resultó ser un parámetro menos sensible que los lipoperóxidos y no hubo diferencias a nivel global entre las especies. Análisis de inmunofluorescencia mostraron que en *L. nigrescens* no variaron los niveles proteicos de PRX en individuos tratados con 10 y $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ respecto a su control y que en *S. gracilis* aumentan los niveles proteicos de PRX en individuos tratados con $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ y disminuye en $300 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, coincidiendo con los resultados de actividad enzimática.

Los resultados sugieren que las PRXs participan en la tolerancia al estrés por cobre, actuando como una barrera antioxidante, siendo más eficientes en *S. gracilis* que en *L. nigrescens*. La actividad de las PRXs en *S. gracilis* ayuda a explicar funcionalmente la capacidad de esta especie de tolerar ambientes contaminados con altos niveles de cobre, mediante la reducción de peróxidos y posiblemente mediante el control de vías de señalización redox, que regulan la adaptación de esta especie a sitios contaminados por cobre. En el caso de *L. nigrescens*, la pérdida de actividad de las PRXs frente a bajas concentraciones de cobre ayudaría a explicar el grave daño celular que se genera en esta especie y, a nivel ecológico, el impedimento que esto le genera para colonizar ambientes contaminados por el metal.

ABSTRACT

Copper is an essential micronutrient, but at high concentrations can induce the synthesis of reactive oxygen species (ROS), generating a condition of oxidative stress. In coastal copper-impacted sites, prevail only a few species of macroalgae, such as *Scytosiphon lomentaria* and *Ulva compressa*, which have efficient metal tolerance mechanisms. Conversely, the brown seaweed *Lessonia nigrescens*, environmentally important in the intertidal zone, is absent from copper-impacted sites and presents insufficient metal tolerance mechanisms. Recently, in *Scytosiphon gracilis*, brown seaweed that presents similar tolerance mechanisms to those described in *S. lomentaria*, proteins involved in tolerance to copper-induced stress were identified, among them, peroxiredoxins (PRXs). These enzymes are capable to reduce hydrogen peroxide, alkylhydroperoxides and peroxyinitrites, and have been poorly studied in macroalgae. These enzymes react at low concentrations of peroxides in comparison to other enzymes such as catalase and are susceptible to inactivation at high concentrations of peroxides. In this work, the PRX activation was studied in response to copper-induced oxidative stress in brown algae *S. gracilis* and *L. nigrescens* cultured with increasing concentrations of the metal (5 to 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, and a control without copper addition) for 96 hours. Oxidative damage markers, such as the generation of lipoperoxides and loss of photosystem II efficiency (F_v/F_m) were evaluated. Additionally, an immunofluorescence study was carried out in order to detect PRXs in both species.

The results indicated that the PRXs showed affinity for both hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide as substrates, and an increase in activity was observed using DTT as a reducing agent from 5 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. PRX activity in *S. gracilis* was superior to *L. nigrescens* in all the copper concentrations assessed and even in individuals not exposed to the metal (i.e. basal activity). The maximum values of PRX activity occurred at 40 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ in *S. gracilis* and at 10 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ in *L. nigrescens*. An increase of PRX activity coupled to thioredoxin was detected in both species, but PRX activity coupled to

glutaredoxin only increased in *S. gracilis*. It was observed loss of PRX activity from 20 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ in *L. nigrescens* and *S. gracilis* from 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. This phenomenon coincided in both species with an increase of lipoperoxides, which suggests that the PRXs would control the levels of oxidative stress-generated lipoperoxides. Respect to the measurement of photosystem II efficiency, while an effect of copper on the photosystems in both species was observed, this marker was less sensitive than the lipoperoxides and there was no overall differences between the species. Immunofluorescence analysis showed that in *L. nigrescens* treated with 10 and 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ PRX levels did not suffer any change respect to the control. In *S. gracilis* there was an increase of PRX levels in individuals treated with 40 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ and a decrease at 300 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, coinciding with the results of enzymatic activity.

The results suggest that the PRXs are involved in tolerance to copper-induced stress, acting as an antioxidant barrier, being more efficient in *S. gracilis* than in *L. nigrescens*. The PRX activity in *S. gracilis* helps to explain the ability of this species to tolerate copper-enriched environments, through the reduction of peroxides and possibly through the control of redox signaling pathways that regulate the adaptation of this species to polluted sites. In the case of *L. nigrescens*, the loss of activity of the PRXs at low copper concentrations would help to explain the severe cellular damages that occur in this species, and ecologically, the impediment of *L. nigrescens* to colonize copper-enriched environments.

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Estrés oxidativo inducido por cobre

Entre los metales, el cobre (Cu) se caracteriza por ser un micronutriente esencial, pero en exceso puede desplazar a otros metales que son cofactores enzimáticos o nutrientes esenciales como el hierro (Tapiero y cols., 2003) y puede participar en reacciones de óxido-reducción generando especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bremner, 1998).

Las ROS, en términos generales, se generan a partir de la excitación de una molécula de O₂ y la formación de oxígeno singulete (¹O₂) o a través de la transferencia de uno, dos o tres electrones hacia el O₂, lo que resulta en la formación de radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o radical hidroxilo (OH⁻), respectivamente (Baker y Orlandi, 1995). Las ROS pueden ser originadas por procesos normales como la fotosíntesis (Asada, 1999) y respiración (Kowaltowski y cols., 2009) o ser inducidas por diversos factores bióticos o abióticos como desecación, salinidad, y exceso de metales como el cobre, entre otros (Fujita y cols., 2006). En sistemas biológicos el Cu²⁺, en presencia de superóxido o de agentes reductores como ácido ascórbico o glutatión, puede ser reducido a Cu⁺, el que puede catalizar la formación de radicales hidroxilos a partir de peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Haber-Weiss (Bremner, 1998).

A diferencia del oxígeno atmosférico, las ROS son capaces de dañar oxidativamente diversos componentes de la célula como membranas, proteínas o ácidos nucleicos, pudiendo llevar finalmente a la muerte celular (Buettner, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1984; Powell, 2000). Al mismo tiempo, las ROS pueden participar en vías de señalización o en la activación de sistemas de defensa (Mittler, 2002).

La respuesta primaria al incremento de ROS en la mayoría de los organismos incluye el uso de compuestos antioxidantes como ascorbato y glutatión, además de la activación de enzimas (Noctor y Foyer, 1998; Smirnoff, 2000). Entre las enzimas más comunes están las que pertenecen al ciclo de Haliwell-Asada como la ascorbato peroxidasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa, además de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa (Asada, 1999). Sin embargo, cuando el incremento de ROS no puede ser neutralizado por estos mecanismos antioxidantes, se genera en los organismos una condición fisiológica conocida como estrés oxidativo (Sies, 1991).

En Chile, la actividad minera del cobre, de importancia fundamental para la economía nacional, es la fuente más significativa de contaminación por este metal en el medio ambiente. En el norte de Chile varias zonas costeras, lejanas en muchos casos del punto de origen de los desechos, han sido afectadas negativamente por la descarga de los desechos de la minería del cobre (Castilla y Nealler, 1978; Fariña y Castilla, 2001; Vásquez y cols., 1999). Una de las zonas afectadas es la bahía de Chañaral. Desde 1978 se han realizado estudios en el borde costero afectado por estos desechos y la variación de sus comunidades bentónicas, en los que se ha demostrado que los efectos más importantes asociado a la descarga de desechos son: la alta concentración de cobre persistente en aguas costeras, progradación de las playas (es decir, que las playas crezcan mar adentro) y la eliminación de varias especies de algas, herbívoros bentónicos y todos los carnívoros bentónicos de la zona afectada (Castilla 1983; Correa y cols., 2000; Medina y cols., 2005).

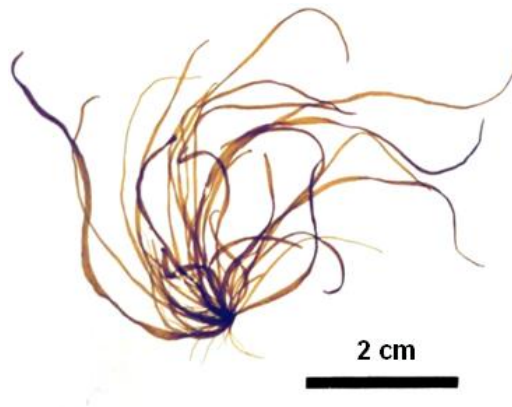
Las algas situadas en la zona intermareal comúnmente toleran condiciones extremas y fluctuaciones constantes del ambiente como resultado de los ciclos de marea, lo que resulta en condiciones de estrés por factores como desecación, alta salinidad, radiación y cambios de temperatura (Collén y Davison, 1999; Contreras y cols., 2005; Contreras y cols., 2009; Contreras-Porcía y cols., 2011 a). En el caso de estrés por cobre, se ha visto que en los sitios contaminados por este metal hay una disminución notoria de la

diversidad de especies respecto a sitios no contaminados, prevaleciendo sólo especies como *Scytosiphon lomentaria* (Ochrophyta, Scytosiphonales) o *Ulva compressa* (Chlorophyta, Ulvales; Camus y cols. 2005; Castilla y Correa, 1997; Medina y cols. 2005). Estas especies son capaces de bioacumular altos niveles de cobre (Andrade y cols., 2006) y de atenuar el estrés oxidativo causado por este metal mediante diversos mecanismos fisiológicos. En *U. compressa* las respuestas de tolerancia incluyen el consumo de glutatión, compuestos fenólicos, la acumulación de ascorbato como dehidroascorbato y la activación de la enzima ascorbato peroxidasa (Ratkevicius y cols, 2003). En el caso del alga parda *S. lomentaria*, a diferencia de *U. compressa*, el estrés oxidativo por cobre es atenuado no sólo por la ascorbato peroxidasa y el consumo de compuestos antioxidantes, sino además por la activación de catalasa, mono-dehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión peroxidasa (Contreras y cols., 2005; Contreras y cols., 2007). Estas especies que prevalecen en sitios contaminados también están presentes en el resto del borde costero y se ha demostrado, en el caso de *S. lomentaria*, que los mecanismos de atenuación del estrés por cobre están conservados dentro de la especie, sin importar la procedencia de los individuos, pudiendo ser estos mecanismos inducibles y reversibles (plásticos) en presencia o ausencia de cobre. No se han identificado, hasta ahora, características adquiridas por parte de individuos de sitios contaminados que los diferencien de individuos de zonas no contaminadas, es decir, no habría un ecotipo de *S. lomentaria* tolerante a cobre. Además, estas respuestas de alta tolerancia al metal han sido reconocidas en otra especie del género *Scytosiphon*, como *S. gracilis* (Ochrophyta, Scytosiphonales; Figura 1.1.A), lo cual indica que esta capacidad de tolerancia a estrés oxidativo es un rasgo constitutivo en estas especies (Contreras y cols. 2007).

Contrariamente, no se encuentra estas respuestas antioxidantes de tolerancia en algas pardas que no están presentes en los bordes costeros con altos niveles de cobre, como lo es *Lessonia nigrescens* (Ochrophyta, Laminariales; Figura 1.1.B). Esto queda demostrado por los altos niveles de lipoperóxidos y ROS que son inducidos en plantas expuestas a cobre y por una activación deficiente de las enzimas antioxidantes en

comparación, por ejemplo, con *S. lomentaria* (Contreras y cols., 2009). La ausencia de *L. nigrescens* de estos sitios contaminados es de particular importancia ecológica, porque en sitios no contaminados es el alga de mayor tamaño y abundancia en la franja intermareal-submareal (Vásquez y Santelices, 1984) y su ausencia impacta directamente la biodiversidad del borde costero ya que los discos de *L. nigrescens* y el dosel generado por sus frondas son hábitat casi exclusivo para varias especies de invertebrados y algas (Cancino y Santelices, 1984).

(A)



(B)



FIGURA 1.1. Hábito de individuos juveniles de *S. gracilis* (A) y *L. nigrescens* (B).

Recientemente se han buscado más elementos de respuesta al estrés por cobre en las algas tolerantes al metal. En *U. compressa* se identificó genes involucrados en la tolerancia al cobre y se determinó que corresponden a proteínas que forman parte de los mecanismos de homeostasis de metales (metalotioneínas), transportadores de metales (ABC), enzimas antioxidantes como **peroxirredoxina** y factores involucrados en la expresión génica (Contreras y cols., 2011 b). En individuos de *S. gracilis* expuestos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre por 4 días, se evaluó el efecto del metal sobre los niveles de expresión de proteínas mediante un análisis de electroforesis bidimensional (Figura 1.2), encontrando proteínas sobre-expresadas las cuales podrían estar participando en la respuesta antioxidante (Contreras y cols., 2010). Entre estas proteínas, al igual que en *U. compressa*, destaca la **peroxirredoxina**, enzima involucrada en la atenuación del estrés oxidativo por su capacidad de reducir peróxido de hidrógeno, alquilhidroperóxidos y peroxinitritos en agua, el alquil-alcohol correspondiente y nitrito, respectivamente (Dayer y cols., 2008; Dietz y cols., 2006; Tripathi y cols., 2009).

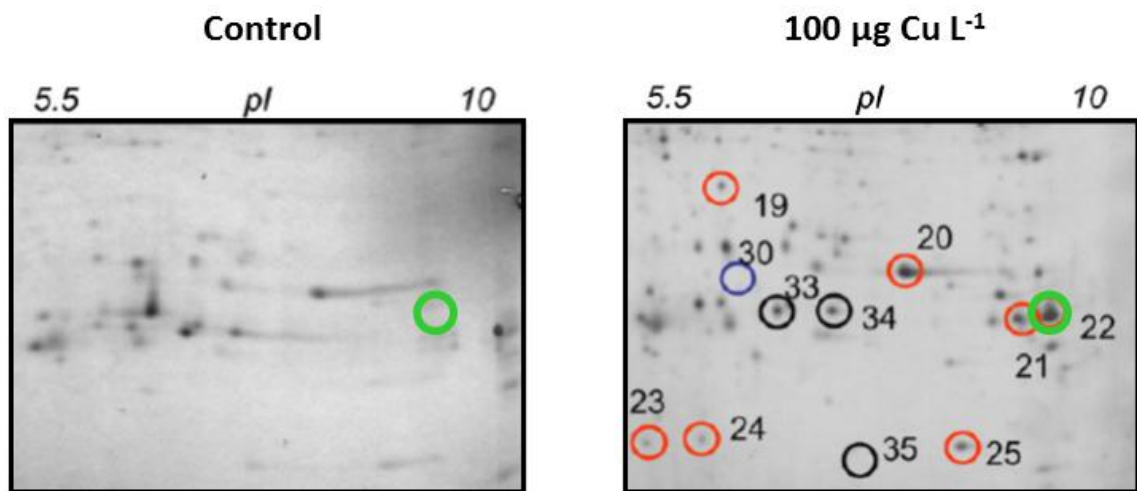


FIGURA 1.2. Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional en *S. gracilis* cultivada sin y con $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$. La proteína marcada en verde corresponde a una peroxirredoxina con un punto isoeléctrico (*pI*) de 9,5 y un peso molecular de 18 kDa, cuya expresión es inducida por cobre (imagen de Contreras y cols., 2010).

1.1.2. Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (PRX) son enzimas presentes en todos los organismos, con la excepción, hasta la fecha, de bacterias del género *Borrelia* (Hall y cols., 2009). Estructuralmente, presentan una o dos cisteínas (Cys) en su sitio activo, donde el grupo tiol libre es oxidado por peróxidos a ácido sulfénico y posteriormente es reducido a su forma original por diferentes agentes reductores externos según el tipo de PRX. Los dos agentes reductores más comunes para las PRXs son las enzimas tiorredoxina y glutarredoxina (Rouhier y Jacquot, 2002). En plantas, la peroxirredoxina fue descrita por primera vez en 1996, siendo del tipo 2-Cys PRX (Baier y Dietz, 1996). Basándose principalmente en su mecanismo catalítico y localización subcelular, se han distinguido cuatro grupos de peroxirredoxinas: 1-Cys PRX, 2-Cys PRX, PRX Q y PRX II (Dietz y cols., 2002; Tripathi y cols., 2009; Tabla 1.1).

Tipo	n° Cys	Forma funcional	Agente reductor	Subclase	Posición Cys	Localización	PM (kDa)	Tamaño (aa)
1-Cys PRX	1	Monómero	TRX-h	-	46	Núcleo	24,1	216
2-Cys PRX	2	Dímero	TRX-x	2-Cys PRX A	36,158	Cloroplasto	29,1	266
				2-Cys PRX B	36,158	Cloroplasto	29,6	271
PRX Q	2	Monómero	TRX-y	-	54,59	Cloroplasto	23,7	216
PRX II	2	Monómero	GRX	PRX II A	51,76	Citosol	62,7	553
				PRX II B	51,76	Citosol	17,4	162
				PRX II C	51,76	Citosol	17,4	162
				PRX II D	51,76	Citosol	17,4	174
				PRX II E	51,76	Cloroplasto	24,7	234
				PRX II F	59,84	Mitocondria	21,2	199

TABLA 1.1. Resumen de las distintas peroxirredoxinas estudiadas en *Arabidopsis thaliana* (Tripathi y cols., 2009).

1-Cys PRX: Posee sólo una Cys conservada catalítica y estaría involucrada en la protección del DNA frente a estrés oxidativo en el núcleo (Stacy y cols., 1996; Mowla y cols., 2002). El mecanismo de regeneración de la forma reducida de la 1-Cys PRX estaría dado por el sistema tiorredoxina *h* - NADPH tiorredoxina reductasa (Pulido y cols., 2009; Figura 1. 3).

2-Cys PRX: Estructuralmente es un homodímero que presenta dos residuos de Cys por subunidad (Dietz y cols., 2002). En su ciclo catalítico se forma un puente disulfuro entre Cys de ambas subunidades (Konig y cols., 2003). En plantas se localiza exclusivamente en cloroplastos (Baier y Dietz., 1997) y su reducción es catalizada por tiorredoxina *x*, (Collin y cols., 2003; Figura 1. 4).

PRX Q: Enzima monomérica localizada en el cloroplasto, en la proximidad del fotosistema II, con un rol protector en la fotosíntesis (Lamkemeyer y cols., 2006). Su reducción es catalizada por la tiorredoxina *y* (Collin y cols., 2004; Figura 1. 5).

PRX tipo II: Se han identificado 6 isoformas expresadas en plantas (Dietz y cols., 2006) y poseen dos residuos de Cys en el mismo polipéptido. Estas PRXs son reducidas por el sistema glutarredoxina/glutati6n en lugar de las tiorredoxinas (Rouhier y Jacquot 2002; Figura 1. 6). Están localizadas tanto a nivel citoplasmático como en cloroplastos y mitocondrias y se ha propuesto que descomponen el H₂O₂ que escapa de las otras enzimas antioxidantes, como catalasa o ascorbato peroxidasa (Dietz y cols., 2002).

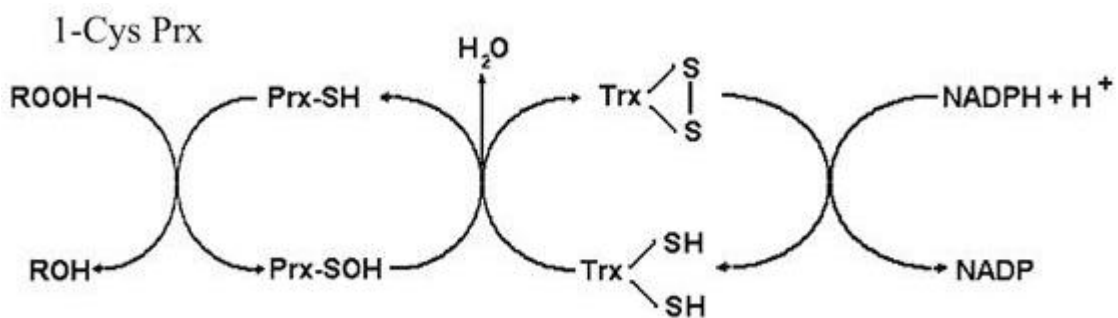


FIGURA 1.3. Mecanismo de reacción de 1-Cys PRX.

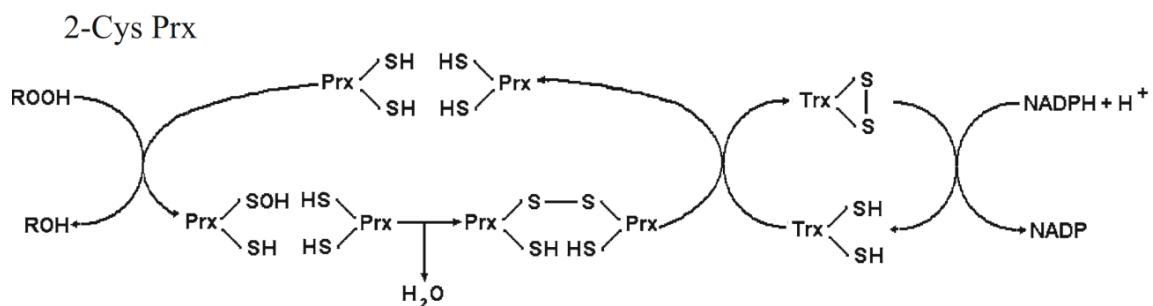


FIGURA 1.4. Mecanismo de reacción de 2-Cys PRX.

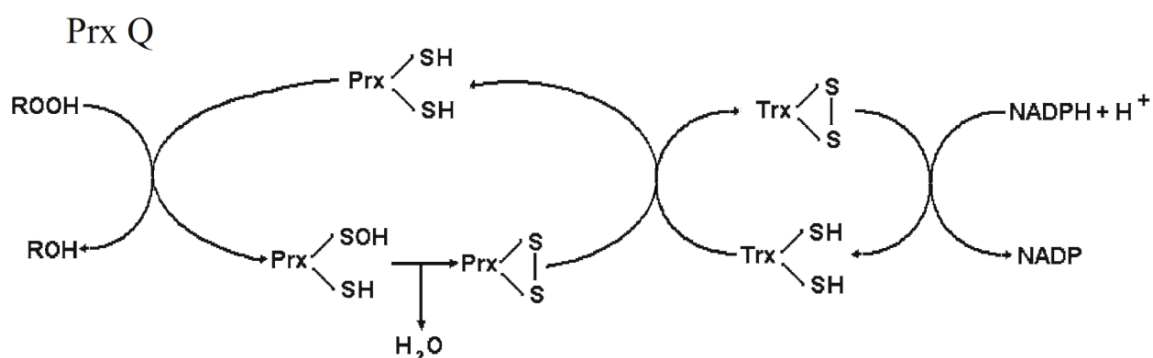


FIGURA 1.5. Mecanismo de reacción de PRX Q.

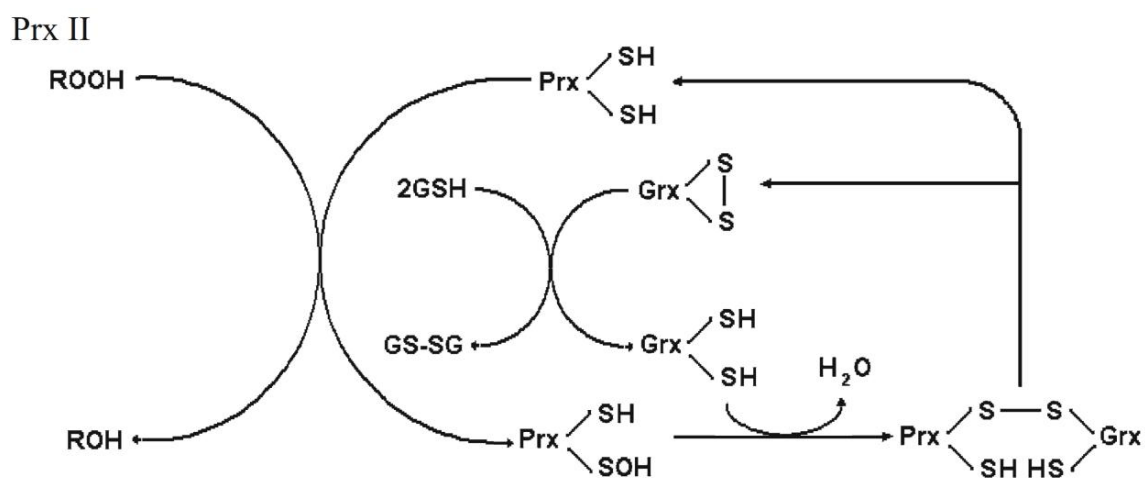


FIGURA 1.6. Mecanismo de reacción de PRX tipo II.

Las clases de PRXs halladas en plantas, a excepción de PRX Q, han sido reconocidas también en mamíferos, los que presentan seis tipos de peroxirredoxinas identificadas: PRX I-IV (2-Cys PRX en plantas), PRX V (PRX tipo II en plantas) y PRX VI (1-Cys PRX en plantas).

Los dos sistemas reductores de las diversas PRXs son las tiorredoxinas (TRXs) y las glutarredoxinas (GRXs), ambos sistemas enzimáticos con un mecanismo catalítico tiol dependiente similar al de las PRXs. Las tiorredoxinas (TRXs) fueron descubiertas en los 70s como reguladoras de varias enzimas cloroplásticas, aunque también se han descubierto y caracterizado a nivel mitocondrial y citoplasmático y son reducidas a través de la tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (Meyer y cols., 2008). En *A. thaliana* se ha demostrado que las TRXs son agentes reductores de 1-Cys PRX, 2 Cys-PRX y PRX Q (Tabla 1.1; Tripathi 2009). Las glutarredoxinas (GRXs) son un conjunto de enzimas que comparten baja similitud en su secuencia con las TRXs y que son reducidas directamente por glutatión, por lo que su actividad se ve regulada indirectamente por glutatión reductasas, las que a su vez son enzimas dependientes de NADPH (Meyer y cols., 2008). En *A. thaliana* se ha determinado que las GRXs reducen exclusivamente a las PRXs de tipo II (Tabla 1.1.; Tripathi y cols., 2009).

La investigación sobre las PRXs y su función ha experimentado un incremento acelerado en los últimos años (Hall y cols., 2009). Las peroxirredoxinas juegan un importante rol en la atenuación de ROS generadas por distintos factores de estrés y además participan en la modulación de cascadas de señalización redox-dependientes (Foyer y Noctor, 2009; Tripathi y cols., 2009). En humanos, se ha visto que la 1-Cys PRX ayudaría a mantener la integridad de la barrera hematoencefálica (Schreibelt y cols., 2008). Por otro lado, en casos de cáncer, las PRXs facilitan la supervivencia de células malignas y la resistencia de éstas a radioterapia (Zhang y cols., 2009). Las PRXs también estarían involucradas en la fisiopatología de enfermedades causadas por parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania spp* y *Plasmodium*

falciparum, específicamente en su resistencia a las ROS generadas por el sistema inmune del hospedero, favoreciendo así el proceso de invasión (Deponte y cols., 2007).

1.1.3. Peroxirredoxinas en algas

Se ha comprobado la función protectora de las diversas peroxirredoxinas frente a diversos factores de estrés en diversos organismos (Tripathi y cols., 2009). Sin embargo, en algas los estudios son casi nulos. En estos organismos, el gen correspondiente a la peroxirredoxina fue identificado por primera vez en *Porphyra purpurea* (Rhodophyta, Bangiophyceae; Reith y Munholland, 1993) y se reveló posteriormente que tenía homología con la 2-Cys PRX de plantas superiores (Baier y Dietz, 1997). Posteriormente, la PRX fue detectada en *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta, Volvocales), donde se identificó y caracterizó como 2-Cys PRX (Goyer y cols., 2002) y, posteriormente, al analizar el genoma de *C. reinhardtii*, se han identificado un total de siete genes para PRX (Dayer y cols., 2008). En *S. gracilis*, se identificó una PRX mediante electroforesis bidimensional, cuya expresión aumentó significativamente frente a estrés por cobre (Contreras y cols., 2010) y tiene un peso molecular cercano al de la subclase de peroxirredoxina tipo II de *A. thaliana* (Tabla 1.1). En *U. compressa* se identificó el gen correspondiente a PRX y se determinó que tanto su expresión como la actividad enzimática PRX acoplada a GRX son inducidas en respuesta a estrés por cobre (Contreras-Porcía y cols., 2011 b). Por otra parte, frente a otro tipo de estrés ambiental como es la desecación, la actividad PRX incrementa significativamente en *Porphyra columbina* (Rhodophyta, Bangiophyceae) como mecanismo de tolerancia a este estrés (Contreras-Porcía y cols., 2011 a). Por lo tanto, las PRXs jugarían un rol pivotal en la tolerancia al estrés oxidativo en macroalgas, y particularmente como mecanismo de atenuación del estrés oxidativo causado por el cobre.

1.2. HIPÓTESIS

Considerando i) la capacidad de *Scytosiphon gracilis* para tolerar altos niveles de cobre, ii) la baja tolerancia de *Lessonia nigrescens* a dicho metal y iii) teniendo en cuenta el papel asignado a las peroxirredoxinas, la actividad enzimática peroxirredoxina es mayor en *Scytosiphon gracilis* que en *Lessonia nigrescens*, en respuesta al estrés oxidativo generado por altos niveles de cobre.

1.3. OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis funcional de las peroxirredoxinas en las algas pardas *S. gracilis* y *L. nigrescens* comparando la activación de éstas bajo estrés generado por cobre.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1: Demostrar actividad peroxirredoxina y el tipo de agente reductor acoplado a esta enzimas, en las especies *S. gracilis* y *L. nigrescens* en respuesta a tratamientos con cobre y evaluar marcadores de daño oxidativo.

OBJETIVO 2: Evaluar la velocidad de activación de las peroxirredoxinas en *S. gracilis* y *L. nigrescens* expuestas a cobre.

OBJETIVO 3: Determinar, mediante inmunofluorescencia, variación en los niveles proteicos de las peroxirredoxinas (PRXs) en *S. gracilis* y *L. nigrescens*.

2. METODOLOGÍA

2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1. Objetivo 1: Demostrar actividad peroxirredoxina (PRX) y el tipo de agente reductor acoplado a esta enzima, en las especies *S. gracilis* y *L. nigrescens* en respuesta a tratamientos con cobre y evaluar marcadores de daño oxidativo.

Individuos de ambas especies fueron expuestos durante 96 h a distintas concentraciones de cobre: 5, 10, 20, 40 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, como también en agua de mar sin adición del metal (condición control). Estas concentraciones fueron seleccionadas en base a observaciones que muestran una activación significativa de otras enzimas antioxidantes en *S. lomentaria* (Contreras y cols., 2009) y un aumento en los niveles proteicos de PRX en *S. gracilis* (Contreras y cols., 2010). En el caso de *L. nigrescens*, bajo concentraciones de 20, 40 y 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, se ha observado tanto activación como inactivación enzimática (Contreras y cols., 2009).

Parámetros determinados: Se midió actividad PRX usando ditioneitol (DTT), tiorredoxina (TRX) y glutarredoxina (GRX) como agentes reductores. Como marcador de daño oxidativo, se determinó los niveles de lipoperóxidos. Adicionalmente, en *S. gracilis* también se midió actividad PRX en individuos tratados con 300 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ por 96 h. Finalmente, el efecto del cobre a nivel fisiológico fue evaluado determinando F_v/F_m (eficiencia máxima del Fotosistema II) de plantas expuestas a las distintas concentraciones del metal.

2.1.2. Objetivo 2: Evaluar la velocidad de activación de las peroxirredoxinas en *S. gracilis* y *L. nigrescens* en respuesta a cobre.

Se expuso individuos de *S. gracilis* y *L. nigrescens* a la concentración de cobre en la que se detectó mayor actividad PRX en cada especie (Objetivo 1). Además, se incorporó al análisis individuos expuestos a una concentración común para ambas especies y en agua de mar sin adición de cobre (condición control). La actividad PRX y los niveles de lipoperóxidos fueron realizadas a las 4, 12, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo.

2.1.3. Objetivo 3: Determinar, mediante inmunofluorescencia, variación en los niveles proteicos de las peroxirredoxinas (PRXs) en *S. gracilis* y *L. nigrescens*.

Este experimento tuvo por objetivo determinar la variación en los niveles proteicos de las PRXs en respuesta al estrés por cobre. Esto fue realizado mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-PRX en secciones transversales de individuos de *S. gracilis* y *L. nigrescens* expuestos a agua de mar con la concentración de cobre en donde se registró la máxima actividad enzimática PRX (objetivo 1) y a agua de mar sin adición de cobre (condición control). Además, también se realizaron observaciones a la concentración del metal que gatilló una disminución en la actividad enzimática en cada especie, con el fin de evaluar si esta disminución fue generada por una inhibición enzimática o por una disminución en los niveles proteicos. Se utilizó como control positivo del experimento, secciones transversales de individuos de *U. compressa*, especie de la que se obtuvo la secuencia peptídica para elaborar el anticuerpo anti-PRX y altamente tolerante a cobre. Para esto, individuos de *U. compressa* fueron tratados en 10 μ M de cobre, concentración a la cual se observó un aumento significativo en la expresión del gen *prx* (Contreras-Porcía y cols., 2011 b). Adicionalmente, se incorporó como control, individuos de *U. compressa* en medio sin adición del metal.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Recolección de muestras, agua de mar y preparación del material de vidrio

Los sitios de recolección de tejido algal fueron plataformas rocosas ubicadas en las zonas costeras de Las Cruces (33° 30' S, 71° 37' W) y Maitencillo (32° 39,5' S, 71° 26,6' W; V Región, Chile), sitios considerados control, es decir, sin historial de contaminación por metales pesados y en los cuales existe una alta abundancia y diversidad de especies (Figura 2.1; Contreras y cols., 2005; Ratkevicius y cols., 2003). La colecta de las especies *S.gracilis* y *L. nigrescens* en estado inmaduro se realizó manualmente, durante períodos de marea baja, con la ayuda de espátula plástica para prevenir daño mecánico y contaminación por metales. Previo a los tratamientos de exposición a metal, las algas fueron lavadas en agua de mar filtrada a 0,22 μm , cepilladas y sonicadas para eliminar epífitos y materia orgánica. Posteriormente las algas fueron aclimatadas por 12 h en agua de mar filtrada a 0,22 μm a 14 ± 2 °C y densidad de flujo fotónico de 30 - 50 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$.

El agua de mar a utilizar provino de Las Cruces, la cual fue filtrada a 0,22 μm a través de filtros de membrana MF- MiliporeTM (Milipore) y mantenida en oscuridad a 11 °C hasta su utilización. Todo el material de vidrio que se utilizó fue lavado utilizando detergente no iónico (Extran® Merck), lavado en ácido nítrico 10% durante 24 h y finalmente enjuagado varias veces en agua ultra pura. Posteriormente, el material fue secado en campana y almacenado en bolsas plásticas hasta su utilización. Este procedimiento se realizó en un laboratorio con calidad de aire "puro" (10,000 partículas/ m^3 , Laboratorio de Metales, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile).

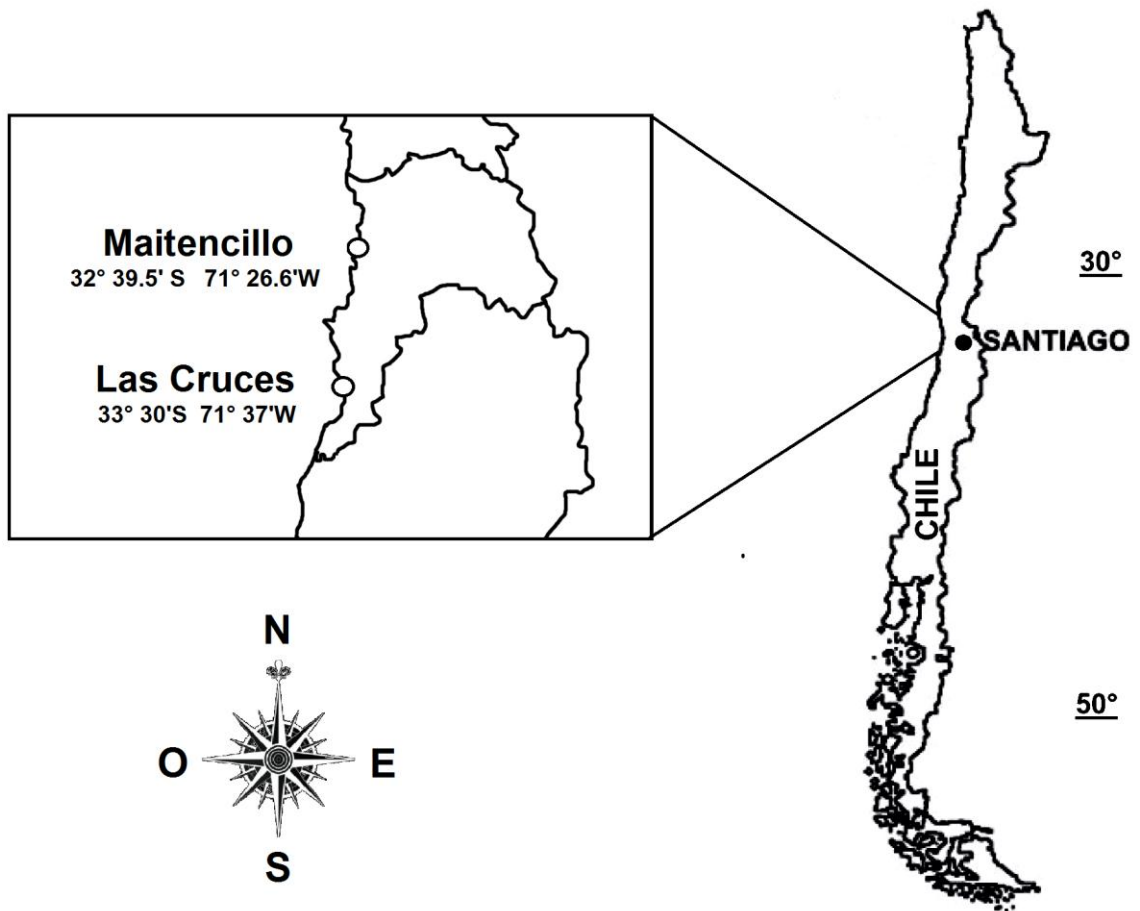


FIGURA 2.1. Sitios de recolección de las especies de macroalgas usadas como modelo biológico.

2.2.2. Tratamientos de *S. gracilis* y *L. nigrescens* con cobre

Individuos de *S. gracilis* y *L. nigrescens* (10 - 20 g de algas frescas) se incubaron en 1 L de agua de mar filtrada suplementada con 5, 10, 20, 40 y 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, usando un estándar de cloruro de cobre (Titrisol® MERCK) durante 96 h (Figura 2.2). Adicionalmente, en el presente estudio individuos de *S. gracilis* se trataron con 300 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. Cada tratamiento se realizó en triplicado. Los tratamientos se realizaron en

cámaras de cultivo a una temperatura de 14 ± 2 °C, densidad de flujo fotónico de 30 - 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad. El medio de cultivo fue cambiado cada 24 h y al finalizar el período experimental las muestras fueron congeladas a -80 °C hasta su posterior análisis. También fueron congelados individuos de *S. gracilis* y *L. nigrescens* tras el período de aclimatación previo a los tratamientos, para registrar los niveles basales de los parámetros a medir.



FIGURA 2.2. Cultivo *in vitro* realizado en individuos juveniles de *L. nigrescens*. Los individuos se incubaron bajo las condiciones de cultivo descritas en la sección 2.2.2, en matraces Erlenmeyer de 1L pretratados con ácido nítrico 10% tal como se describe en la sección 2.2.1.

2.2.3. Obtención y cuantificación de extractos proteicos

La obtención de extractos proteicos fue realizada de acuerdo a Contreras y cols. (2005). Para esto, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido, pulverizadas en mortero con ayuda de pistilo y homogenizadas en 20-30 mL de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 con β -mercaptoetanol 5 mM. El homogenizado fue descongelado a temperatura ambiente y filtrado con papel Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.). El líquido filtrado fue centrifugado a 9.050 x g por 20 min y las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con 0,7 g de sulfato de amonio (Merck) por mL de sobrenadante durante 2,5 h a 4 °C. Las proteínas fueron obtenidas mediante centrifugación a 9.000 x g por 1 h. El pellet proteico se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato y se centrifugó a 9.050 x g por 45 minutos para remover el sulfato de amonio remanente. El pellet se resuspendió en 1 mL de tampón fosfato y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) de acuerdo a Smith y cols. (1985), usando como estándar de concentración de proteínas albúmina de suero bovino (BSA). El método está basado en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en un medio alcalino en presencia de enlaces peptídicos (reacción de Biuret). El Cu^{+1} forma un complejo con 2 moléculas de BCA de color violeta, con un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm, directamente proporcional a la concentración de proteínas en el medio (Figura 2.3). La cuantificación se realizó usando un espectrofotómetro UV/Visible SmartSpec 3000 (BioRad).

2.2.4. Ensayo de actividad peroxirredoxina (PRX)

Se midió actividad PRX registrando el consumo de agua oxigenada (H_2O_2) ó *t*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH), un alquilperóxido que, tal como los lipoperóxidos, es sustrato de las PRXs (Rouhier y Jacquot, 2005). Para esto, entre 50 y 100 μg de extracto de proteínas fueron incubados con ditioneitol (DTT) 0,2 mM, preparado en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 durante 30 min a 37 °C. El DTT fue utilizado como agente reductor no

fisiológico de las PRXs (Rhee y cols., 2005) y como inhibidor de la catalasa (Kunce y cols., 1988).

La reacción para medir actividad se inició agregando H_2O_2 (o *t*-BOOH) 50 μM al extracto proteico incubado durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético (TCA), a una concentración final del 10% y centrifugando posteriormente a 18.660 x g por 10 min para precipitar las proteínas. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 700 μL , a la que se agregó 200 μL de sulfato de amonio ferroso ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) 10 mM y 100 μL de tiocianato de potasio (KSCN) 2,5 M. Se utilizaron estos compuestos ya que forman un complejo ferrotiocianato de color rojo en presencia de peróxidos (Thurman y cols., 1972). Por lo tanto, a mayor actividad enzimática hay una menor concentración de peróxidos y por lo tanto hay una menor formación de este complejo (Figura 2.4). La concentración de este complejo ferrotiocianato se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 480 nm, usando un espectrofotómetro UV/Visible SmartSpec 3000 (BioRad). La cuantificación de los peróxidos se realizó usando curvas de calibración con cantidades conocidas de H_2O_2 y *t*-BOOH, en el rango de 1 μM a 100 μM .

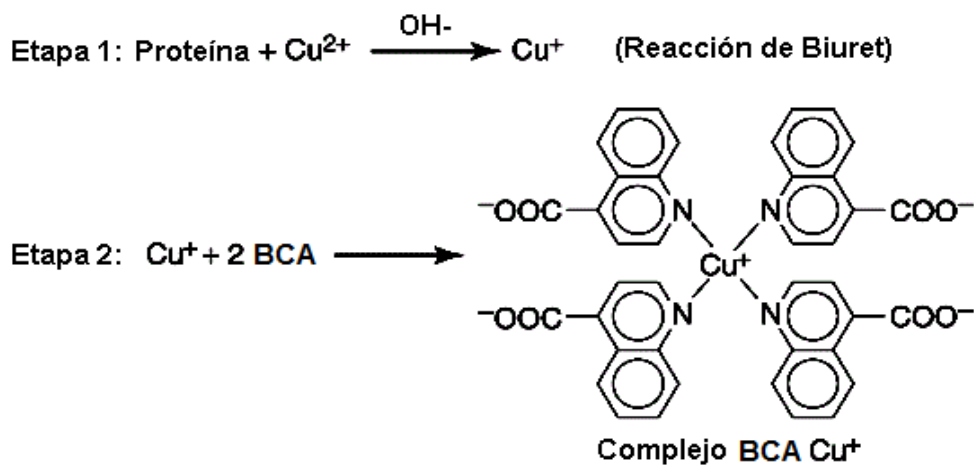


FIGURA 2.3. Reacción de formación del complejo entre ácido bicinonínico y cobre (BCA Cu^+) para la cuantificación de proteínas.

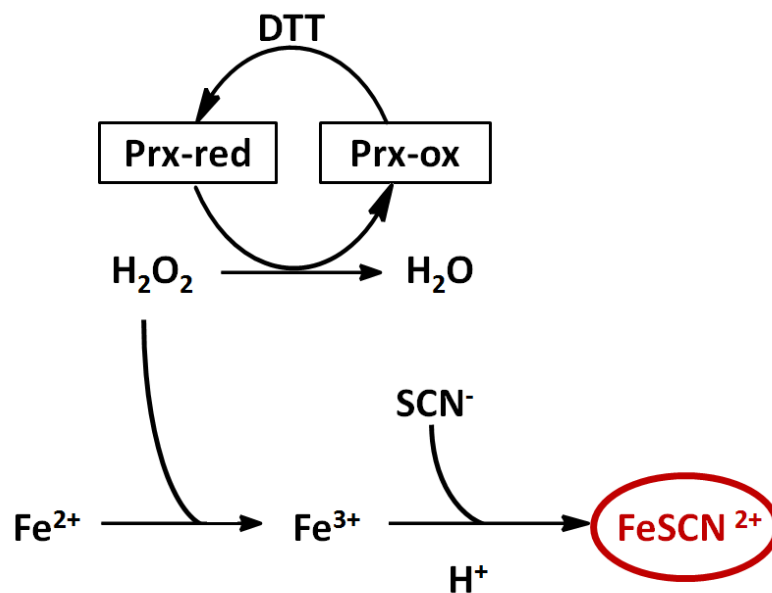


FIGURA 2.4. Determinación de consumo de H₂O₂ mediante la formación del complejo ferrotiocianato (FeSCN²⁺) según la metodología descrita en la sección 2.2.4.

2.2.5. Ensayo de actividad catalasa (CAT)

La actividad CAT se midió de acuerdo a Contreras y cols. (2005), para comprobar si el DTT, empleado como agente reductor de las PRXs, podría actuar como inhibidor de la actividad CAT tal como se había reportado previamente (Kunce y cols., 1988). La actividad CAT sin DTT se determinó adicionando H₂O₂ 10 mM a 100 µg de extracto proteínas, en un volumen final de 1 mL de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0. La actividad CAT fue determinada midiendo el consumo de H₂O₂ por 1 minuto a una longitud de onda de 240 nm. En el caso de la actividad CAT con DTT se incubó 100 µg del extracto de proteínas en tampón fosfato 0,1 M con DTT 0,2 mM, por 30 minutos a 37 °C. Luego se agregó H₂O₂ 10 mM y se midió su consumo por 1 min a una longitud de onda de 240 nm. Finalmente, en ambos casos la actividad CAT se calculó usando el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2.6. Ensayo de actividad peroxirredoxina acoplada a tiorredoxina

La actividad PRX acoplada a tiorredoxina (TRX) se determinó mediante el consumo de NADPH, agente reductor final de la reacción (Figura 2.5.A). A 50-100 μg de extracto de proteínas se adicionó H_2O_2 0,1 mM, 2U de TRX, 2U de TRX reductasa (TrR) y NADPH 0,15 mM, a 1 mL volumen final en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0. Se midió el consumo de NADPH a una longitud de onda de 340 nm por 1 min y la actividad enzimática se calculó usando el coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

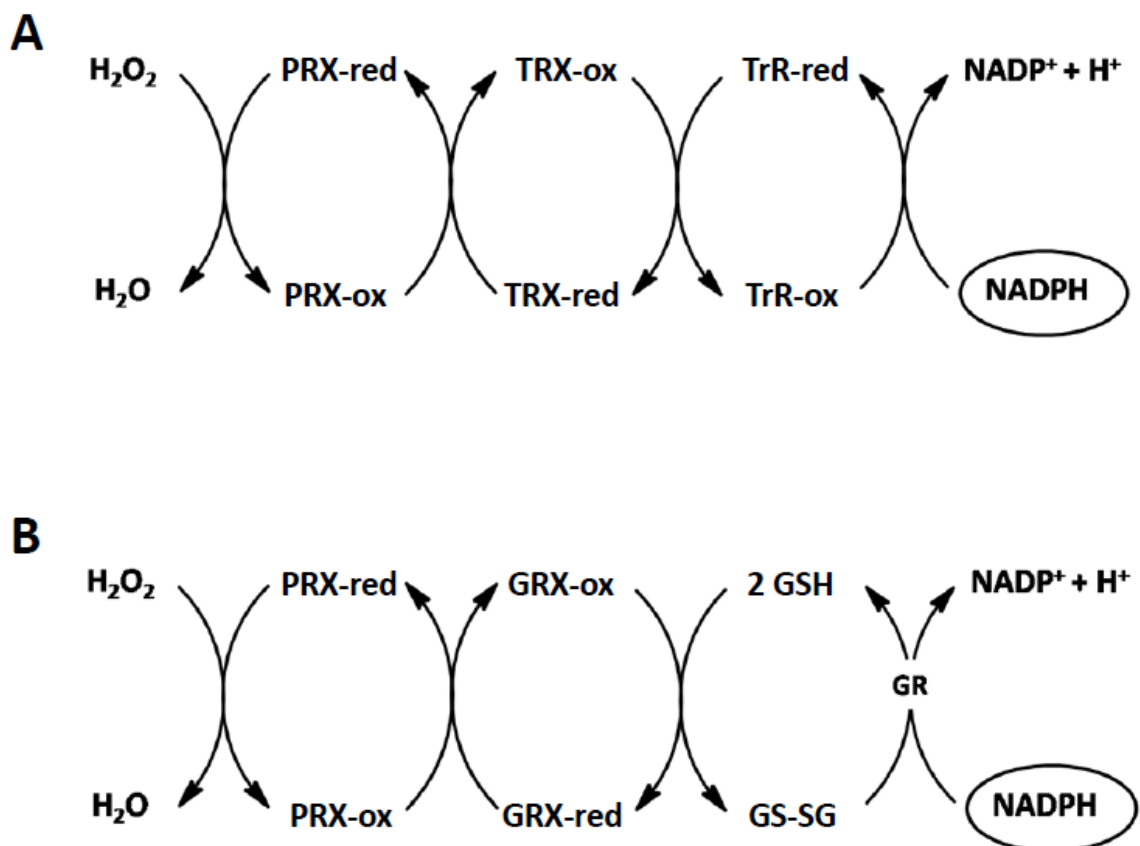


FIGURA 2.5. Determinación de la actividad PRX, usando TRX (A) o GRX (B) como agente reductor. En ambos casos la actividad se determinó cuantificando el consumo de NADPH, tal como se describe en las secciones 2.2.6 y 2.2.7.

2.2.7. Ensayo de actividad peroxirredoxina acoplada a glutarredoxina

La actividad PRX acoplada a glutarredoxina (GRX) se determinó mediante el consumo de NADPH, agente reductor final de la reacción (Figura 2.5.B). A 50-100 μg de extracto de proteínas se adicionó H_2O_2 0,1 mM, glutatión (GSH) 0,5 mM, 1U de glutatión reductasa (GR), 1U de GRX y NADPH 0,15 mM, a 1 mL volumen final en tampón fosfato 0,1 M pH 7.0. Se midió el consumo de NADPH a una longitud de onda de 340 nm por 1 min y la actividad enzimática se calculó usando el coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2.8. Determinación de lipoperóxidos

La determinación de lipoperóxidos tuvo por objetivo la estimación del daño oxidativo causado por cobre a membranas celulares y se realizó mediante el método de ácido tiobarbitúrico (TBA) de acuerdo a Ratkevicius y cols. (2003). Para esto, 1 g de tejido de alga (peso seco) fue congelado en nitrógeno líquido, pulverizado en mortero con ayuda de pistilo y homogenizado en 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. El homogenizado fue centrifugado a $9.500 \times g$ por 15 min y del sobrenadante se tomó una alícuota de 100 μL , a la cual se adicionó TBA 0,5% en TCA 20%, en un volumen final de 1 mL. La mezcla se incubó por 30 minutos a 100°C y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 512 nm usando un espectrofotómetro UV/Visible SmartSpec 3000 (BioRad). Para determinar la concentración de lipoperóxidos se utilizó el coeficiente de extinción molar del aducto formado por una molécula de malondialdehído con 2 moléculas de TBA ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Figura 2.6).

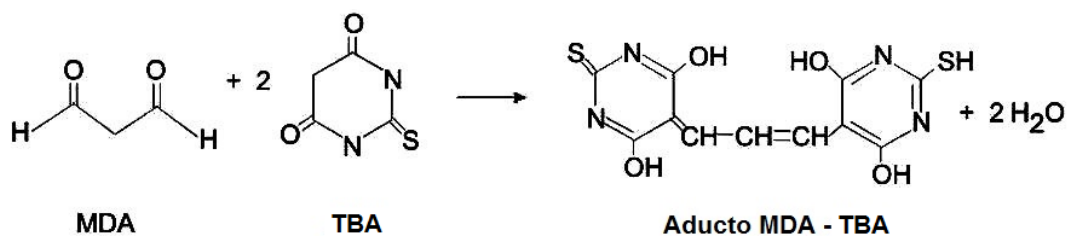


FIGURA 2.6. Reacción de formación del aducto entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) para la cuantificación de lipoperóxidos.

2.2.9. Medición de eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm)

Se midió Fv/Fm para detectar daño fisiológico causado por cobre a nivel del fotosistema II (FSII). Se realizó mediante el uso del equipo FMS (Fluorescence Monitoring Systems, Hansatech). Este equipo funciona detectando cambios en la eficiencia con la cual la luz absorbida es usada por el FSII, lo que representa el 95% de la fluorescencia total derivada de la clorofila. Una disminución de la eficiencia del uso de luz por el fotosistema se detecta mediante un aumento de la fluorescencia emitida por la clorofila. El equipo funciona midiendo la fluorescencia emitida por el FSII bajo condiciones de luz ambiental (Fo), el cual luego emite un pulso de luz de alta intensidad que satura los centros fotosintéticos, midiéndose la fluorescencia máxima emitida (Fm). Se ha determinado que el cociente entre la fluorescencia variable ($Fv = Fm - Fo$) y la fluorescencia máxima (Fm) está correlacionado directamente con el porcentaje de centros fotosintéticos funcionales (Weiss y Reigosa, 2001). Por lo tanto, frente a factores de estrés que dañen la estructura y funcionalidad de los centros fotosintéticos, el valor del cociente Fv/Fm disminuye en relación a los niveles basales (Figura 2.7).

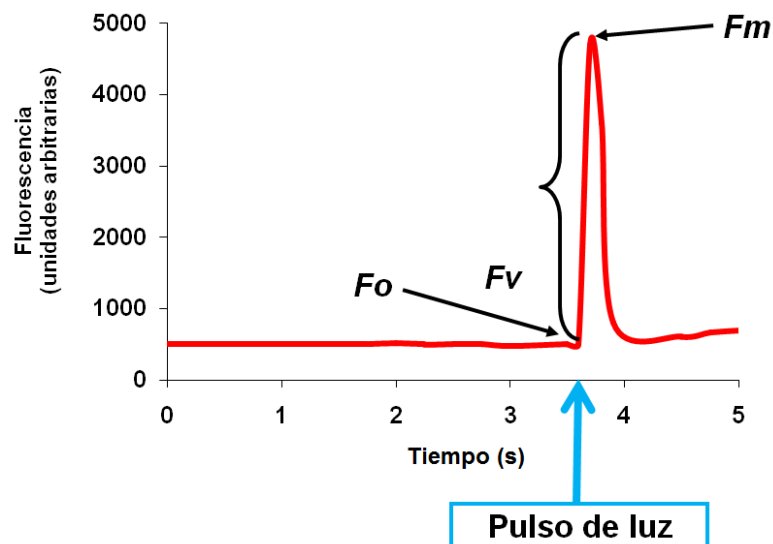


FIGURA 2.7. Representación gráfica de los parámetros medidos mediante fluorimetría, para la determinación de eficiencia máxima del fotosistema II. Fo (Fluorescencia basal), Fm (Fluorescencia máxima) y Fv (Fluorescencia variable).

2.2.10. Detección de PRXs mediante inmunofluorescencia

Se diseñó un protocolo para determinar localización PRX a través de inmunofluorescencia indirecta (anticuerpo primario más anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo). Debido a la nula información publicada en algas sobre inmunolocalización de proteínas, se adaptó un protocolo descrito en plantas vasculares (Greenwood y Chrispeels, 1985). Para la implementación de la inmunodetección PRX, se realizaron cortes transversales de 5 mm de tejido de individuos de *S. gracilis*, *L. nigrescens* y *U. compressa*, los que fueron fijados por inmersión en paraformaldehído 4% y glutaraldehído 0,3% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0, conteniendo cafeína 1 mg mL⁻¹. Las muestras fueron fijadas durante 4 h a 4 °C y luego lavadas en tampón fosfato 0,1M pH 7,0 durante 12 h. Las muestras fueron deshidratadas en una serie de etanol entre 50 y 100% durante 30 min a 4 °C. Las muestras se pre-incluyeron en LR-White Resin (London Resin Company) diluida 1: 1 en etanol puro, durante 2 h y luego en resina pura, durante 4 h. La resina fue polimerizada en cápsulas de gelatina N° 2 durante 24 h en lámpara UV a temperatura ambiente. Finalmente, cortes de 1 - 2 µm de espesor fueron obtenidos con un ultramicrotomo Survall MT-5000 y dispuestos en portaobjetos tratados con (3-aminopropil) trietoxi-xilano.

Los cortes semi-finos fueron fijados y tratados por 2 h en una solución de bloqueo la cual consistió en leche descremada (Svelty, Nestlé) 3% p/v en tampón salino fosfato (PBS: NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂PO₄ · 12 H₂O 7,8 mM y KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2) para evitar uniones inespecíficas. Luego, las muestras fueron incubadas durante 12 h con anticuerpo primario policlonal para PRX diluido 1:400 en solución de bloqueo. Las muestras fueron lavadas para la eliminación del exceso de anticuerpo con solución de bloqueo e incubadas por 2 h con el anticuerpo secundario diluido 1:200 en la solución de bloqueo con leche 3% p/v en PBS. Finalmente, el exceso de anticuerpo secundario fue lavado con solución de bloqueo y la inmunofluorescencia fue inmediatamente detectada a través de un microscopio de fluorescencia (Eclipse E400, Nikon).

El anticuerpo policlonal primario utilizado fue preparado en conejo (GenScript) a partir de la secuencia peptídica antigénica DAEGALGNKRC. Este péptido corresponde a una región de superficie de la proteína que codifica para el gen de la peroxirredoxina descrito en *Ulva compressa* (número de acceso NCBI: FD387607, Contreras-Porcía y cols., 2011 b). El anticuerpo fue obsequiado por la Dra. Alejandra Moenne, del Departamento de Biología, USACH. El anticuerpo secundario utilizado fue una inmunoglobulina (AbCam) anti-conejo, conjugada al fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC), el cual al ser excitado con luz azul ($\lambda = 495$ nm) emite fluorescencia verde ($\lambda = 520$ nm).

Para verificar que la fluorescencia emitida corresponda a la detección específica de la PRX, se verificó la especificidad de la unión de cada anticuerpo a su respectivo antígeno. Para comprobar la especificidad de la unión del anticuerpo primario a la PRX se realizó un “Western Blot” (sección 2.2.11) y para comprobar la especificidad de la unión del anticuerpo secundario al anticuerpo primario se realizó la incubación tal como está descrita previamente en esta sección, pero excluyendo la incubación con el anticuerpo primario.

2.2.11. Detección de PRXs mediante “Western Blot”

Para comprobar la especificidad de la unión de la PRX al anticuerpo primario utilizado en la inmunofluorescencia, se realizó la detección de la PRX mediante “Western Blot” sobre extractos proteicos de *S. gracilis*, *L. nigrescens* y *U. compressa*. Para esto, se realizó la extracción de proteínas usando el método del fenol descrito para macroalgas (Contreras y cols., 2008). Para esto, 3-5 g de tejido fresco de cada especie fue congelado en un mortero usando nitrógeno líquido y pulverizado con ayuda de pistilo. El tejido se homogenizó en 10 mL de tampón de lisis (polivinilpirrolidona [PVP] 1,5% p/v, sacarosa 0,7 M, KCl 0,1 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, EDTA 250 mM, 1 tableta de cóctel de inhibidor de proteasas por 50 mL de tampón, β -mercaptoethanol 2% v/v y

3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato [CHAPS] 0,5% p/v) durante 20 min a 4 °C. Se agregó 1 volumen de fenol básico saturado y se homogenizó por 20 min en hielo a 4 °C. El homogenizado fue centrifugado a 1.800 x g durante 30 min a 4 °C extrayendo posteriormente la fase proteica superior. La fase inferior fue extraída nuevamente añadiendo 0,5 volumen de fenol, y posteriormente centrifugada a 1.800 x g durante 20 min a 4 °C. Se añadió 6-7 volúmenes de acetato de amonio 0,1 M en metanol a la fase extraída para precipitar las proteínas por 4 h a -20 °C, las que fueron recuperadas por centrifugación a 1.800 x g por 40 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 10 volúmenes de acetato de amonio 0,1 M en metanol, se dejó precipitar a -20 °C durante 30 min y se centrifugó a 1.800 x g por 30 min. El precipitado se resuspendió en 2 mL de TCA 10% más DTT 20 mM en acetona, se dejó precipitar a -20 °C durante 30 min y se centrifugó a 7.700 x g por 15 min, eliminando el sobrenadante. Se agregaron 2 mL de TCA 10% en acetona, se dejó precipitando 12 h a -20 °C y se centrifugó a 7.700 x g por 15 min. El precipitado fue lavado 6 veces con 2 mL de acetona 80% y 4 veces con acetona 60% (en metanol). Finalmente, el precipitado proteico se secó por 10 min a temperatura ambiente y se resuspendió en PBS pH 7,2.

Se realizó el análisis de los extractos proteicos mediante electroforesis unidimensional, cargando el volumen equivalente a 40 µg de proteínas en un gel de acrilamida al 15% en condiciones denaturantes a 150V durante 75 min. Posteriormente, la inmunodetección de las PRXs fue realizada mediante “Western Blot”. Para esto, se realizó una transferencia activa (70 mA) de proteínas resueltas desde el gel de acrilamida hacia una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (BioRad), durante 2 h a 4°C. El bloqueo de los sitios inespecíficos de unión de proteínas se realizó incubando la membrana con BSA 3% en PBS Tween-20 0,05% por 12 horas a 4°C. Luego se incubó con el anticuerpo primario policlonal para PRX diluído 1:2.000 por 1 h y se lavó la membrana con PBS Tween-20 0,05% 3 veces por 10 min para remover el exceso de anticuerpo. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) diluído 1:15.000 por 1 h

y se lavó con PBS Tween-20 0,05% 3 veces por 10 min para remover el exceso de anticuerpo. El revelado se llevó a cabo utilizando el kit ECL Western Blotting Substrate (Pierce), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para la detección de la señal del anticuerpo mediante la oxidación de luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, catalizado por la peroxidasa de rábano conjugada al anticuerpo secundario. Esta señal emitida es capturada por una película fotográfica, la cual es posteriormente escaneada y analizada.

2.2.12. Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron analizados usando el software MINITAB, mediante distintas aproximaciones estadísticas, incluyendo análisis de varianza (ANOVA) y pruebas *a posteriori* de significancia como Tukey (*T*). Previo al análisis se verificó normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene. El nivel de significancia para todas las pruebas estadísticas fue $\alpha = 0,05$ (Zar, 2010).

3. RESULTADOS

3.1. OBJETIVO 1

3.1.1. Actividad basal PRX en *S. gracilis* y *L. nigrescens*

La medición de actividad PRX, con DTT como agente reductor, permitió demostrar actividad PRX por primera vez en macroalgas pardas. Al comparar ambas especies, se observaron diferencias significativas entre las actividades basales ($F = 73,38$, $P < 0,001$) siendo esta actividad 3,1 veces mayor en *S. gracilis* que en *L. nigrescens* (Figura 3.1).

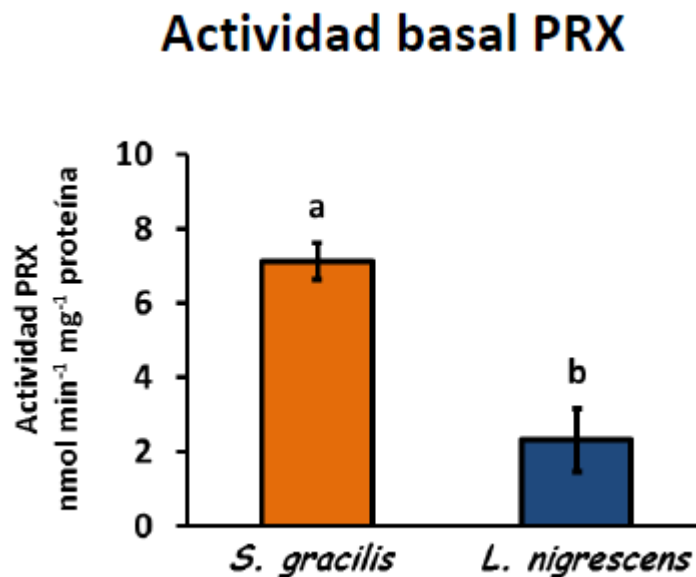


FIGURA 3.1. Actividad basal PRX determinada en *S. gracilis* y *L. nigrescens* sin cultivo in vitro, usando DTT como agente reductor y peróxido de hidrógeno como sustrato. Representación del promedio de 3 réplicas independientes \pm desviación estándar. a, b representan diferencias significativas para $P < 0,05$.

3.1.2. Actividad PRX en *S. gracilis* y *L. nigrescens* frente a estrés por cobre

Al comparar ambas especies, se observó diferencias significativas en la actividad PRX en todas las concentraciones de cobre empleadas (interacción entre especies y concentraciones de cobre: $F = 27,53$, $P < 0,001$). En individuos de *S. gracilis* expuestos a una baja concentración de cobre (i.e. $5 \mu\text{g Cu L}^{-1}$) se registró un aumento significativo en la actividad PRX utilizando H_2O_2 como sustrato ($T = 4,12$, $P = 0,015$) pero no con *t*-BOOH ($T = 0,69$, $P = 0,527$; Figura 3.2.A). La mayor actividad fue registrada a $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, 2,7 veces mayor con respecto al control ($T = 8,33$, $P = 0,001$) para H_2O_2 y 3 veces mayor ($T = 6,31$, $P = 0,003$) para *t*-BOOH. Entre 40 y $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ se observó una disminución de la actividad enzimática respecto a la observada a $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$. En $300 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ hubo niveles de actividad similares al control sin adición del metal ($T = 0,19$, $P = 0,855$; Figura 3.2.A). Al comparar específicamente la actividad enzimática PRX utilizando ambos sustratos (i.e. H_2O_2 y *t*-BOOH) se registró mayor actividad PRX usando H_2O_2 como sustrato en 0, 5, 10, 20 y $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$. En 40 ($T = 2,08$, $P = 0,106$) y $300 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($T = 1,66$, $P = 0,172$) no se registró diferencias significativas entre la actividad PRX usando H_2O_2 ó *t*-BOOH.

En *L. nigrescens*, se observó un aumento significativo en la actividad PRX a partir de $5 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, tanto para H_2O_2 ($T = 5,50$, $P = 0,05$) como para *t*-BOOH ($T = 4,99$, $P = 0,008$; Figura 3.2.B). La máxima actividad PRX fue registrada en $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, la que aumentó 3,8 veces respecto al control ($T = 15,98$, $P < 0,001$) para H_2O_2 , y 5,9 veces ($T = 16,49$, $P < 0,001$) para *t*-BOOH (Figura 3.2.B). Es importante destacar que esta actividad máxima fue similar a la actividad basal registrada en *S. gracilis* ($T = 1,10$, $P = 0,332$ para H_2O_2). Entre 10 y $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ hubo una disminución significativa de la actividad PRX, siendo la actividad en $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ similar a la del control ($T = 1,69$, $P = 0,166$). En *L. nigrescens* hubo un consumo de H_2O_2 en comparación con *t*-BOOH similar en todas las concentraciones de cobre, exceptuando la actividad registrada en $5 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($T = 3,33$, $P = 0,029$). En esta concentración la actividad PRX utilizando como sustrato H_2O_2 fue mayor en relación a la actividad PRX utilizando *t*-BOOH.

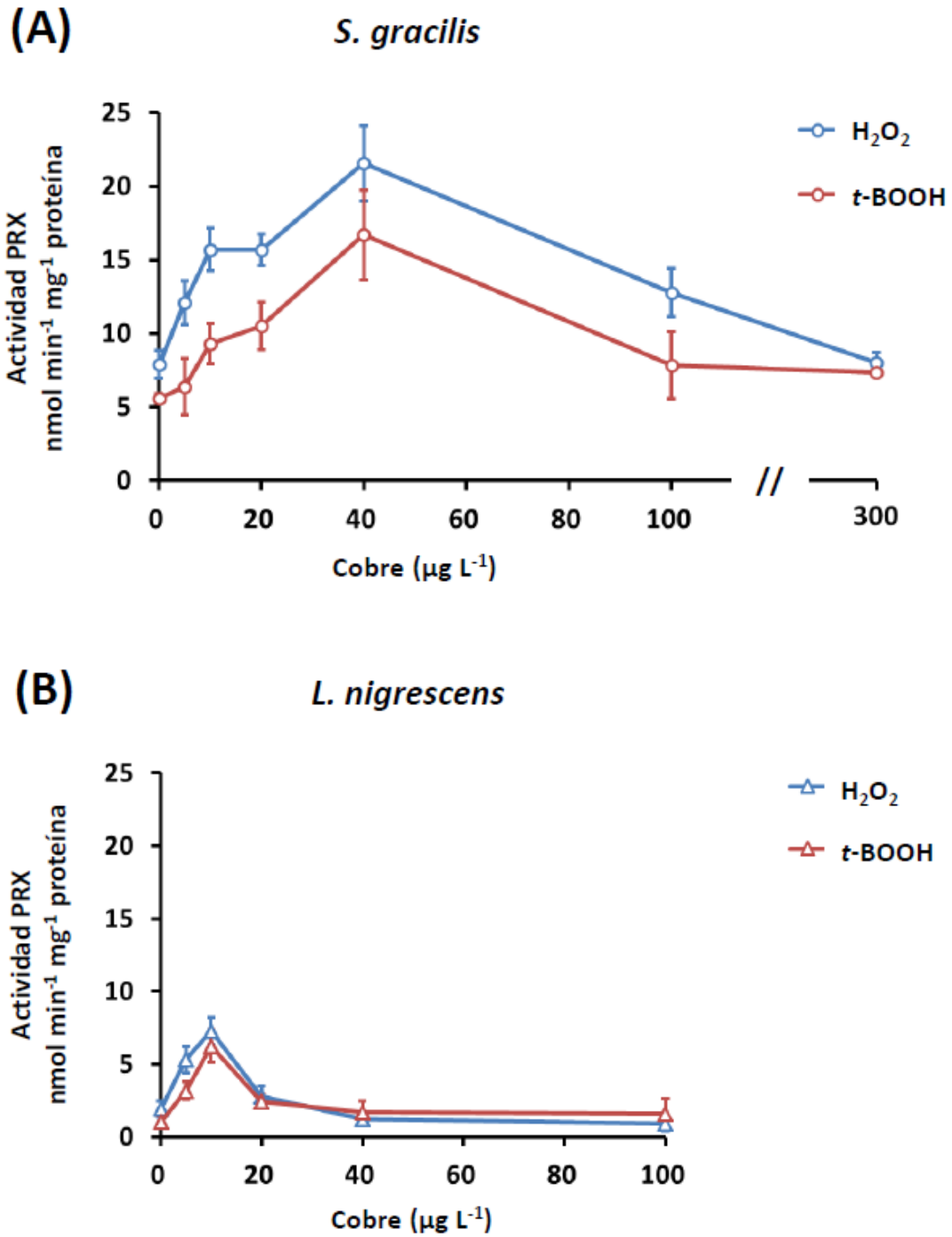


FIGURA 3.2. Actividad PRX determinada en *S. gracilis* (A) y *L. nigrescens* (B) a las 96 h de tratamiento con distintas concentraciones de cobre, usando DTT como agente reductor y H₂O₂ ó *t*-BOOH como sustratos. Representación del promedio de 3 réplicas independientes \pm desviación estándar.

3.1.3. Control de especificidad de la actividad PRX

Para comprobar la especificidad del ensayo PRX, se evaluó el efecto inhibitor del ditioneitról (DTT), agente reductor de la actividad PRX, sobre la actividad catalasa (CAT), tal como se había comunicado previamente (Kunce y cols., 1988). Los resultados demuestran que al agregar DTT a la medición de actividad CAT se perdió casi por completo la actividad enzimática (Figura 3.3). Para *S. gracilis* en el control sin cobre la actividad PRX disminuyó 5 veces al agregar DTT ($F = 12,01$, $P = 0,026$) y en $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ disminuyó 21 veces ($F = 27,78$, $P = 0,006$). En el caso de *L. nigrescens*, la actividad PRX disminuyó 9 veces en $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($F = 23,81$, $P = 0,008$), y 2,6 veces en el control sin cobre ($F = 10,56$, $P = 0,031$). La adición de DTT al medio de ensayo enzimático, además de actuar como reductor de las PRXs, inhibe la actividad CAT.

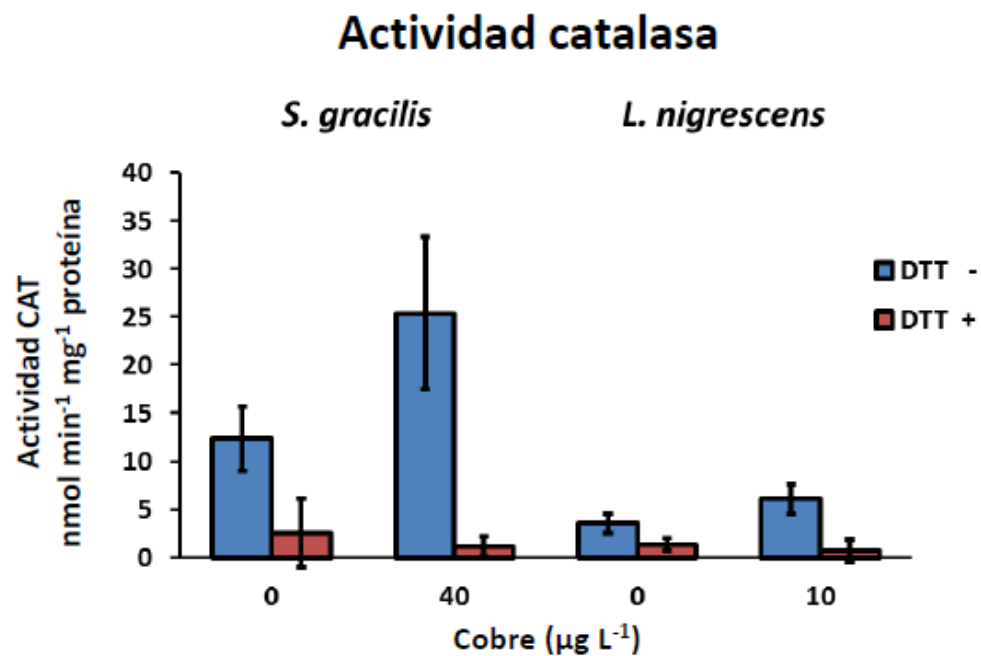


FIGURA 3.3. Control de actividad catalasa (CAT) para comprobar la especificidad al ensayo de actividad peroxirredoxina (PRX), medida de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.5 en *S. gracilis* tratada con 0 y $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre y en *L. nigrescens* tratada con 0 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre por 96 h. Las concentraciones de cobre elegidas para cada especie fueron aquellas en las cuales se observó mayor actividad específica PRX usando DTT como agente reductor. Representación del promedio de 3 réplicas independientes \pm desviación estándar.

3.1.4. Actividad PRX acoplada a TRX en *S. gracilis* y *L. nigrescens*

La actividad PRX acoplada al agente reductor enzimático tiorredoxina (TRX) fue determinada en individuos expuestos a la concentración de cobre donde se registró la máxima actividad PRX total, como también en individuos sin exposición al metal (control) durante 96 h. En los controles, la actividad PRX/TRX de *S. gracilis* fue estadísticamente similar a la de *L. nigrescens* ($F = 3,30$, $P = 0,143$). En ambas especies, se registró un aumento significativo en la actividad PRX/TRX bajo estrés por cobre respecto a la actividad control (Figura 3.4.A). Esta actividad fue 3,1 veces mayor en individuos de *S. gracilis* expuestos a $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($F = 22,05$, $P = 0,009$) en relación al control. En *L. nigrescens* frente a $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($T = 13,48$, $P = 0,021$), esta actividad fue 3 veces mayor. Para ambas especies, los valores obtenidos mediante este ensayo PRX/TRX fueron 10 veces superiores a aquellos obtenidos usando DTT como agente reductor en las mismas concentraciones de cobre.

3.1.5. Actividad PRX acoplada a GRX en *S. gracilis* y *L. nigrescens*

La actividad PRX acoplada al agente reductor enzimático glutarredoxina (GRX) fue determinada en las mismas concentraciones que la actividad acoplada a TRX (Figura 3.4.B). En los controles a 96 h la actividad PRX/GRX en *S. gracilis* fue 2,3 veces superior a la de *L. nigrescens* ($F = 10,13$, $P = 0,033$). En *L. nigrescens* no se registró un aumento significativo de actividad PRX/GRX entre el control y $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($F = 3,10$, $P = 0,153$). Contrariamente, en el caso de *S. gracilis*, individuos expuestos a $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ registraron una actividad específica 2,7 veces mayor que individuos sin tratar con el metal ($F = 19,30$, $P = 0,012$).

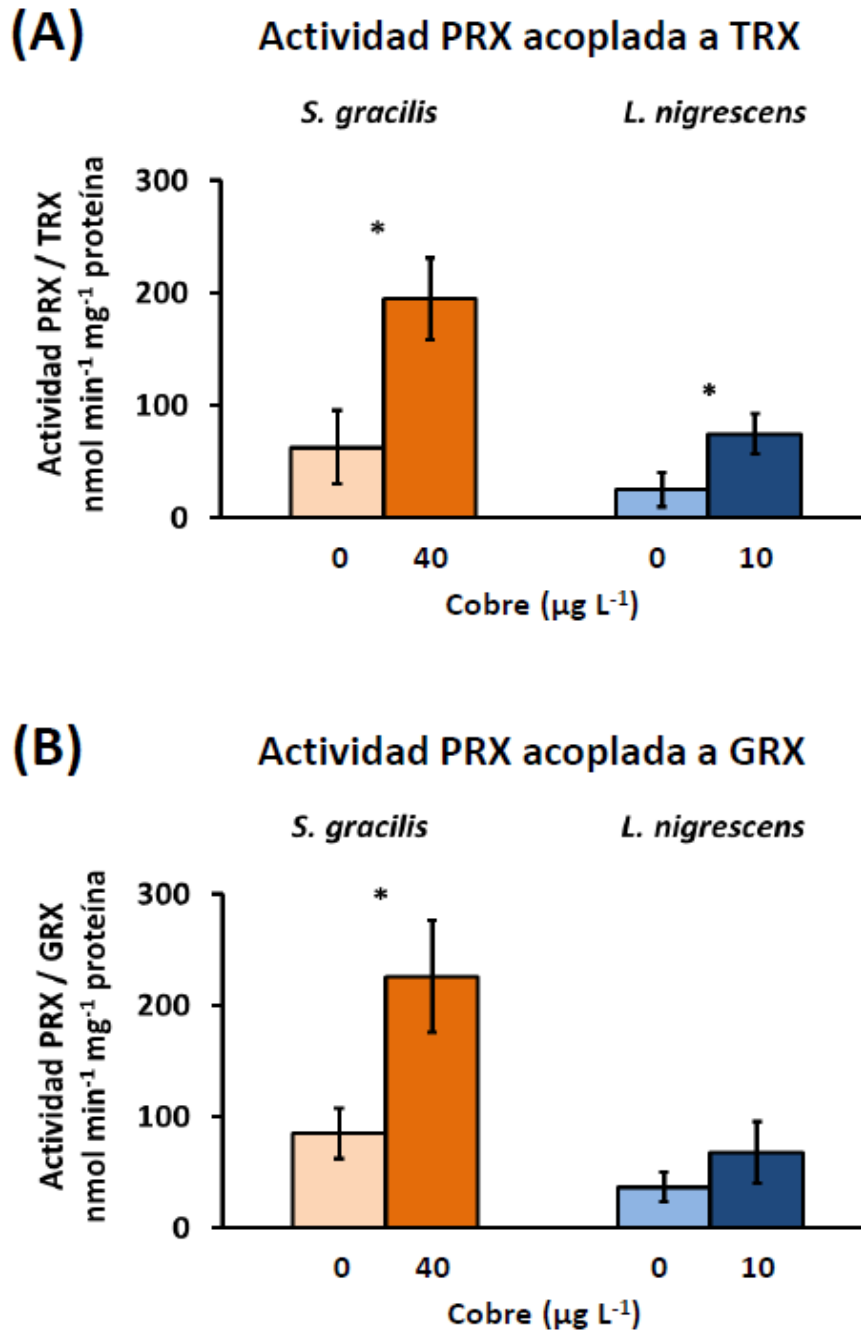


FIGURA 3.4. Actividad peroxirredoxina (PRX) en su reacción acoplada a (A) tiorredoxina (TRX) y (B) glutarredoxina (GRX), en *S. gracilis* a concentraciones de cobre de 0 y 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre y en *L. nigrescens* a 0 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre por 96 h. Las concentraciones de cobre elegidas para cada especie, fueron aquellas en las cuales se observó mayor actividad específica PRX usando DTT como agente reductor. Representación del promedio de 3 réplicas independientes \pm desviación estándar. * representa diferencias significativas para $P < 0,05$.

3.1.6. Evaluación de marcadores de daño oxidativo en *S. gracilis* y *L. nigrescens*

3.1.6.1. Lipoperóxidos

Ambas especies presentaron niveles similares de lipoperóxidos a nivel basal ($T = 0,44$, $P = 0,680$) como en las plantas cultivadas en agua de mar sin adición de cobre durante 96 h ($T = 0,16$, $P = 0,879$; Figura 3.5.A). Sin embargo, en *S. gracilis* se observó un aumento significativo en los niveles de lipoperóxidos a partir de $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, siendo de 1,8 veces respecto al control ($T = 3,92$, $P = 0,017$). En *L. nigrescens*, los niveles de lipoperóxidos aumentaron significativamente a partir de $5 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, siendo de 1,5 veces respecto al control durante 96 h de cultivo ($T = 6,08$, $P = 0,004$). La mayor concentración de lipoperóxidos en ambas especies se registró a $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, siendo de 2,7 veces en *S. gracilis* respecto a su control y de 4,3 veces en *L. nigrescens* respecto a su control.

3.1.6.2. Eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m)

En *S. gracilis* los valores basales de F_v/F_m fueron $0,66 \pm 0,01$ y en *L. nigrescens* $0,76 \pm 0,02$. En ese contexto, con el fin de poder comparar ambas especies, los resultados se expresaron como razón de cambio de la eficiencia máxima del FSII, es decir dividiendo cada valor de F_v/F_m obtenido en los tratamiento de cobre por la media de la eficiencia fotosintética basal (F_{vo}/F_{mo}) para cada especie. Los resultados muestran que F_v/F_m disminuye levemente, pero de manera significativa a partir de $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ en *S. gracilis* ($T = 3,46$, $P = 0,004$) a 96 h y a partir de $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ en *L. nigrescens* ($T = 3,12$, $P = 0,006$) respecto a su control a 96 h (Figura 3.5.B). No se observó diferencias significativas entre ambas especies en el patrón de inactivación de F_v/F_m durante las 96 h de cultivo ($F = 0,53$, $P = 0,749$).

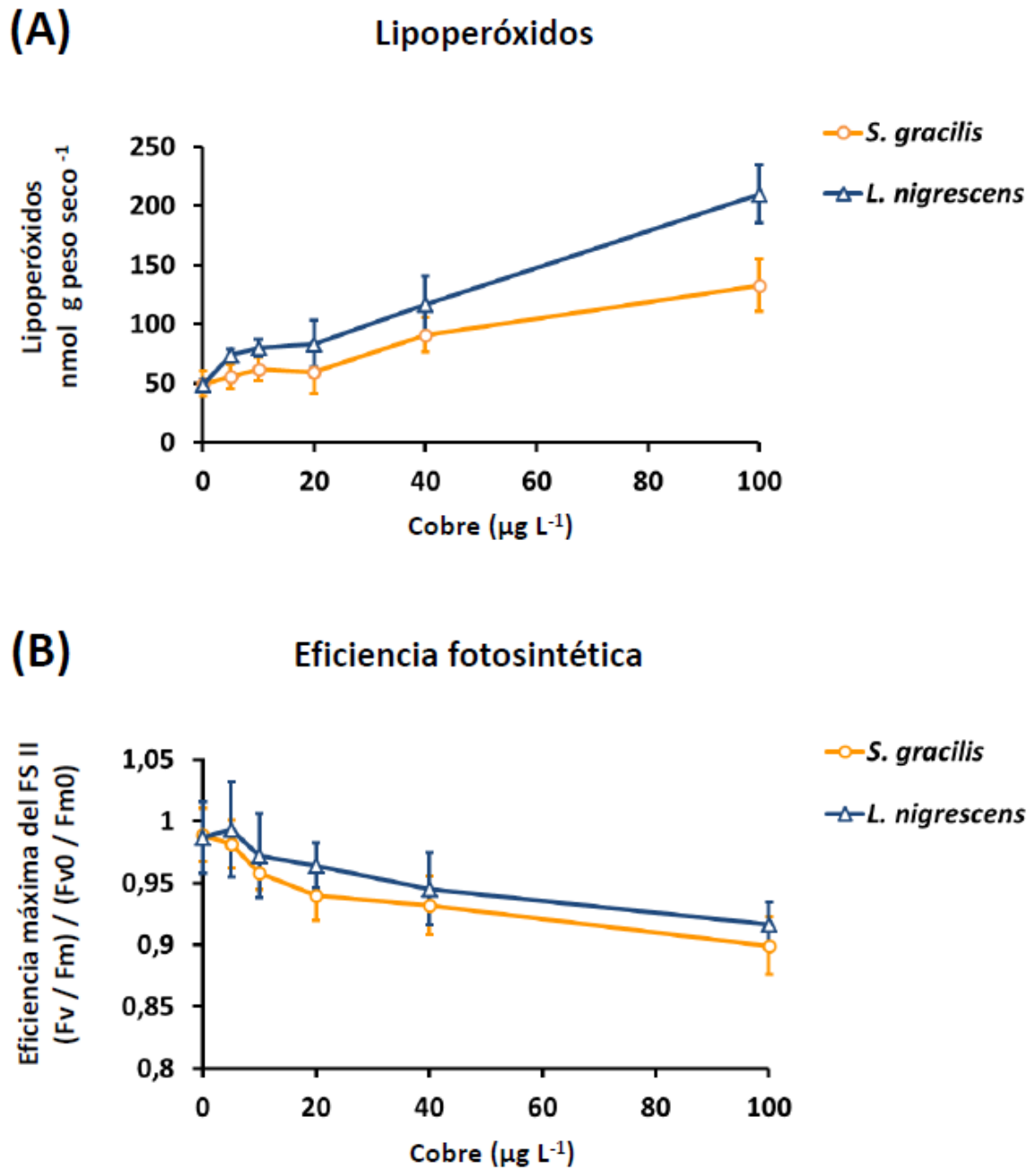


FIGURA 3.5. Cuantificación de lipoperóxidos (A) y medición de eficiencia máxima del fotosistema II (B) representada como razón de cambio respecto a la eficiencia máxima basal en *S. gracilis* y *L. nigrescens* a las 96 h de tratamiento con distintas concentraciones de cobre. Representación del promedio de 3 réplicas para lipoperóxidos y 9 réplicas para eficiencia fotosintética \pm desviación estándar.

3.2. OBJETIVO 2

3.2.1. Velocidad de activación PRX en *S. gracilis* y *L. nigrescens*

La velocidad de activación PRX fue evaluada a distintos tiempos de cultivo (i.e. 4, 12, 24, 48, 72 y 96 h) en la concentración de cobre en la cual se detectó el máximo de actividad PRX. En *S. gracilis* este máximo fue registrado en 40 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ y en el caso de *L. nigrescens* en 10 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. Además, se incluyó en ambas especies un control sin adición del metal y una concentración de 20 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ como punto de comparación en la velocidad de activación de las PRXs entre ambas especies.

Los resultados muestran que en *S. gracilis* no hubo diferencias significativas en la velocidad de activación en el tratamiento control ($F = 0,18$, $P = 0,965$). Por otra parte, se detectó un aumento significativo de 1,6 veces de la actividad enzimática a las 48 h de tratamiento para 20 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($T = 3,77$, $P = 0,020$) y 1,7 veces para 40 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($T = 11,10$, $P < 0,001$) (Figura 3.6.A). El máximo de actividad fue registrado a las 96 h de cultivo las cuales fueron, para 20 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, 2 veces mayor que el control y, para 40 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, 2,7 veces mayor que el control.

En el caso de *L. nigrescens*, tampoco se registró diferencias significativas en el control sin adición de cobre durante todos los tiempos estudiados ($F = 2,119$, $P = 0,123$). A partir de las 12 h de cultivo, se detectó un aumento significativo en la actividad PRX de 2,4 veces para 10 ($T = 4,96$, $P = 0,008$) y de 1,6 veces para 20 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($T = 3,56$, $P = 0,024$) respecto al control (Figura 3.6.B). El máximo de actividad fue registrado a las 48 h del tratamiento en 20 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, siendo 4,7 veces mayor al control. Sin embargo, a partir de las 72 h, esta actividad disminuyó alcanzando a las 96 h de cultivo un valor de actividad similar al control ($T = 1,69$, $P = 0,166$). Al comparar ambas especies a 20 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, se observó una mayor actividad PRX en *S. gracilis* en comparación a *L. nigrescens* en todos los tiempos (interacción especies y tiempo: $F = 11,01$, $P < 0,001$).

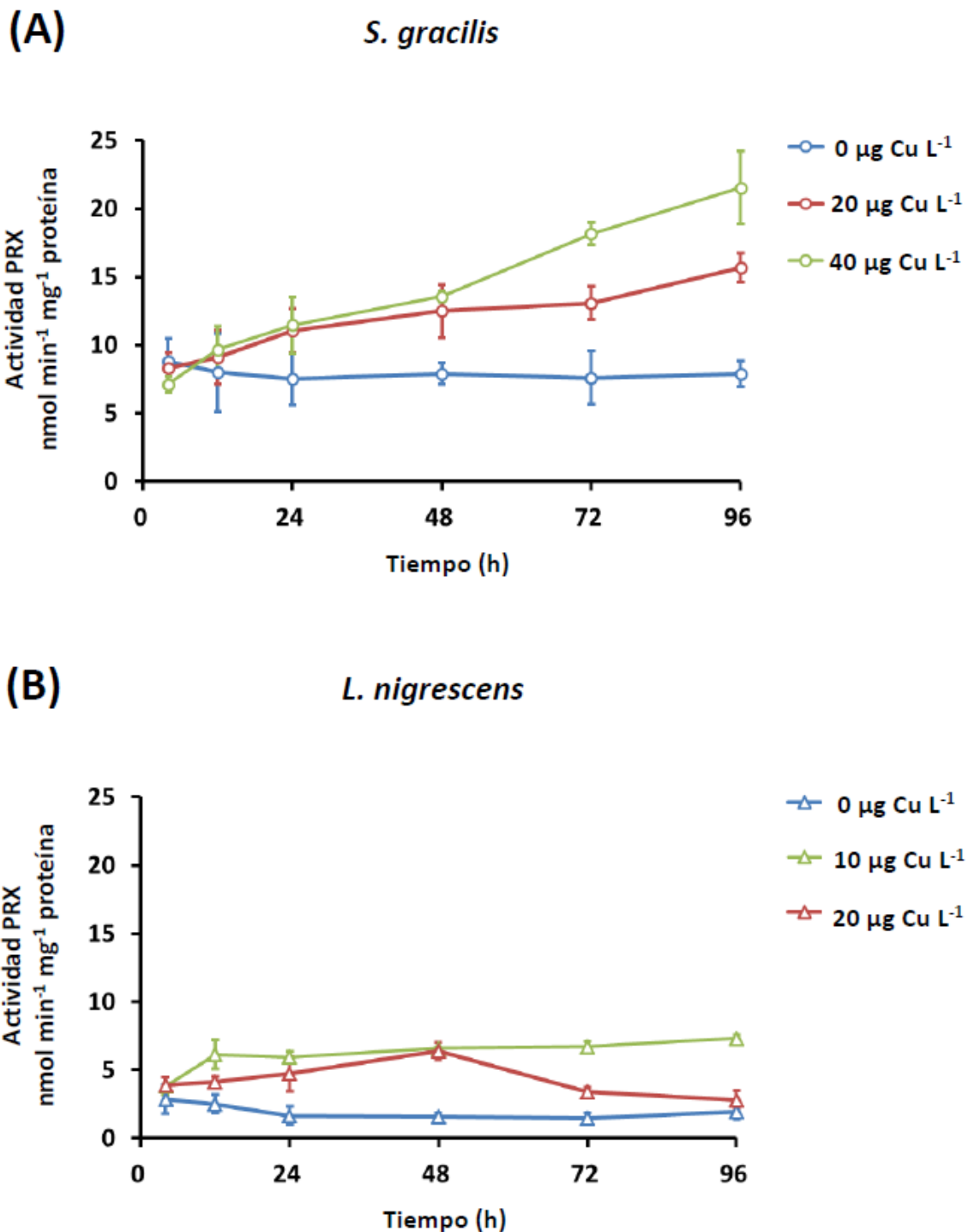


FIGURA 3.6. Velocidad de activación de peroxirredoxinas usando DTT como agente reductor y H₂O₂ como sustrato en *S. gracilis* (A) y *L. nigrescens* (B). Representación del promedio de 3 réplicas independientes \pm desviación estándar.

3.3. OBJETIVO 3

3.3.1. Detección de PRXs en *S. gracilis* y *L. nigrescens* por inmunofluorescencia

La detección de la enzima PRX fue realizada a través de inmunofluorescencia. Para esto, individuos de *S. gracilis* fueron tratados i) en agua de mar sin adición de cobre, ii) en la concentración del metal en la cual se registró la máxima actividad enzimática ($40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$) y iii) en la concentración donde se registró inhibición de la actividad PRX ($300 \mu\text{g Cu L}^{-1}$) durante 96 h. En el caso de *L. nigrescens*, los individuos fueron tratados i) en agua de mar sin adición de cobre, ii) en $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (máxima actividad enzimática) y iii) en $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (inhibición de la actividad enzimática) durante 96 h.

Adicionalmente, se realizó el experimento de inmunofluorescencia para detectar PRX en el alga verde *U. compressa*, debido a que el anticuerpo para PRX fue diseñado en base a la secuencia génica descrita en esta especie (número de acceso NCBI: FD387607). Además, se ha registrado un aumento en los niveles de expresión para este gen a altas concentraciones de cobre ($10 \mu\text{M}$; Contreras-Porcía y cols., 2011 b). Esto fue realizado en el tejido de muestras tratadas con agua de mar sin adición de cobre y con $635 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ($10 \mu\text{M}$) por 96 h.

Los resultados muestran en *U. compressa* presencia de PRX con una mayor intensidad de fluorescencia en el tratamiento con cobre (Figura 3.7. C) en relación al control (Figura 3.7. B). En individuos de *S. gracilis* donde se registró máxima actividad PRX, fue detectada una mayor intensidad de fluorescencia (Figura 3.7. F), en comparación con individuos sin tratar con el metal (Figura 3.7. E). Esta detección fue principalmente en la capa de células superficiales del tejido (i.e. células corticales), registrándose poca fluorescencia hacia las zonas más medulares. Contrariamente, en individuos tratados con $300 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Figura 3.7. G), concentración a la cual se registró inactivación de PRX, se observó una intensidad de fluorescencia inferior a la de $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ y similar a la de los controles. En el caso de *L. nigrescens*, en ninguno de los tratamientos (Figura 3.7. I -

K) se observó un aumento de fluorescencia distinguible de la fluorescencia basal (control sin anticuerpo primario, Figura 3.8. I).

3.3.2. Control de especificidad de los anticuerpos empleados en el experimento de inmunofluorescencia

3.3.2.1. Anticuerpo secundario

Se observó la especificidad en cortes de individuos de *U. compressa*, *S. gracilis* y *L. nigrescens* tratados con $635 \mu\text{g L}^{-1}$, $40 \mu\text{g L}^{-1}$ y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre, respectivamente. Al comparar *U. compressa* (Figura 3.8. A - B) y *S. gracilis* (Figura 3.8. C - D) tratadas con ambos anticuerpos y sus respectivos controles, los que fueron sólo tratados sólo con anticuerpo secundario, se observó claramente diferencias en la intensidad de fluorescencia. Esto indica que las diferencias de señal observadas en el experimento se atribuyen específicamente a la unión del anticuerpo primario al anticuerpo secundario. En *L. nigrescens* el control realizado demostró que la fluorescencia de baja intensidad detectada en los tratamientos con cobre no corresponde a detección de la PRX, al no observarse diferencias entre el tratamiento con ambos anticuerpos y el tratamiento sólo con el anticuerpo secundario (Figura 3.8. E - F).

3.3.2.2. Anticuerpo primario

Se comprobó la especificidad del anticuerpo primario mediante “Western Blot” en extractos de proteínas obtenidos por el método del fenol (Contreras y cols., 2008). El experimento mostró la presencia de PRX en *U. compressa* y *S. gracilis*, pero no en *L. nigrescens*, que es consistente con los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia (Figura 3.8. G). La detección de PRX en *U. compressa* tratada con $635 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, con un peso molecular estimado de 17,4 kDa, confirmó la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. La PRX detectada en *S. gracilis* tratada con $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ tuvo un peso molecular estimado de 18 kDa.

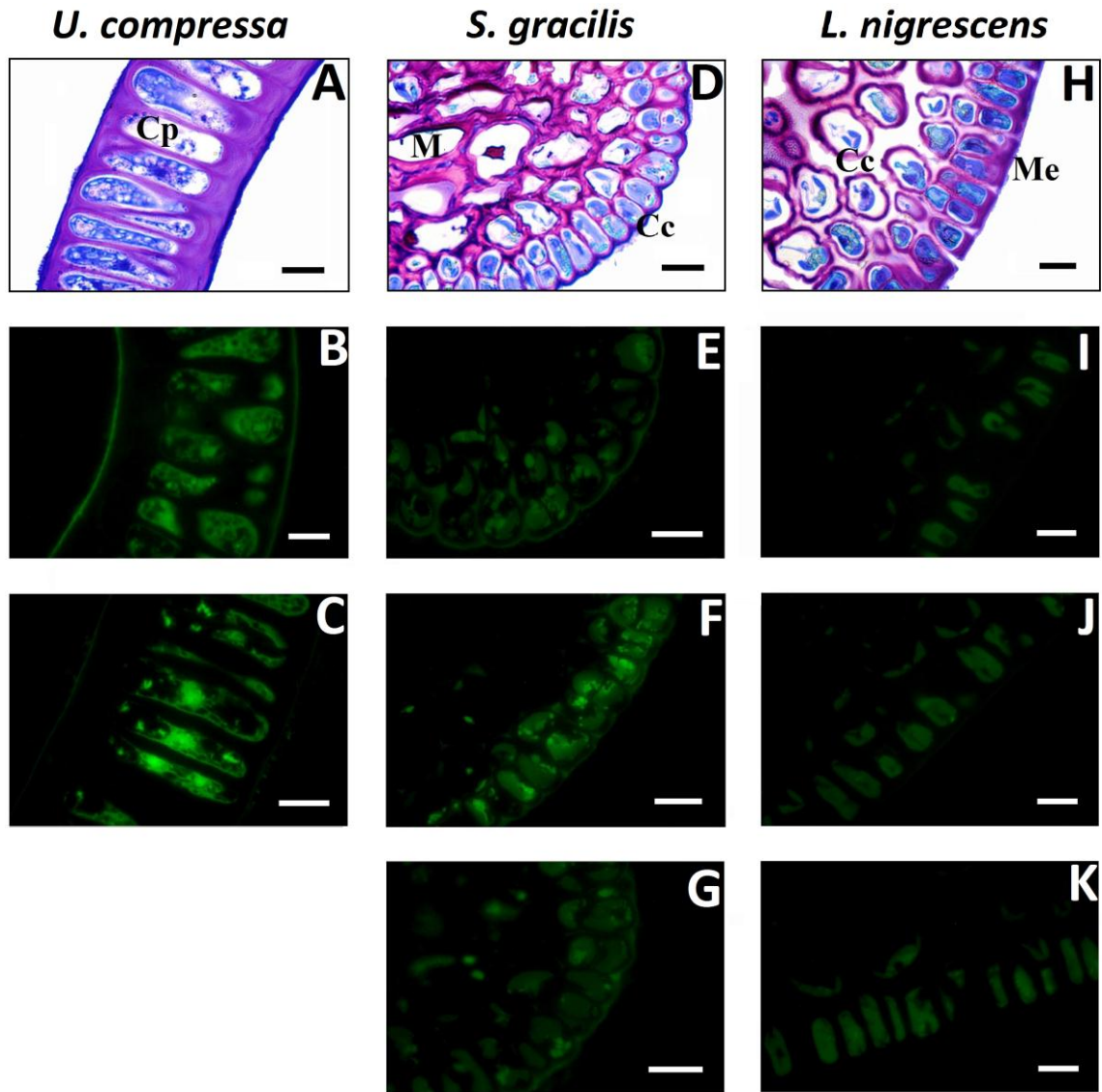


FIGURA 3.7. Detección de PRX mediante inmunofluorescencia en *U. compressa* (A-C), *S. gracilis* (D-G) y *L. nigrescens* (H-K) bajo estrés por cobre durante 96 h. (A, D, H) cortes transversales del tejido de las especies teñidos con azul de toluidina para la visualización de los tipos celulares presentes: Cp, células poligonales; Cc, células corticales, M, médula; Me, meristodermo. (B, E, I) tratamiento control, sin adición de cobre. (C, F, J) máxima actividad PRX registrada bajo estrés por cobre, (C) 635 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, (F) 40 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ y (J) 10 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. (G, K) inactivación PRX bajo altas concentraciones de cobre: (G) 300 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, (K) 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$. La inmunodetección de PRX en *U. compressa* fue utilizada como control positivo de detección usando el antígeno preparado en base a la secuencia PRX tipo II descrita en esta especie. Cada barra representa 10 μm .

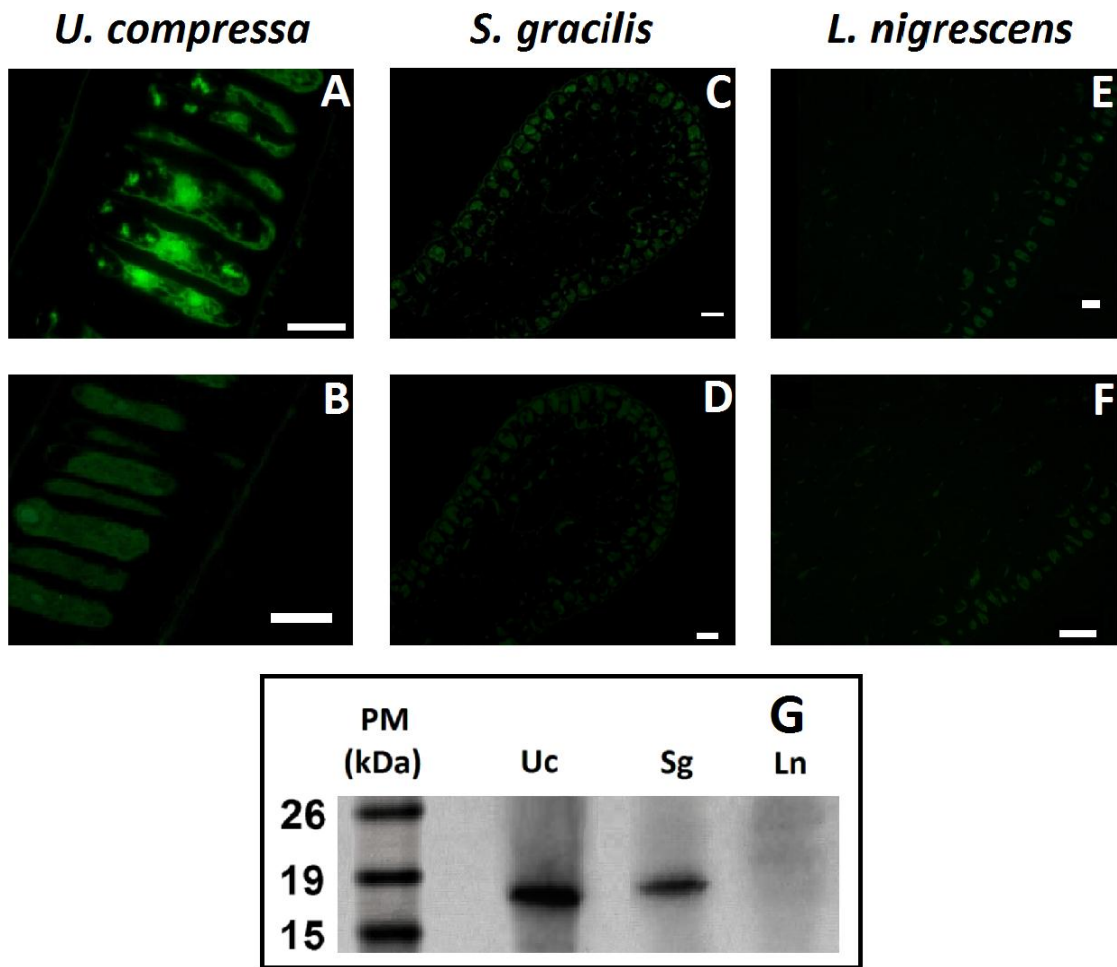


FIGURA 3.8. Control de especificidad de los anticuerpos empleados en inmunofluorescencia. Verificación de la especificidad del anticuerpo secundario en cortes transversales de *U. compressa* (A-B), *S. gracilis* (C-D) y *L. nigrescens* (E-F), tratados con 635 $\mu\text{g L}^{-1}$, 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre respectivamente. (A, C, E) tratamientos con anticuerpo primario y secundario, (B, D, F) tratamientos sólo con anticuerpo secundario. (G) Comprobación de la especificidad del anticuerpo primario mediante “Western Blot” en extractos de proteínas de *U. compressa* (Uc), *S. gracilis* (Sg) y *L. nigrescens* (Ln), además se muestra un estándar de peso molecular (PM), indicando el peso en kiloDaltons (kDa).

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis de trabajo, ya que los niveles de actividad específica en *L. nigrescens* fueron significativamente inferiores a los de *S. gracilis* tanto a nivel basal, como en los distintos tratamientos con cobre. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Contreras y cols. (2009) donde se registra una mayor activación de los sistemas antioxidantes en otra especie tolerante a cobre del género *Scytosiphon*, tanto a nivel basal como bajo estrés por cobre en comparación con *L. nigrescens*.

La concentración de cobre a la que se observó disminución de la actividad PRX en *L. nigrescens* ($\geq 20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$) fue inferior a aquella previamente descrita para otras enzimas antioxidantes ($100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, Contreras y cols., 2009). En *S. gracilis*, por otra parte, se observó disminución de actividad PRX a partir de $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, fenómeno no detectado en otras enzimas antioxidantes (Contreras y cols., 2009). La disminución de la actividad PRX observada en ambas especies, a distintas concentraciones de cobre, podría estar asociada a una sobre-oxidación de la cisteína del sitio activo a concentraciones de peróxidos del orden de 1-5 mM (Chae y cols., 1994), concentración a la que otras enzimas que consumen peróxidos como ascorbato peroxidasa (AP) o catalasa (CAT), están activas en macroalgas (Contreras y cols., 2005; Contreras y cols., 2007; Contreras y cols., 2009; Ratkevicius y cols., 2003). Este fenómeno y el hecho que las PRXs tienen afinidad por peróxido de hidrógeno a concentraciones cercanas a $1 \mu\text{M}$ (Akerman y Müller, 2005; Trujillo y cols., 2007), afinidad superior a la descrita en otras enzimas (e.g. CAT y AP, Dalton y cols., 1987; Feierabend 2005; Halliwell, 1974), sugieren que las PRXs actuarían no sólo como una de las barreras primarias frente a la formación de peróxidos, sino también como sensores y moduladores de peróxidos a bajas concentraciones. De esta manera, las PRXs podrían modular cascadas de señalización redox-dependientes, involucradas en el desarrollo de los organismos y respuestas fisiológicas a fluctuaciones de las condiciones ambientales (Foyer y Noctor,

2009; Tripathi y cols., 2009). Por lo tanto, el rol de las PRXs en la atenuación del estrés oxidativo no se ajustaría sólo a la definición entregada por Sies (1991) la cual refiere a un potencial daño oxidativo por un desbalance entre las ROS y los mecanismos antioxidantes, sino también a la definición de Jones (2006) quien define estrés oxidativo como una alteración del control y la señalización del sistema redox.

Se ha observado que las PRXs podrían funcionar como chaperonas moleculares y como señales reguladoras de respuestas antioxidativas. En *Saccharomyces cerevisiae*, complejos de PRXs de alto peso molecular presentan una actividad chaperona funcional y participan en tolerancia a estrés térmico (Jang y cols., 2004). La 2-Cys PRX estimula la actividad de la fructosa 1,6-bifosfatasa cloroplástica de *Brassica napus*, enzima fundamental en la asimilación de CO₂ (Caporaletti y cols., 2007). La oxidación de la 2-Cys PRX en *Schizosaccharomyces pombe* constituye un sensor redox que controla la respuesta transcripcional a H₂O₂ (Vivancos y cols., 2005). En este contexto, una función hipotética de las PRXs como moduladores de respuestas adaptativas en macroalgas podría ser de trascendental importancia, ya que estas especies deben tolerar condiciones extremas y fluctuaciones constantes del ambiente como resultado de los ciclos de la marea (Collén y Davison, 1999; Contreras y cols., 2005; Contreras y cols., 2009; Ratkevicius y cols., 2003). Por lo tanto, en sistemas sensibles a oxidación radicalaria generados por el metal como *L. nigrescens*, se generaría un escenario de mayor inactivación enzimática, en especial en enzimas susceptibles a oxidación como las PRXs. En este contexto, la inactivación de esta enzima podría poner en riesgo las vías de señalización en la activación de rutas metabólicas de tolerancia a una condición de estrés oxidativo en *L. nigrescens*.

Al medir actividad PRX usando tiorredoxina (TRX) como agente reductor, en ambas especies se observó valores de actividad específica aproximadamente 10 veces superiores a los observados usando DTT como agente reductor. Esta diferencia puede ser ocasionada simplemente por el método de detección de actividad enzimática o estar asociada a la mayor eficiencia del sistema TRX/TRX reductasa/NADPH en reducir a las

PRXs que un sistema con un agente reductor no fisiológico como el DTT. En plantas, las PRXs de tipos 1-Cys, 2-Cys y Q son susceptibles a reducción por TRX (Tabla 1.1) y se encuentran ubicadas en el núcleo y en los cloroplastos, respectivamente (Mowla y cols., 2002; Tripathi y cols., 2009). En este contexto, la actividad PRX/TRX tanto en *S. gracilis* como en *L. nigrescens* podría tener un rol protector al estrés generado por cobre tanto a nivel de los cloroplastos como a nivel nuclear. De hecho, una baja actividad PRX podría ser un factor clave en la sobreproducción de lipoperóxidos a nivel cloroplástico, teniendo como consecuencia la desorganización de las lamelas tilacoidales observadas en *L. nigrescens* (Contreras y cols., 2009). Es importante destacar que la interacción entre las PRXs y las TRXs no sólo participa en respuestas del tipo antioxidante, sino también en otros procesos celulares, debido a que las TRXs en organismos fotosintéticos pueden interaccionar con un alto número de proteínas con diversas funciones (Montrichard y cols., 2009). Por lo tanto en algas, la activación del sistema PRX/TRX permitiría regular la interacción que presentan las TRXs con proteínas del metabolismo del nitrógeno o la biosíntesis de ácidos grasos y también con proteínas quinasas que regulan la expresión de genes, tanto a nivel nuclear como cloroplástico (Buchanan y Balmer, 2005).

En ambas especies se registraron valores de actividad PRX/GRX similares a los registrados usando TRX como agente reductor. Sin embargo, en *L. nigrescens* no se registró una activación PRX/GRX frente a estrés por cobre. Esta enzima utiliza como sustrato GSH, compuesto de protección antioxidante (Anderson, 1998). Sin embargo, bajo condiciones de estrés oxidativo la actividad PRX/GRX podría ser inhibida debido a los bajos niveles intracelulares de glutatión. Estos bajos niveles podrían deberse a una inhibición de la enzima glutatión reductasa (GR) la cual restaura los niveles de glutatión reducido (GSH) a partir de glutatión oxidado (GSSG). Se ha descrito en *L. nigrescens* una inhibición de esta enzima y por lo tanto una disminución de los niveles intracelulares de GSH cuando esta especie se enfrenta a una condición de estrés generada por cobre (Contreras y cols., 2009). Estos bajos niveles de GSH también se pueden atribuir al uso de GSH como precursor de la síntesis de fitoquelatinas, péptidos

capaces de secuestrar directamente metales pesados (Cobbett, 2000) y a una hipotética regulación de la biosíntesis de GSH, mediada por la GRX, que, además de actuar como reductora de las PRXs de tipo II, actuaría como sensora del balance GSH / GSSG (Meyer, 2008). Por lo tanto, la baja actividad del sistema PRX/GRX en *L. nigrescens*, podría atribuirse no sólo a bajos niveles proteicos, sino también a la depleción del GSH presente, el que es necesario para regenerar las PRXs acopladas a GRXs.

Se observó diferencias entre ambas especies en los niveles de lipoperóxidos acumulados frente a la mayor concentración de cobre utilizada (i.e. 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$), tal como fue descrito previamente por Contreras y cols. (2009). Los lipoperóxidos son originados por daño a membranas u otras estructuras que contengan lípidos y contribuyen al daño celular al alterar las propiedades físico-químicas y la organización estructural de las membranas (Girotti, 1998). Se ha demostrado previamente que las PRXs pueden presentar un rol protector frente a las reacciones de lipoperoxidación (Cha y cols., 2007; Manevich y cols., 2009; Wang y cols., 2006). Sin embargo, no se ha puesto a prueba si los lipoperóxidos son capaces de inhibir la actividad PRX al igual que el H_2O_2 . En el presente trabajo se demuestra que, en las concentraciones donde disminuye la actividad PRX, aumentan los niveles de lipoperóxidos en ambas especies. En este contexto, es posible inferir que la actividad de las PRXs podría cumplir un rol protector atenuando los niveles de lipoperóxidos y, en consecuencia, su efecto nocivo (Figura 4.1). Además los lipoperóxidos, al igual que las ROS, participan en vías metabólicas relacionadas con la regulación de compuestos y enzimas antioxidantes o vías apoptóticas (Girotti y Kriska, 2004; Niki, 2009). Por lo tanto, la reducción de estas especies reactivas mediante la actividad PRX puede ser otra de las vías en donde las PRXs modulan vías de señalización. A nivel comparativo, los altos niveles de lipoperóxidos registrados en *L. nigrescens* tendrían relación a la inhibición de la enzima PRX en esta especie, lo que indicaría una mayor susceptibilidad al daño oxidativo generado por altos niveles de cobre en comparación con *S. gracilis*.

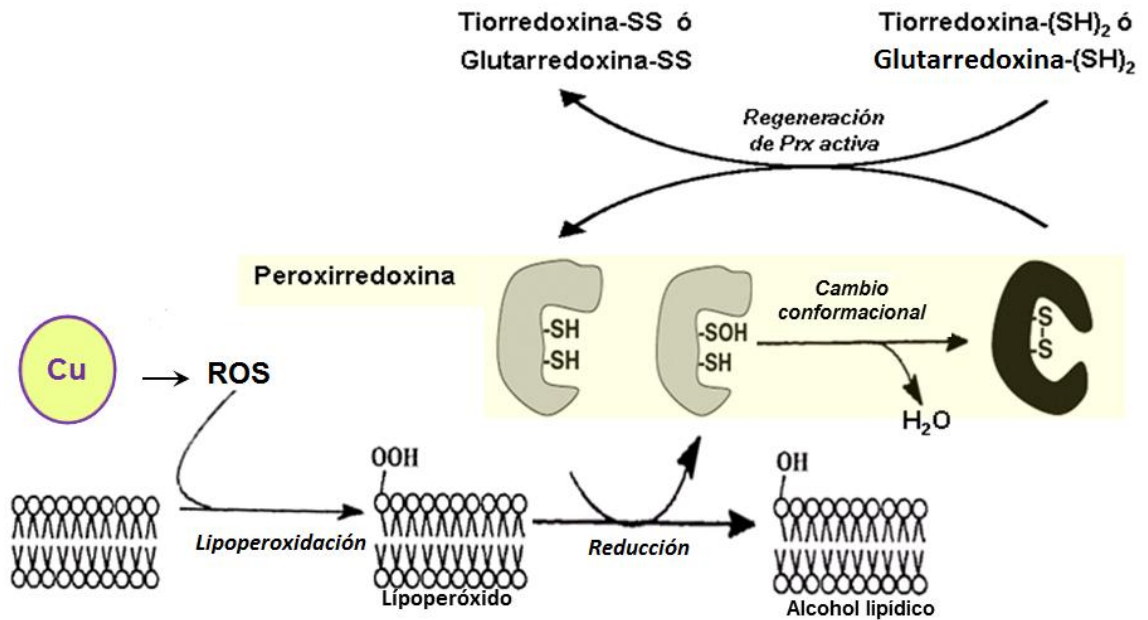


Figura 4.1. Protección frente a la formación de lipoperóxidos mediada por peroxirredoxinas.

Respecto a la medición de eficiencia máxima del fotosistema II (FSII) como marcador de estrés oxidativo, si bien se observó una disminución de este parámetro frente a cobre en *S. gracilis* y *L. nigrescens*, no se encontró diferencias significativas entre las especies. Además, la razón de cambio de eficiencia fotosintética fue menor en comparación a la razón de cambio de lipoperóxidos. Resultados previos indican que la eficiencia fotosintética en *L. nigrescens* disminuye significativamente en tratamientos con 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ sólo en períodos superiores a 5 días. Sin embargo, efectos más notorios se han registrado en individuos de zonas prístinas trasplantados a sitios contaminados con cobre (Ritter 2004, tesis de magíster). En la microalga verde *Chlorella pyrenoidosa* tratada con cobre a concentraciones de 2 μM a 40 μM (ca. 127 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ a 2.540 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, respectivamente) por 12 h, se registró una inactivación de los centros de reacción del FSII e inhibición del transporte electrónico (Xia y Tian,

2009). En las macroalgas verdes *U. armoricana* y *U. pertusa* se observó que entre varias respuestas fisiológicas, el cobre afectaría sutilmente la eficiencia del FSII, no observándose variaciones a tratamientos con concentraciones inferiores a $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Han y cols., 2008). En este contexto, aunque en ciertos sistemas y bajo ciertas condiciones de estrés, Fv/Fm puede utilizarse como indicador de daño oxidativo, bajo estrés por cobre es un parámetro poco sensible del daño generado a nivel de FSII. Además la disminución de este parámetro bajo una condición ambiental adversa no es indicador de una alteración irreversible del aparato fotosintético, sino más bien un sistema de protección para inhibir la formación de especies radicalarias a nivel cloroplástico (e.g. Contreras-Porcía y cols., 2011 a).

Respecto a la activación de las PRXs en función del tiempo, en *L. nigrescens* tratada con $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ se detectó un aumento de actividad PRX hasta las 12 h, sin observarse diferencias significativas en actividad a tiempos posteriores. Además, se observó que la disminución de la actividad PRX en $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ ocurre a partir de las 72 h de cultivo. Este fenómeno no fue observado en otras enzimas antioxidantes bajo la misma concentración del metal. Sin embargo, esto puede explicarse por los altos niveles de H_2O_2 presentes en *L. nigrescens* en $20 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Contreras y cols., 2009), concentraciones las cuales inhibirían la actividad PRX. En el caso de *S. gracilis*, se observó un aumento continuo de la actividad PRX en función del tiempo (i.e. 0 - 96 h) para 20 y $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$. Este patrón no fue similar al observado en otras enzimas antioxidantes estudiadas previamente en *S. lomentaria* bajo las mismas concentraciones del metal, las que aumentan su actividad rápidamente hasta las 24 h de cultivo, manteniéndose constantes a tiempos posteriores. Adicionalmente, en 20 y $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, no se observó inhibición de la actividad enzimática a tiempos posteriores como en *L. nigrescens*, debido a que en *S. gracilis* sólo se ha observado un aumento de los niveles de H_2O_2 de aproximadamente 4 veces sobre el nivel basal con 20 y $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, volviendo posteriormente a niveles cercanos a los basales (Contreras y cols., 2009).

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia en *S. gracilis* fueron acordes a lo que se registró a través de la medición de actividad enzimática, observándose mayor inmunodetección de PRX en $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, concentración en la cual se registró el máximo nivel de actividad enzimática. Estos resultados indicarían un aumento en los niveles proteicos de esta enzima lo cual se refleja en un aumento de actividad enzimática específica. En plantas vasculares, se ha observado previamente un aumento de los niveles proteicos de diversas PRXs en respuesta a estrés inducido por desecación, baja temperatura o foto-oxidación (Gama y cols., 2008). En macroalgas, como es el caso de *U. compressa*, la alta actividad PRX tiene relación con el aumento de expresión del gen *prx* bajo estrés por cobre (Contreras-Porcía y cols. 2011 b). En individuos de *S. gracilis* tratados en $300 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, se detectó niveles de fluorescencia similares a los basales. Estos resultados indicarían que bajo altas concentraciones del metal, la disminución de la actividad PRX estaría dada por una reducción de los niveles proteicos. Esto ha sido evidenciado previamente, como por ejemplo en *U. compressa* en donde la expresión del gen *prx* en individuos expuestos a $10 \mu\text{M}$ de cobre aumenta continuamente hasta los 5 días de cultivo, sin embargo al séptimo día de exposición a cobre, los niveles de expresión disminuyen drásticamente (Contreras-Porcía y cols., 2011 b). En *L. nigrescens*, no se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia PRX en el tejido de individuos expuestos a la concentración de cobre en la cual se registró una mayor actividad enzimática (i.e. $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$) o la concentración inhibitoria (i.e. $100 \mu\text{g Cu L}^{-1}$). Esta baja intensidad de fluorescencia se relaciona a los bajos valores de actividad PRX observados en estas concentraciones del metal, pero podría ser explicada además por una oxidación de los aminoácidos de la secuencia antigénica u otros aminoácidos de la proteína. De esta manera, alteraciones estructurales de la proteína (Davies, 2005), podría impedir el reconocimiento de la secuencia antigénica de la PRX por el anticuerpo, disminuyendo la detección de esta.

Según los resultados del análisis de la secuencia de la PRX, usada para el diseño del anticuerpo, ésta correspondería a una PRX del tipo II en plantas vasculares, además mediante “Western Blot” se determinó que el peso molecular de las PRX detectada en

S. gracilis y *U. compressa*, es de 18 kDa, similar al de las PRXs de tipo II (Tripathi y cols., 2009). Con respecto a las secuencias PRXs descritas en algas pardas, el mayor grado de similitud fue observado con una PRX tipo II (N° acceso NCBI: CBJ29011) de *Ectocarpus siliculosus* (Ochrophyta, Ectocarpales), ubicada posiblemente en el citoplasma. En *A. thaliana* las PRXs tipo II pueden ser detectadas tanto en organelos como en el citoplasma (Tabla 1.1) y todas son susceptibles a reducción por GRX (Tripathi y cols., 2009). En este contexto, mediante la técnica empleada para la detección PRX, no fue posible determinar la ubicación subcelular de éstas, pero sí distinguir un aumento en los niveles de las PRXs en células metabólicamente activas como las células corticales de *S. gracilis* en $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$. Estos resultados sugieren que la PRX reconocida por el anticuerpo, podría participar en la neutralización de ROS producidas por la alteración de procesos metabólicos por estrés oxidativo, como la fotosíntesis en los cloroplastos (Asada, 1999) o la respiración en mitocondrias (Kowaltowski y cols., 2009). Este aumento en los niveles de PRX a $40 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ coincide con la activación del sistema PRX/GRX en *S. gracilis* en la misma concentración de cobre. Similar a lo observado en *S. gracilis*, en *A. thaliana* se ha observado que la expresión de las PRXs es específica para ciertos tejidos. Por ejemplo, la expresión PRX aumenta frente a estrés por salinidad en hojas jóvenes fotosintéticamente activas y disminuye en tejidos fotosintéticamente inactivos como hojas senescentes y raíces (Horling y cols., 2002). Finalmente, en el caso de *L. nigrescens* la baja actividad de las PRXs acopladas a GRX, más los bajos niveles de PRX detectados por el anticuerpo, podría explicar alteraciones mitocondriales asociadas a estrés por cobre (Contreras y cols., 2009), las que muy probablemente podrían conllevar a una disfunción secundaria del organelo.

5. CONCLUSIONES

La información obtenida en este trabajo indica que las PRXs en algas pardas participan como mecanismo de tolerancia al estrés oxidativo generado por cobre. La activación de las PRXs en *L. nigrescens* en comparación a *S. gracilis*, es significativamente menor a nivel basal como en todos los tratamientos con cobre. La actividad PRX es inhibida frente a bajos niveles de cobre en *L. nigrescens*, lo cual tiene relación con los altos niveles de lipoperóxidos registrados en esta especie. Esta observación indicaría un rol de regulación de las PRXs en la formación de lípidos oxidados por parte de esta enzima bajo una condición de estrés oxidativo (Figura 4.1).

La participación activa de las peroxirredoxinas en *S. gracilis* permite explicar funcionalmente la capacidad de esta especie de tolerar ambientes contaminados con altos niveles de metal, mediante la reducción de peróxidos y posiblemente mediante el control de vías de señalización redox, que regulan la adaptación de esta especie a sitios contaminados por cobre. Contrariamente, la pérdida de actividad de las PRXs frente a cobre en *L. nigrescens* ayudaría a explicar el grave daño celular que se genera en esta especie y, a nivel ecológico, el impedimento que esto le genera para colonizar ambientes contaminados por el metal.

6. REFERENCIAS

Akerman SE, Müller S (2005). Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 280: 564-570

Anderson ME (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact.* 111-112: 1-14

Andrade S, Medina MH, Moffett JW, Correa JA (2006). Cadmium-copper antagonism in seaweeds inhabiting coastal areas affected by copper mine waste disposals. *Environ Sci Technol.* 40: 4382-4387

Asada K (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50: 601-639

Baier M, Dietz KJ (1996). Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol Biol* 31: 553–564

Baier M, Dietz KJ (1997). The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J.* 12: 179-190

Baker CJ, Orlandi EW (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.* 33: 299-321

Bremner I (1998). Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr.* 67: 1069S-1073S

Buchanan BB, Balmer Y (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol.* 56: 187-220

Buettner GR (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 300: 535-543

Camus C, Meynard AP, Faugeron S, Kogame K, Correa JA (2005). Differential life history phase expression in two coexisting species of *Scytosiphon* (Phaeophyceae) in northern Chile. *J Phycol.* 41: 931-941

Cancino J, Santelices B (1984). Importancia ecológica de los discos adhesivos de *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta) en Chile Central. *Rev Chil Hist Nat.* 57: 23–33

Caporaletti D, D'Alessio AC, Rodriguez-Suarez RJ, Senn AM, Duek PD, Wolosiuk RA (2007). Non-reductive modulation of chloroplast fructose-1, 6-bisphosphatase by 2-Cys peroxiredoxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 355: 722-727

Castilla JC, Nealler E (1978). Marine environmental impact due to mining activities of El Salvador copper mine, Chile. *Mar Pollut Bull.* 9: 67-70

Castilla JC (1983). Environmental impacts in sandy beaches of copper mine tailing at Chañaral, Chile. *Mar Pollut Bull.* 14: 459-464

Castilla JC, Correa JA (1997). Copper tailing impacts in coastal ecosystems of northern Chile: from species to community responses. En *Copper-International Meeting Report South Australian Health Commission, National Environmental Health Forum* (eds: Moore MR, Imray P, Dameron C, Callan P, Langley A, Mangas S), pp. 81–92. Openbook Publishers, Australia.

Cha MK, Hong SK, Kim IH (2007). Four thiol peroxidases contain a conserved GCT catalytic motif and act as a versatile array of lipid peroxidases in *Anabaena sp.* PCC7120. *Free Radic Biol Med.* 42:1736-1748

Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem.* 269: 27670–27678.

Cobbett CS (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol.* 3: 211-216

Collén J, Davison IR (1999). Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell Environ.* 22: 1143–1151

Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M (2003). The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem.* 278: 23747–23752

Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz K-J, Issakidis-Bourguet E (2004). Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new y-type. *Plant Physiol.* 136: 4088–4095

Contreras L, Moenne A, Correa JA (2005). Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *J Phycol.* 41: 1184-1195

Contreras L, Dennett G, Moenne A, Palma E, Correa JA (2007). Molecular and morphologically distinct *Scytosiphon* species (Scytosiphonales, Phaeophyceae) display similar antioxidant capacities. *J. Phycol* 43: 1320–1328

Contreras L, Ritter A, Boehmwalf F, Dennett G, Guitton N, Moenne A, Pineau Ch, Potin P, Correa JA (2008). Two-dimensional gel electrophoresis analysis of brown algal protein extracts (Phaeophyceae). *J Phycol.* 44: 1315-1321

- Contreras L, Mella D, Moenne A, Correa JA (2009).** Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aquat Toxicol.* 94: 94-102
- Contreras L, Moenne A, Gaillard F, Potin P, Correa JA (2010).** Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae). *Aquat Toxicol.* 96: 85-89
- Contreras-Porcía L, Thomas D, Flores V, Correa JA (2011 a).** Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). *J Exp Bot.* 62: 1815-1829
- Contreras-Porcía L, Dennett G, González A, Vergara E, Medina C, Correa JA, Moenne A (2011 b).** Identification of copper-induced genes in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). *Mar Biotechnol* 13: 544-556
- Correa JA, Ramírez M, de la Harpe J, Román D, Rivera L (2000).** Copper mining effluents and grazing as potential determinants of algal abundance and diversity in northern Chile. *Environ Monit Assess.* 61: 265–281.
- Dalton DA, Hanus FJ, Russell SA, Evans HJ (1987).** Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol.* 83:789-94.
- Davies MJ (2005).** The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta.* 1703: 93-109
- Dayer R, Fischer BB, Eggen RI, Lemaire SD (2008).** The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 179: 41-57
- Deponte M, Rahlfs S, Becker K (2007).** Peroxiredoxin systems of protozoal parasites. *Subcell Biochem.* 44: 219–229
- Dietz KJ, Horling F, König J, Baier M (2002).** The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot.* 53: 1321–1329
- Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Tognetti V, Nunes de Miranda SM, Baier M, Finkemeier I (2006).** The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot.* 57: 1697–1709
- Fariña J, Castilla JC (2001).** Temporal variation in the diversity and cover of sessile species in rocky intertidal communities affected by copper mine tailing in northern Chile. *Mar Pollut Bull.* 42: 554–568
- Feierabend J (2005).** Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. En: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants.* (ed: Smirnoff N) Oxford: Blackwell Publishing, pp. 101-140

- Foyer CH, Noctor G (2009).** Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal.* 11: 861-905
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006).** Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 436-442
- Gama F, Bréhélin C, Gelhaye E, Meyer Y, Jacquot JP, Rey P, Rouhier N (2008).** Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx II E. *Physiol Plant.* 133: 599-610
- Girotti AW (1998).** Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 39: 1529-1542
- Girotti AW, Kriska T (2004).** Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal.* 6: 301-310
- Goyer A, Haslekås C, Miginiac-Maslow M, Klein U, Le Marechal P, Jacquot JP, Decottignies P (2002).** Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem.* 269: 272-282
- Greenwood JS, Chrispeels MJ (1985).** Correct targeting of the bean storage protein phaseolin in the seeds of transformed tobacco. *Plant Physiol.* 79: 65-71
- Hall A, Karplus PA, Poole LB (2009).** Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* 276: 2469-2477
- Halliwell B (1974).** Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: Solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytol.* 73: 1075-1086
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1-14
- Han T, Kang SH, Park JS, Lee HK, Brown MT (2008).** Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquat Toxicol.* 86:176-184
- Horling F, König J, Dietz KJ (2002).** Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiol Biochem.* 40: 491-499
- Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY (2004).** Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell.* 117: 625-635

- Jones DP (2006).** Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 8: 1865-1879
- Konig J, Lotte K, Plessow R, Brockhinke A, Baier M, Dietz KJ (2003).** Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin- Role of the C terminus and the quaternary structure. *J Biol Chem.* 278: 24409–24420
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE (2009).** Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 47: 333-343
- Kunce CM, Trelease RN, Turley RB (1988).** Purification and biosynthesis of cottonseed (*Gossypium hirsutum L.*) catalase. *Biochem J* 251: 147-155
- Lamkemeyer P, Laxa M, Collin V, Li W, Finkemeier I, Schöttler MA, Holtkamp V, Tognetti VB, Issakidis-Bourguet E, Kandlbinder A, Weis E, Miginiac-Maslow M, Dietz KJ (2006).** Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *Plant J.* 45: 968-981
- Manevich Y, Shuvaeva T, Dodia C, Kazi A, Feinstein SI, Fisher AB (2009).** Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Arch Biochem Biophys.* 485:139-149
- Medina M, Andrade S, Faugeron S, Lagos N, Mella D, Correa JA (2005).** Biodiversity of rocky intertidal benthic communities associated with copper mine tailing discharges in northern Chile. *Mar Pollut Bull.* 50: 396-409
- Meyer AJ (2008).** The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol.* 165: 1390-1403
- Mittler R (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 9: 405-410
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2009).** Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics.* 72: 452-474
- Mowla SB, Thomson JA, Farrant JM, Mundree SG (2002).** A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. *Planta.* 215: 716-726
- Niki E (2009).** Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* 47: 469-484
- Noctor G, Foyer CH (1998).** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 249-279
- Powell SR (2000).** The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 130: 1447S–1454S

- Pulido P, Cazalis R, Cejudo FJ (2009).** An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. *Plant J.* 57: 132–145
- Ratkevicius N, Correa J, Moenne A (2003).** Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. *Plant Cell Environ.* 26: 1599–1608
- Reith M, Munholland J (1993).** A high-resolution gene map of the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. *Plant Cell.* 5: 465-475
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005).** Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 38: 1543-1552
- Ritter A (2004).** Efectos tóxicos en la fotosíntesis de *Lessonia nigrescens*. *Memoria de Maîtrise de Biologie des Populations et Ecosystèmes Mention Milieu Marin. Francia, 2005.*
- Rouhier N, Jacquot JP (2002).** Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynth Res.* 74: 259-268
- Rouhier N, Jacquot JP (2005).** The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 38: 1413-1421
- Schreibelt G, van Horssen J, Haseloff RF, Reijerkerk A, van der Pol SM, Nieuwenhuizen O, Krause E, Blasig IE, Dijkstra CD, Ronken E, de Vries HE (2008).** Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med.* 45: 256-264
- Sies H (1991).** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 69: 965-968
- Smirnoff N (2000).** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol.* 3: 229-235
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85. Erratum in: *Anal Biochem* (1987) 163: 279
- Stacy RA, Munthe E, Steinum T, Sharma B, Aalen RB (1996).** A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Mol Biol.* 31: 1205–1216

- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD (2003).** Trace elements in human physiology and pathology. *Copper Biomed Pharmacother.* 57: 386–398
- Thurman RG, Ley HG, Scholz R (1972).** Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur J Biochem.* 25: 420-430
- Tripathi BN, Bhatt I, Dietz KJ (2009).** Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma.* 235: 3-15
- Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Thomson L, Flohé L, Radi R (2007).** Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. En *Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions* (eds: Flohé L, Harris JR), pp: 83-113. Springer
- Vásquez JA, Santelices B (1984).** Comunidades de macroinvertebrados en discos adhesivos de *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta) en Chile central. *Rev Chil Hist Nat.* 57: 131-154
- Vásquez J, Vega M, Matsuhira B, Urzúa C (1999).** The ecological effects of mining discharges on subtidal habitats dominated by macroalgae in northern Chile: population and community level studies. *Hydrobiologia.* 398/399: 217–229
- Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB, Hidalgo E (2005).** A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 8875-8880
- Wang G, Hong Y, Johnson MK, Maier RJ (2006).** Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*: protective roles of peroxiredoxins. *Biochim Biophys Acta.* 1760: 1596-1603
- Weiss O, Reigosa MJ (2001).** Modulated fluorescence. En: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques.* Roger, R. and Joaquin, M. eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston.173-183
- Xia J, Tian Q (2009).** Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa* - OJIP chlorophyll a fluorescence analysis. *J Environ Sci (China).* 21: 1569-1574
- Zar JH (2010).** Biostatistical Analysis. 5th ed. *Prentice Hall*
- Zhang B, Wang Y, Su Y (2009).** Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Lett.* 286: 154-160