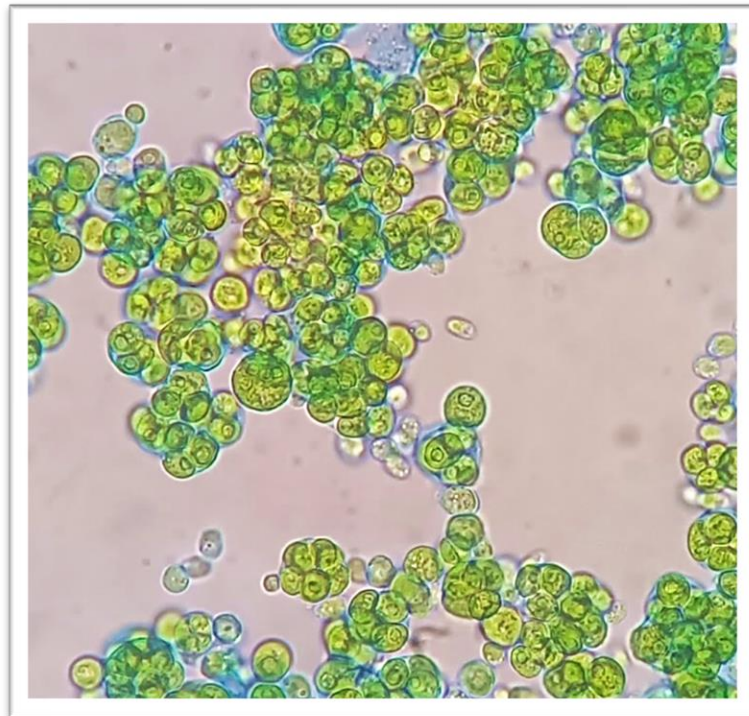


Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión
Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Efectos del Bisfenol A Sobre la Homeostasis Redox y la Ferroptosis
en Cultivos de *Chlamydomonas* con Distintos Regímenes
Nutricionales**



Jesús Carballo Arribas

Julio 2023

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión
Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Efectos del Bisfenol A Sobre la Homeostasis Redox y la Ferroptosis en
Cultivos de *Chlamydomonas* con Distintos Regímenes Nutricionales

Effects of Bisphenol A on Redox Homeostasis and Ferroptosis in
Chlamydomonas Cultures with Different Nutritional Regimens

Jesús Carballo Arribas

TUTOR/ES

Luis Valledor González

María Carbó Muñoz

Agradecimientos

A mi tutor, Luis Valledor por darme la oportunidad de formarme, aprender tanto como he podido aprender en este trabajo y guiarme a lo largo del camino.

A mi tutora, María Carbó por apoyarme en todo momento, enseñarme gran parte de lo que he aprendido en estos meses, estar ahí para ayudarme a solventar mis errores y, sobre todo, transmitirme su cariño y fascinación por esta pequeña alga verde y por la ciencia.

A Lara y Sara porque su ayuda constante, su cercanía y su amabilidad en el laboratorio fueron un pilar fundamental para facilitar y hacer mucho más bonito el día a día del desarrollo de este trabajo.

A Ana, porque sin su ayuda midiendo y cubriendo cubetas en papel albal quién sabe qué hubiera sido de mí. Gracias por todo lo que me enseñaste.

A Borja por la cantidad de veces que me hizo reír, en cualquier situación.

RESUMEN

El bisfenol A (BPA) es un componente plástico que actúa como un potente disruptor endocrino en mamíferos. La concentración de este compuesto en los ecosistemas es elevada, y supone una prioridad eliminarlo de forma eficiente de los mismos. Recientemente, se demostró la capacidad de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* de aclimatarse a la ferroptosis inducida por la toxicidad de este xenobiótico y su capacidad de bioacumularlo en cantidades altas (Carbó *et al.*, 2023). Dada la eficiencia de este microorganismo para biorremediar este compuesto, en el presente trabajo de fin de máster se realizó la monitorización de distintos parámetros fisiológicos para comparar la respuesta entre dos cepas distintas de este organismo, con y sin pared celular, bajo regímenes nutricionales distintos a tiempos de exposición cortos (15 min, 1 h, 5 h y 24 h) y largos (48 h, 72 h y 144 h) ante exposición a BPA (40 mg/L). Se halló una rápida recuperación de los cultivos al daño producido por el BPA a las 72 h de exposición y se caracterizó la promoción del crecimiento celular inducida por el BPA para los tiempos más cortos de 15 min y 1 h. Además, se observó una resistencia muy elevada de la cepa cultivada en condiciones de autotrofia a la toxicidad por BPA. También se describió por primera vez la ocurrencia de hormesis en presencia de este contaminante en los primeros minutos de tratamiento. Por ello, los resultados obtenidos permitieron proponer el tratamiento con BPA en la cepa CC1690 (con pared celular) para continuar con ensayos moleculares. Finalmente, se llevó a cabo la puesta a punto de los parámetros de qPCR para cuantificar la expresión de algunos de los principales genes de interés implicados en los procesos de homeostasis redox y ferroptosis en esta microalga.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a plastic component that acts as a potent endocrine disruptor in mammals. The concentration of this compound in ecosystems is high, and its removal from the environment is a priority. Recently, it has been described the ability of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* to acclimate to the BPA-induced ferroptosis and its capacity to bioaccumulate it in high amount (Carbó *et al.*, 2023). Given the efficiency of this microorganism for bioremediating this compound, in the present master's thesis work we monitored different physiological parameters to compare the response between two different strains of this microorganism -with and without a cell wall- under different nutritional regimes during short (15 min, 1 h, 5 h, and 24 h) and long-term (48 h, 72 h, and 144 h) exposure times to BPA (40 mg/L). It was observed a rapid recovery of the cultures from the damage caused by BPA at 72 h of exposure, and the promotion of cell growth induced by BPA was characterized for shorter time periods of 15 min and 1 h. Additionally, a very high resistance to BPA toxicity was observed in the strain cultivated under autotrophic conditions. Additionally, a very high resistance to BPA toxicity was observed in the strain cultivated under autotrophic conditions. The occurrence of hormesis in the presence of this contaminant in the early minutes of treatment was also described for the first time. Furthermore, the qPCR parameters were optimized to quantify the expression of some of the key genes involved in redox homeostasis and ferroptosis processes in this microalga.

Abreviaturas

ACSL: sintetasa de acil-CoA de cadena larga
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
AKR1C: aldo-ceto reductasa tipo 1C
ARN: ácido ribonucleico
ARNasa: ribonucleasa
BPA: bisfenol A, 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano
BTUB: beta tubulina
Chlamydomonas: *Chlamydomonas reinhardtii*
DHODH: dehidroorotato deshidrogenasa
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTPs: dinucleótidos trifosfato
EPS: exopolisacáridos
FDA: diacetato de fluoresceína
F_m: fluorescencia variable
FSP1: supresor de ferroptosis independiente de glutatión
F_v: fluorescencia máxima
g: fuerza centrífuga relativa
GSH: glutatión
GST: glutatión-S-transferasa
H2DCFDA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
IDA5: actina
LED: diodo emisor de luz
LOX: lipoxigenasa de linoleato 9S
MalicE: enzima málica
MnSOD: manganeso superóxido dismutasa
mt+: *mating +*
O₂⁻: anión superóxido
OH: radical hidroxilo
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PSB: tampón de solubilización del pellet
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RACK1: gen receptor de la proteína quinasa C activada
RFU: unidades relativas de fluorescencia
ROS: especies reactivas del oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
SnRK1: sucrose non-fermenting related kinase 1
TAP: tris-acetato-fosfato
Tris: tris hidroximetil aminoetano
UBI: ligasa de proteína ubiquitina
UV/vis: ultravioleta/visible
v/v: relación volumen/volumen
VDAC2: canal de anión dependiente del voltaje 2

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Antecedentes y planteamiento.....	1
1.2	Objetivos	4
2	MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1	Cepas y cultivo	5
2.2	Diseño experimental.....	5
2.3	Crecimiento celular y fotosíntesis	6
2.4	Viabilidad celular y ROS total	6
2.5	Engrosamiento de la matriz extracelular	7
2.6	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	7
2.7	Puesta a punto de cebadores	9
2.8	Análisis estadístico	10
3	RESULTADOS	11
3.1	Crecimiento celular y fotosíntesis	11
3.2	Matriz extracelular	13
3.3	Viabilidad celular y ROS total	14
3.4	Puesta a punto del análisis de la expresión génica.....	16
4	DISCUSIÓN	18
4.1	Efectos Bisfenol A.....	18
4.2	Puesta a punto de los cebadores.....	19
5	CONCLUSIONES	21
6	BIBLIOGRAFÍA	22
7	ANEXOS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del bisphenol A (BPA).....	1
Figura 2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2
Figura 3. Desbalance redox y ferroptosis inducidos por el BPA	3
Figura 4. Diseño experimental	5
Figura 5. Esquema de monitorización de la densidad celular y eficiencia fotosintética.....	6
Figura 6. Ensayo de viabilidad celular y ROS total.....	7
Figura 7. Crecimiento celular (A) y F_v/F_m (B) de CC1690 en medio TAP con carbono	11
Figura 8. Crecimiento celular (A) y F_v/F_m (B) de CC503 en medio TAP con carbono	11
Figura 9. Crecimiento celular (A) y F_v/F_m (B) de CC1690 en medio TAP sin carbono	12
Figura 10. Aspecto de los cultivos a lo largo del tiempo	12
Figura 11. Fotografías de la matriz extracelular de CC1690 con carbono	13
Figura 12. Fotografías de la matriz extracelular de CC1690 sin carbono	13
Figura 13. Fotografías de la matriz extracelular de CC503 con carbono	14
Figura 14. Viabilidad celular (A) y ROS (B) de CC1690 con carbono.....	15
Figura 15. Viabilidad celular (A) y ROS (B) de CC1690 sin carbono.....	15
Figura 16. Viabilidad celular (A) y ROS (B) de CC503 con carbono.....	16
Figura 17. ARN extraído visualizado en gel de agarosa al 1%.	16
Figura 18. Resultado de la PCR con gradiente para todos los cebadores.....	17
Figura 19. Resultado de la PCR con gradiente para 6 cebadores.....	17

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y planteamiento

El desarrollo industrial y aumento de la producción agrícola ligados al crecimiento continuo de la población, estimado en un 1,13% al año (Tripathi *et al.*, 2018), han supuesto la emisión desmesurada de compuestos xenobióticos al medioambiente a lo largo del planeta. El estudio de las posibles afecciones a los sistemas biológicos que dichos compuestos de origen antropogénico y sumamente recalcitrantes puedan causar es una prioridad. En este contexto, la biotecnología en su conjunto juega un papel clave en la sustitución de productos industriales dañinos para los ecosistemas, por otros más inocuos y renovables o el control y la biorremediación de dicha contaminación (Kovács, 2019). Existe evidencia sobre cómo microplásticos y nanoplásticos ya presentes en la gran mayoría de ecosistemas son absorbidos por los organismos fotosintéticos como plantas, algas o fitoplancton por distintas vías y mecanismos resultando en una reducción de su capacidad fotosintética (Karalija *et al.*, 2022).

Entre los componentes plásticos, el Bisfenol A (BPA), 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano (**Figura 1**), es un potente disruptor endocrino en mamíferos, ampliamente usado en la producción de resinas fenólicas, poliacrilatos, poliésteres, plásticos policarbonados y resinas epoxi comúnmente usadas en el recubrimiento de envases alimenticios (Kang *et al.*, 2006; Abraham y Chakraborty, 2020). Este compuesto no solo representa un peligro para las personas, sino que el lixiviado de los residuos que estén fabricados con él y los afluentes de las industria en las que se usa regularmente suponen una vía de contaminación ambiental

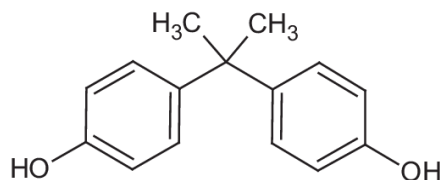


Figura 1. Estructura molecular del bisfenol A (BPA).

Aunque la toxicidad del BPA en mamíferos es conocida, el estudio sobre su efecto en ecosistemas acuáticos es mucho menor. Estos ecosistemas constituyen uno de sus principales sumideros ambientales, hasta tal punto que los investigadores Staples *et al.* (2018) encontraron la presencia de BPA en más del 66% de 5057 muestras de agua marina y dulce de Europa. Aunque los ensayos realizados acerca de los daños que puede originar el BPA sobre microorganismos fotosintéticos son escasos, estudios realizados en microalgas como *Picocystis*, *Chlamydomonas* y *Chlorella* muestran la capacidad de este compuesto de inducir un estrés oxidativo e inhibir su crecimiento, a la vez que su fuerte capacidad de aclimatación a su toxicidad (Ben *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2014). Estos microorganismos destacan por su capacidad de resistir y aclimatarse el estrés inducido por concentraciones de BPA superiores a las registradas en algunos efluentes industriales actuales de hasta 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Hernández *et al.*, 2022). Además, son múltiples los estudios que hallaron capacidad biorremediadora y bioacumuladora para una gran variedad de especies de microalgas como *Stephanodiscus hantzschii* (Li *et al.*, 2009), *Chlamydomonas mexicana*, *Chlorella Vulgaris* (Ji *et al.*, 2014) o *Chlamydomonas reinhardtii* (Esperanza *et al.*, 2020, Carbó *et al.*, 2023) entre otras.

Chlamydomonas reinhardtii (de aquí en adelante *Chlamydomonas*) es una microalga verde unicelular (**Figura 2**) usada ampliamente como modelo, debido a su crecimiento rápido, ciclo de vida simple, existencia de gran cantidad de recursos disponibles como genomas, múltiples cepas naturales y mutantes aisladas y su elevada capacidad biorremediadora ya descrita para otros compuestos xenobióticos y su reconversión en biofuel (Sánchez *et al.*, 2019; Nazos *et al.*, 2017; Harris 2001; Hasan *et al.*, 2014). Por ello, se trata de un organismo idóneo para el estudio y desarrollo de nuevas técnicas de biorremediación para el BPA.

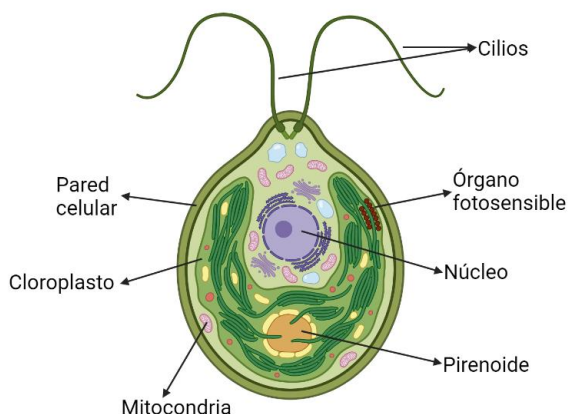


Figura 2. *Chlamydomonas reinhardtii*. Elaboración propia mediante Biorender.

Recientemente, Carbó *et al.*, (2023) demostraron su capacidad para bioacumular grandes cantidades de BPA a la vez que describieron los mecanismos metabólicos involucrados en su detoxificación, revelando por primera vez que este compuesto genera estrés oxidativo mitocondrial que deriva en la muerte celular por ferroptosis.

El BPA genera un desequilibrio metabólico ligado a un fuerte aumento de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) entre otras. Estas moléculas son comúnmente producidas en los organismos durante la fotosíntesis o por estreses bióticos y abióticos, pudiendo actuar como señalizadoras de gran cantidad de procesos metabólicos (Wakao y Niyogi, 2021). A concentraciones elevadas inducen un daño celular significativo a través de procesos como la lipoperoxidación de la pared celular, de la membrana tilacoidal y mitocondrial; la pérdida de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b y carotenoides) (Sharma *et al.*, 2012); la reducción de la eficiencia fotosintética, pudiendo en última instancia desembocar en la interrupción de la cadena de transporte de electrones (Margarida *et al.*, 2017); y la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Đurovcová *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2019). En el caso de *Chlamydomonas*, se produce un aumento del ROS en forma de H_2O_2 que reacciona con el hierro II mediante la reacción de Fenton, dando lugar a hierro III y OH^{\cdot} , promoviendo la peroxidación lipídica de la membrana mitocondrial e induciendo un proceso de autofagia, que en último término induce la muerte celular programada (**Figura 3**). Este proceso es denominado ferroptosis, y media la respuesta al BPA en este organismo (Carbó *et al.*, 2023). A su vez, gran parte del BPA es biotransformado por conjugación con glutatión (GSH) mediante la enzima glutatión-S-transferasa (GST) (Nakajima *et al.* 2007). Sin embargo, como la cantidad inicial de glutatión disponible es escasa, este proceso de muerte celular no puede ser aliviado inicialmente tras la primera exposición a este xenobiótico. No obstante, *Chlamydomonas* tiene la capacidad de revertir la ferroptosis

inducida por BPA, recuperando a partir de las 72 h de exposición los niveles de biomarcadores específicos de estrés en microalgas (Carbó *et al.*, 2023).

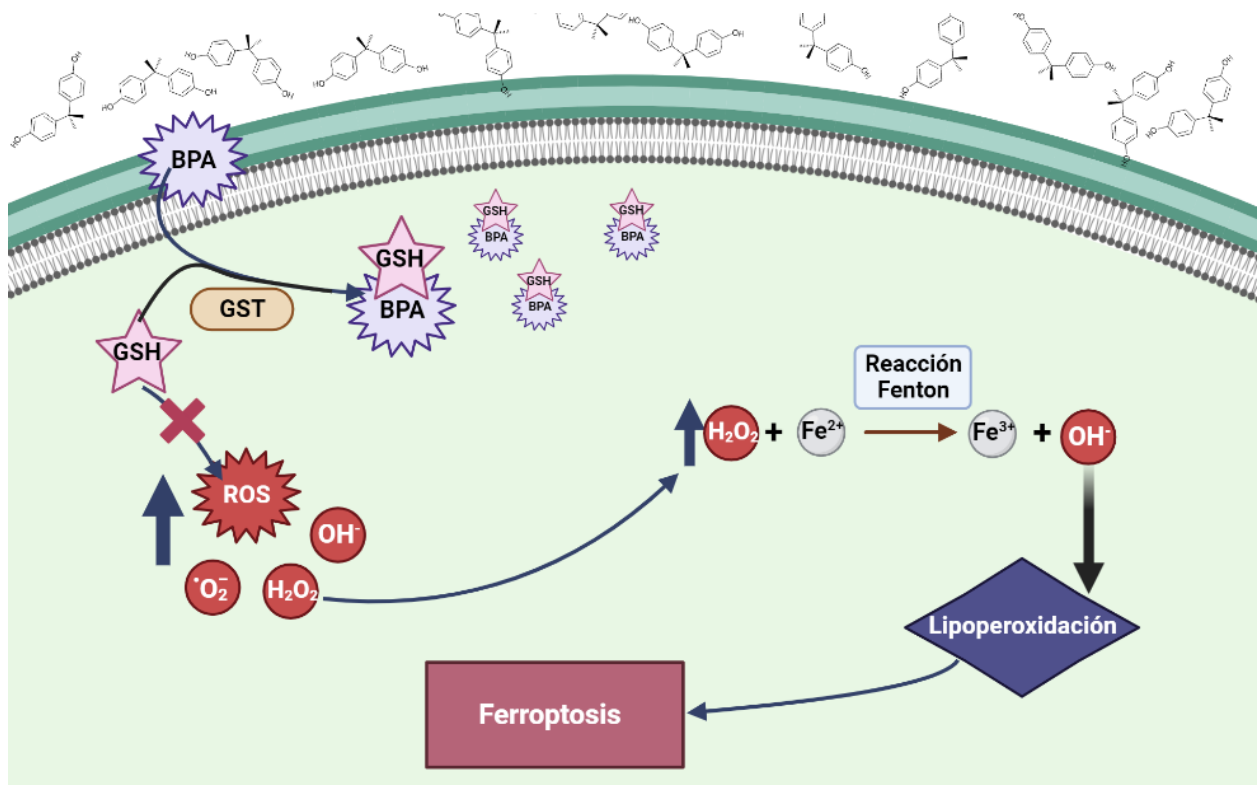


Figura 3. Desbalance redox y ferroptosis inducidos por el BPA (Carbó *et al.*, 2023). Elaboración propia mediante Biorender.

Así pues, como ya es conocido el mecanismo de detoxificación de este compuesto, el siguiente paso lógico en la biorremediación del BPA conduciría a una mejora de la eficiencia de este proceso. Por ello, la aclimatación de *Chlamydomonas* a crecer en un medio de cultivo con BPA como única fuente de carbono es una estrategia a considerar. Sin carbono, *Chlamydomonas* es capaz de desarrollarse activando los mecanismos de defensa a este estrés tales como la subfamilia de genes *SnRK1* (*sucrose non-fermenting related kinase 1*). Esta familia de proteínas actúa como parte en un complejo sistema de regulación metabólica con el fin de conferir una mayor supervivencia celular (Colina *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta que el metabolismo celular y, en concreto, la aclimatación a la presencia o ausencia de una fuente de carbono durante el crecimiento de *Chlamydomonas* es un factor decisivo en la gran mayoría de estudios focalizados en la optimización de procesos de biorremediación (Zhan *et al.*, 2017) y su estrecha relación con la activación de mecanismos de defensa a estrés abiótico, resulta de interés estudiar el crecimiento, respuesta y comportamiento de distintas cepas de esta microalga al BPA en función del régimen nutricional (autótrofo/mixótrofo) en el que crecen; pudiendo constituir el propio BPA suministrado a los cultivos una fuente de carbono a consumir para su desarrollo.

1.2 Objetivos

En consecuencia, los objetivos de este trabajo son:

- Describir el crecimiento, eficiencia fotosintética, viabilidad celular, el engrosamiento de la matriz celular y la generación de especies reactivas del oxígeno en *Chlamydomonas reinhardtii* CC1690 (con pared celular) y CC503 (deficiente en pared celular) en presencia de BPA y condiciones de cultivo con y sin fuente de carbono.
- Poner a punto las condiciones de qPCR para cuantificar la expresión de los genes en *Chlamydomonas* de las principales enzimas implicadas en los procesos de homeostasis redox y ferroptosis

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y cultivo

Las cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizadas fueron CC1690 y CC503 (mt+, cw92), obtenidas del Chlamydomonas Culture Collection (<https://www.chlamycollection.org/>). Las dos cepas se seleccionaron porque CC1690 tiene pared celular completa y CC503 es deficiente para este orgánulo. Las células se cultivaron en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP). (Harris, 1989) Este medio de cultivo contiene ácido acético (1 mL L^{-1}) como única fuente de carbono. Para las condiciones de ausencia de fuente de carbono no se suministró el ácido acético al medio TAP. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad utilizando luz blanca LED con una intensidad de $200 \mu\text{mol foton}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ y en agitación de 175 rpm (**Anexos 1 y 2**).

2.2 Diseño experimental

Se prepararon dos cultivos semilla de la cepa CC1690, uno utilizando TAP con carbono y otro con ausencia del mismo con el fin de aclimatar las células, así como un cultivo semilla de la cepa CC503 con carbono.

Para llevar a cabo los ensayos, se realizaron cultivos con y sin fuente de carbono por triplicado en matraces Erlenmeyer de 0,5 L con un volumen de 250 mL. Se ajustó a una concentración celular inicial de $5 \cdot 10^4 \text{ células mL}^{-1}$ a partir de los cultivos semilla en fase de crecimiento exponencial (**Figura 4**). Los cultivos se incubaron en las condiciones anteriormente descritas durante 2 horas antes de distribuirlos en matraces de 0,5 L. Este paso se realizó con el fin de evitar el posible impacto producido en los organismos al cambiar de medio de cultivo.

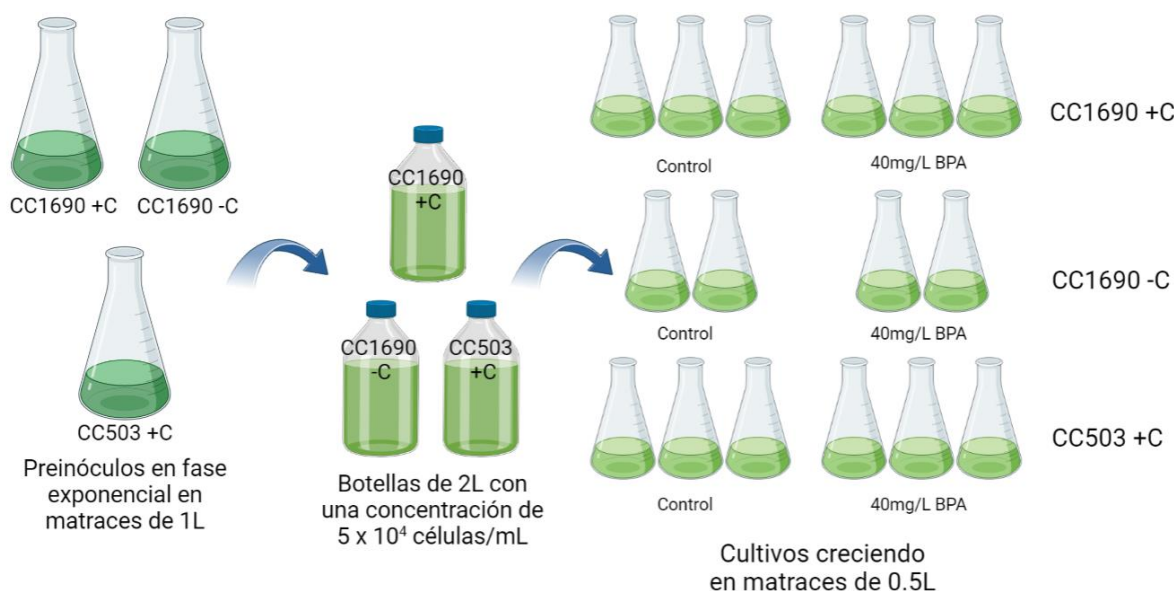


Figura 4. Diseño experimental. Elaboración propia mediante Biorender.

La concentración de BPA utilizada fue de 40 mg L^{-1} basada en el estudio realizado por Carbó *et al.* (2023), para lo cual se adicionaron $75,19 \mu\text{L}$ de un stock de $0,133 \text{ g mL}^{-1}$ de BPA

los cultivos de CC1690 con carbono, sin carbono y CC503 con carbono. Se añadió la misma cantidad de volumen en metanol (disolvente del BPA) a los cultivos control.

2.3 Crecimiento celular y fotosíntesis

Se realizaron muestreos de densidad celular y fotosíntesis para los tiempos de 0 h, 15 min, 1 h, 5 h, 24 h, 48 h, 72 h y 144 h. Para ello, la densidad celular se determinó mediante espectrofotometría con las longitudes de onda de 630 nm y 750 nm (Nabi UV/vis MicroDigital Co., Korea). Dicha concentración se calculó para cada cepa en base a las siguientes fórmulas previamente determinadas:

$$\text{CC1690 (células mL}^{-1}\text{)} = \frac{\frac{\text{Abs630nm} + 0,0067}{3 \cdot 10^{-6}} + \frac{\text{Abs750nm} - 0,0065}{2 \cdot 10^{-6}}}{2}$$

$$\text{CC503 (células mL}^{-1}\text{)} = \frac{\frac{\text{Abs630nm} - 0,04357}{2 \cdot 10^{-6}} + \frac{\text{Abs750nm} - 0,0529}{1 \cdot 10^{-6}}}{2}$$

Para determinar la eficiencia del fotosistema II (F_v/F_m) se utilizó un fluorímetro de modulación de amplitud de pulso (Walz, JUNIOR-PAM) tras un periodo de incubación de 15 min en oscuridad (**Figura 5**).

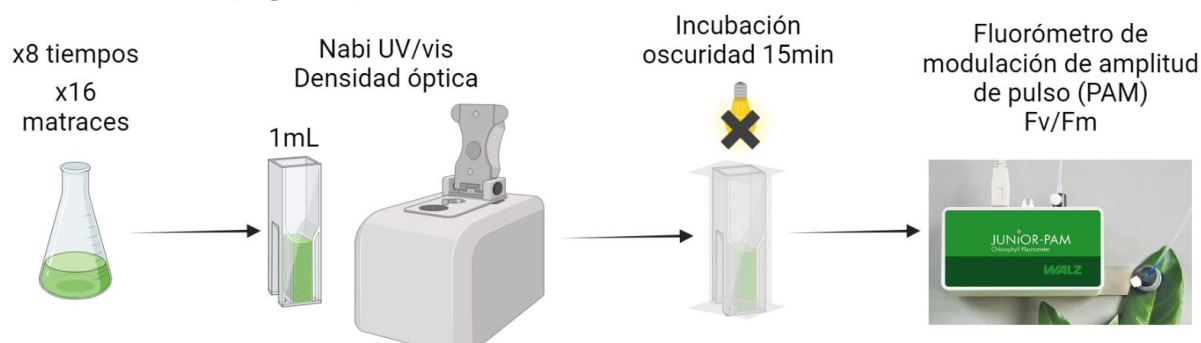


Figura 5. Esquema de monitorización de la densidad celular y eficiencia fotosintética. Elaboración propia mediante Biorender.

2.4 Viabilidad celular y ROS total

Se centrifugó 1 mL de cada cultivo por duplicado durante 5 min a 1900 g y se desechó el sobrenadante. En el caso de la viabilidad el pellet se resuspendió en 500 μL de diacetato de fluoresceína (FDA) ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ diluido en acetona) y se incubó en oscuridad por 15 min a temperatura ambiente. Para el ROS total, el pellet se resuspendió en 500 μL de 2',7'-dichlorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) (10 mM diluido en DMSO) y se incubó en oscuridad durante 1h a temperatura ambiente (**Figura 6**).

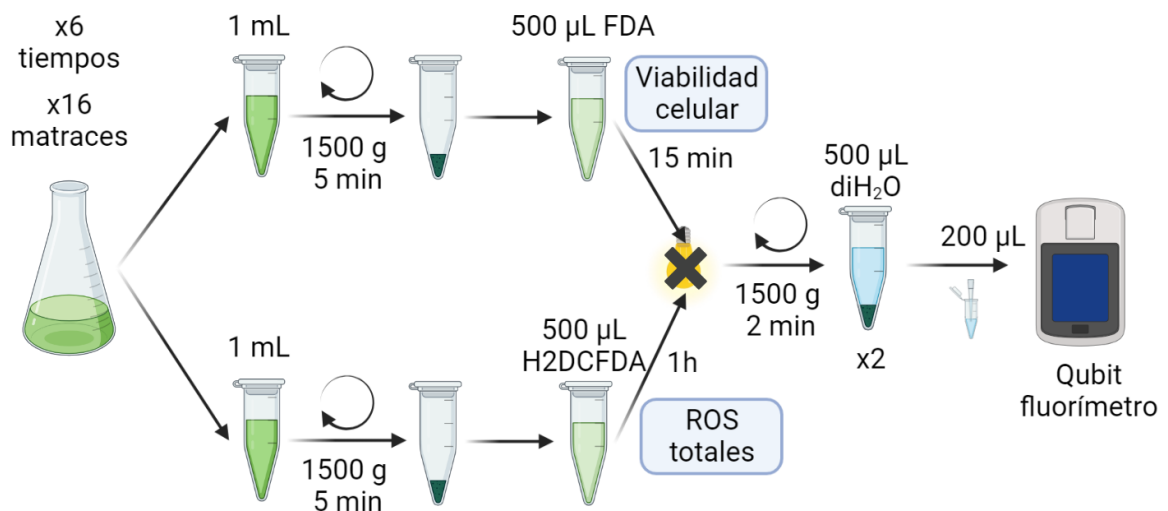


Figura 6. Ensayo de viabilidad celular y ROS total. Elaboración propia mediante Biorender.

Pasado el tiempo de incubación, se hicieron lavados para eliminar el exceso de producto. Para ello, las células se centrifugaron durante 2 min a 1500 g y temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 500 µL de agua desionizada. Se repitió el proceso. De este volumen se tomaron 200 µL y se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación en azul de 485 nm y de emisión en verde de 530 nm con un fluorímetro Qubit 3.0 (Invitrogen). Los resultados de viabilidad celular obtenidos se representaron en unidades relativas de fluorescencia (RFU) y para el ROS total se normalizaron frente a los resultados de viabilidad celular.

2.5 Engrosamiento de la matriz extracelular

Se realizó la tinción de la matriz extracelular de los distintos cultivos a cada tiempo muestreado con el objetivo de observar las posibles diferencias inducidas entre tratamientos por el BPA. Para ello se centrifugó 1 mL de cultivo a 1500 g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de formaldehído al 1%. Tras incubar por la noche a 4 °C, se volvieron a centrifugar las células a 1500 g durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 µL de *Alcian Blue* (Crayton 1982). Se incubaron 10 min a temperatura ambiente antes de ser observadas al microscopio (Nikon Diaphot 200 Phase Contrast).

2.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para la extracción de ARN, se centrifugaron 50 mL de cada cultivo durante 5 min a 1900 g a los tiempos de 0 h, 15 min, 24 h y 72 h, se descartó el sobrenadante y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta realizar la extracción del ARN.

La extracción de ARN se realizó según el protocolo descrito por Valledor *et al.* (2014). Para ello, se homogeneizaron mecánicamente 50 mg de las células en 600 µL de metanol, cloroformo y agua (2,5:1:0,5). Se centrifugaron a 20000 g a 4 °C durante 6 min y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL de 2-Mercaptoetanol (0,75%) al pellet obtenido tras romper las células y se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resolubilizó

en 600 μ L de tampón de solubilización del pellet (PSB) (7 M guanidina-HCl, TWEEN 20 2%, NP-40 4%, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2-Mercaptoetanol 1%). Se añadieron 300 μ L de acetonitrilo y se purificaron los ácidos nucleicos empleando una columna de sílice EURx GeneMatrix. Una vez eluidos los ácidos nucleicos en 50 μ L de agua ultrapura libre de ARNasas, se cuantificó el ARN total (Nabi UV/vis MicroDigital Co., Korea) y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. Se tomó el volumen correspondiente a 500 ng de ARN y se trataron con ADNasa (ThermoFisher Scientific) para eliminar el ADN siguiendo las especificaciones del fabricante.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con retrotranscriptasa reversa (RevertAid, ThermoFisher Scientific) con RiboLock (ThermoFisher Scientific) para preservar la integridad del ARN, siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.7 Puesta a punto de cebadores

Con el objetivo de cuantificar la expresión de los principales genes de interés en los procesos de homeostasis redox y ferroptosis se diseñaron los siguientes cebadores (**Tabla 1**).

Tabla 1. Cebadores diseñados y utilizados.

Gen	Identificador	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tm teórica (°C)	Tamaño (pb)
<i>Receptor de la proteína quinasa C activada (RACK1)</i>	Cre06.g278222	CTTCTCGCCCATGACCAC CCCACCAGGTTGTTCTTCAG	58	105
<i>Beta tubulina 2 (BTUB)</i>	Cre12.g549550	CCCCCGCCTGCACTTCTT GTCGGCGGCGCACATCAT	60	133
<i>Actina (IDA5)</i>	Cre13.g603700	GCGGCTACTCGTTCACCACCAC TCTCCTGCTCGAAGTCCAGGGC	60	93
<i>Ligasa de proteína ubiquitina (UBI)</i>	Cre03.g159200	CTACCGCCGTTCTGTTCTCTGC CTGGCGGCAGTAGCACCACATC	59,9	160
<i>Enzima málica</i>	Cre01.g022500	GAGTGCTCCTTTGAGCAGGC CTGTTGTTGTTGGTGGTGCTG	61,3 60,5	162
<i>Glutión-S-transferasa (GST)</i>	Cre12.g538100	TACGTGGTCTATTTCAAGAC TGAAGTAGTGCGTCTTGAT	59,6 60,6	135
<i>Glutión peroxidasa (GPX)</i>	Cre10.g458450	GTTACGTTCCCCATTATG AAAGTTCATTTAATCATCTC	61,1 60,2	117
<i>Dehidroorotato deshidrogenasa (DHODH)</i>	Cre03.g199423	CACTCCACACAAAAGTGTT GTGTGATTGAGCCAACTT	60,4 60,6	135
<i>Homólogo humano de FSP1 (FSP1)</i>	Cre12.g555803	CAAGCTGCAGCGCTGGAAG GATACTTCTGCACGAACAGCC	62,3 59,3	155
<i>Canal de anión dependiente del voltaje 2 (VDAC2)</i>	Cre05.g241950	CGTCACCAAATACAACCTTT GTGGCTGTAGATGAGCTT	60,7 60,2	103
<i>Manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)</i>	Cre16.g676150	GAGATTGTCAGCCAGATC GTTGAAGGTGGTCATGAT	59,6 59,8	138
<i>Pirina</i>	Cre09.g388208	AACAATGAGAAAATGAACTTC ACGATGTAGCTGAAGATCTC	60,6 61	116
<i>Aldo-ceto reductasa tipo 1C (AKR1C)</i>	Cre12.g518900	CATCAAGCTGTTCCACGTA AGTACATCTTGAGCGATGA	60 60,4	143
<i>Lipoxigenasa de linoleato 9S (LOX)</i>	Cre12.g512300	GACGTGATTATGAATGGAG GTCAATCACCACGATCTC	60,2 60,1	123
<i>Sintetasa de acil-CoA de cadena larga (ACSL)</i>	Cre12.g507400	GGCTACTACAAGGACGAG CCAGCTTGAAGATGTTCT	60,3 60,2	136

Se diseñaron los cebadores para que su temperatura de fusión (Tm) fuese de aproximadamente 60 °C. Para probar su temperatura de alineamiento se realizó una PCR en gradiente de temperatura (65-55 °C) con ADNc de *Chlamydomonas*. Cada reacción de PCR se realizó sobre un volumen final de 10 µL conformados por 1 µL del tampón de la ADN polimerasa DreamTaq (ThermoFisher Scientific), 3 µL de dNTPs (2,5 mM, ThermoFisher Scientific), 0,4 µL de los dos pares de cebadores correspondientes, 0,4 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, ThermoFisher Scientific), 0,1 µL de ADN polimerasa PuTaq (elaboración propia) y 1

μ L de ADNc de Chlamydomonas. El protocolo para la reacción fue 1x[95 °C 5 min], 34x[95 °C 30 s, 55-65 °C 30 s, 72 °C 15 s], 1x[72 °C 5 min]. Para comprobar la amplificación se visualizaron los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

2.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con R 4.2.2 en la versión de Rstudio 2022.07.2. Inicialmente, se filtraron los resultados detectando los “*outliers*” presentes en ellos, como aquellos que difieren más de un 10% de la media, y siendo eliminados. A continuación, se llevó a cabo un test de normalidad Shapiro-Wilk seguido de un test de Levene para determinar la homocedasticidad de los datos. Tras esto, y ante la falta de normalidad y homocedasticidad, se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test post hoc de Duncan agrupando los datos por tiempo. Además, los resultados de crecimiento celular, viabilidad celular y ROS total fueron procesados y visualizados en OriginPro 2023b (64-bit) SR1 10.0.5.157 (Learning Edition).

3 RESULTADOS

3.1 Crecimiento celular y fotosíntesis

Las cepas CC1690 y CC503 crecidas con carbono y tratadas con BPA mostraron un daño significativo respecto a sus controles a partir de las 5 h de crecimiento (**Figuras 7A y 8A**). Esta inhibición del crecimiento se agudizó para ambas a las 24 h y 48 h, produciéndose una fuerte recuperación de los cultivos a las 144 h de crecimiento. Sobre todo, la aclimatación de los cultivos de CC1690 con carbono fue tal que alcanzaron la concentración celular de los controles para el último tiempo medido.

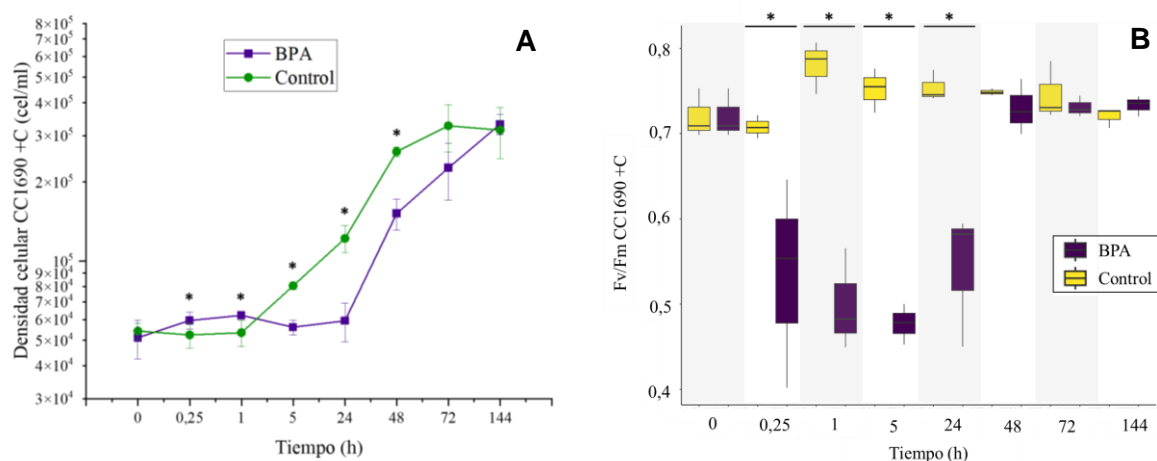


Figura 7. Crecimiento celular (A) y F_v/F_m (B) de CC1690 en medio TAP con carbono. El asterisco indica significancia (p -valor < 0.05).

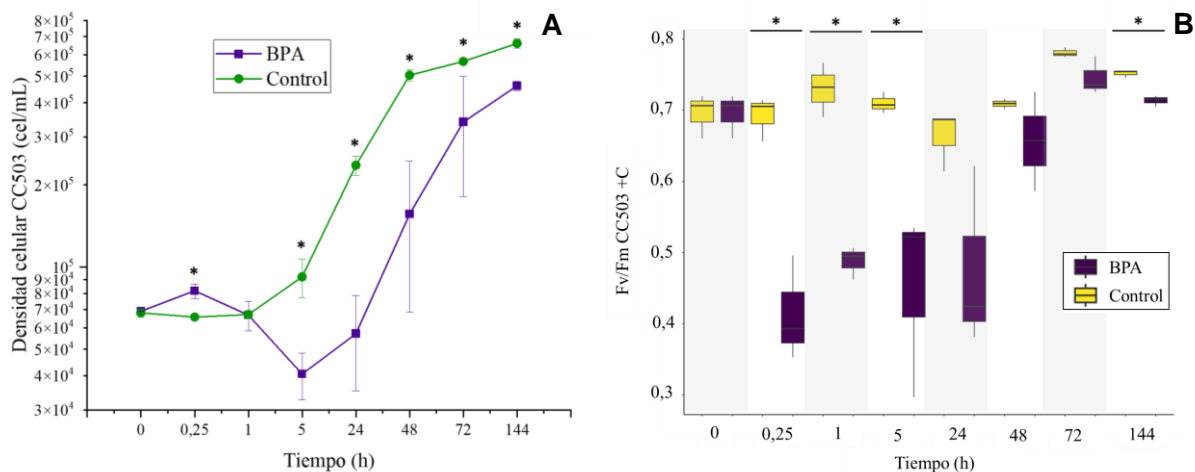


Figura 8. Crecimiento celular (A) y F_v/F_m (B) de CC503 en medio TAP con carbono.

A tiempos cortos (15 min y 1 h) ambas cepas tratadas con BPA mostraron una disminución en la eficiencia fotosintética del fotosistema II (F_v/F_m) (**Figuras 7B y 8B**), que contrasta con un aumento del número de células. A partir de las 48 h ambas experimentaron una recuperación notable en este daño del fotosistema II hasta valores muy similares a los de sus controles respectivamente.

La cepa CC1690 crecida en el medio TAP sin carbono mostró una gran resistencia al choque tóxico producido por el BPA. No se observaron diferencias significativas en su crecimiento respecto a su control (**Figura 9A**). Esto contrasta fuertemente con su homóloga con carbono, no presentando diferencias entre su control y el tratamiento con BPA en cuanto a su densidad óptica para los tiempos cortos de 24 h y 48 h. Esta diferencia puede apreciarse en las imágenes comparativas que se tomaron de los cultivos a lo largo del ensayo (**Figura 10**). El daño producido en la eficiencia del fotosistema II fue menor que en el caso del cultivo con carbono, únicamente mostrándose significativo para el tiempo corto de 15 min (**Figura 9B**).

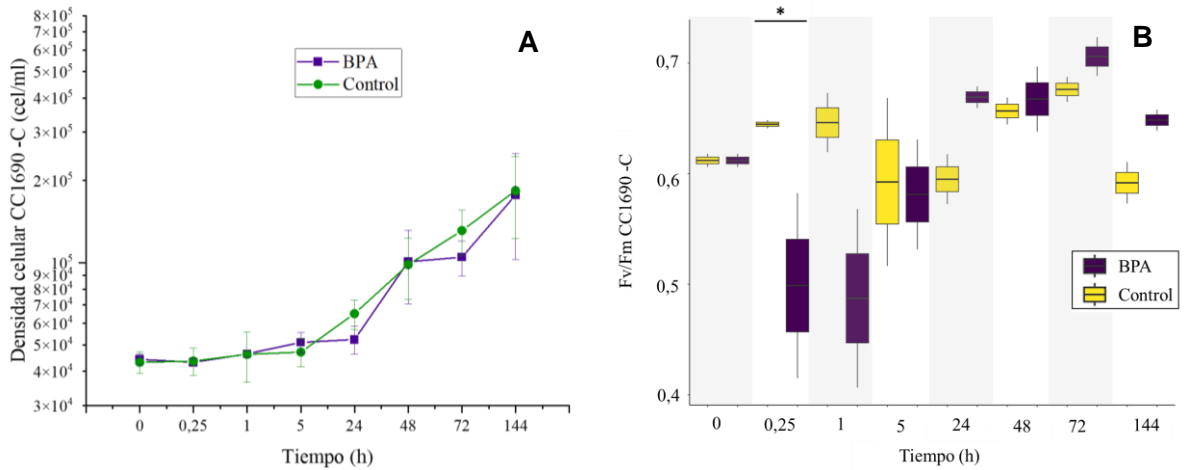


Figura 9. Crecimiento celular (A) y F_v/F_m (B) de CC1690 en medio TAP sin carbono.

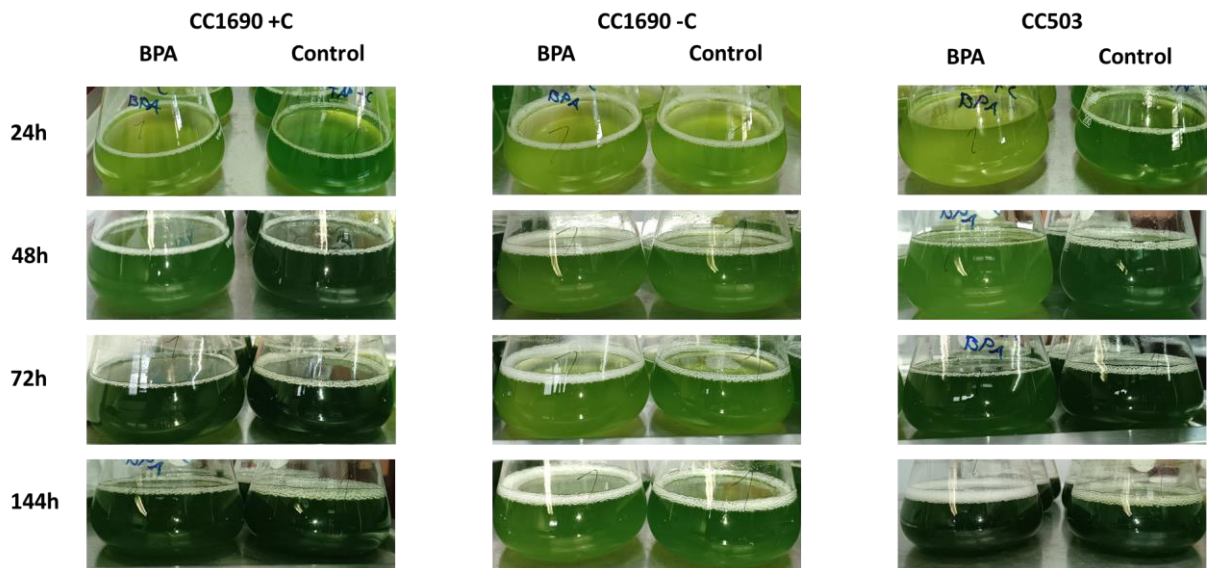


Figura 10. Aspecto de los cultivos a lo largo del tiempo.

3.2 Matriz extracelular

La cepa CC1690 crecida con carbono mostró como los cultivos tratados con BPA desarrollaron una matriz extracelular mayor a partir de las 5 h de crecimiento (**Figura 11**). No se observaron diferencias apreciables a tiempos cortos.

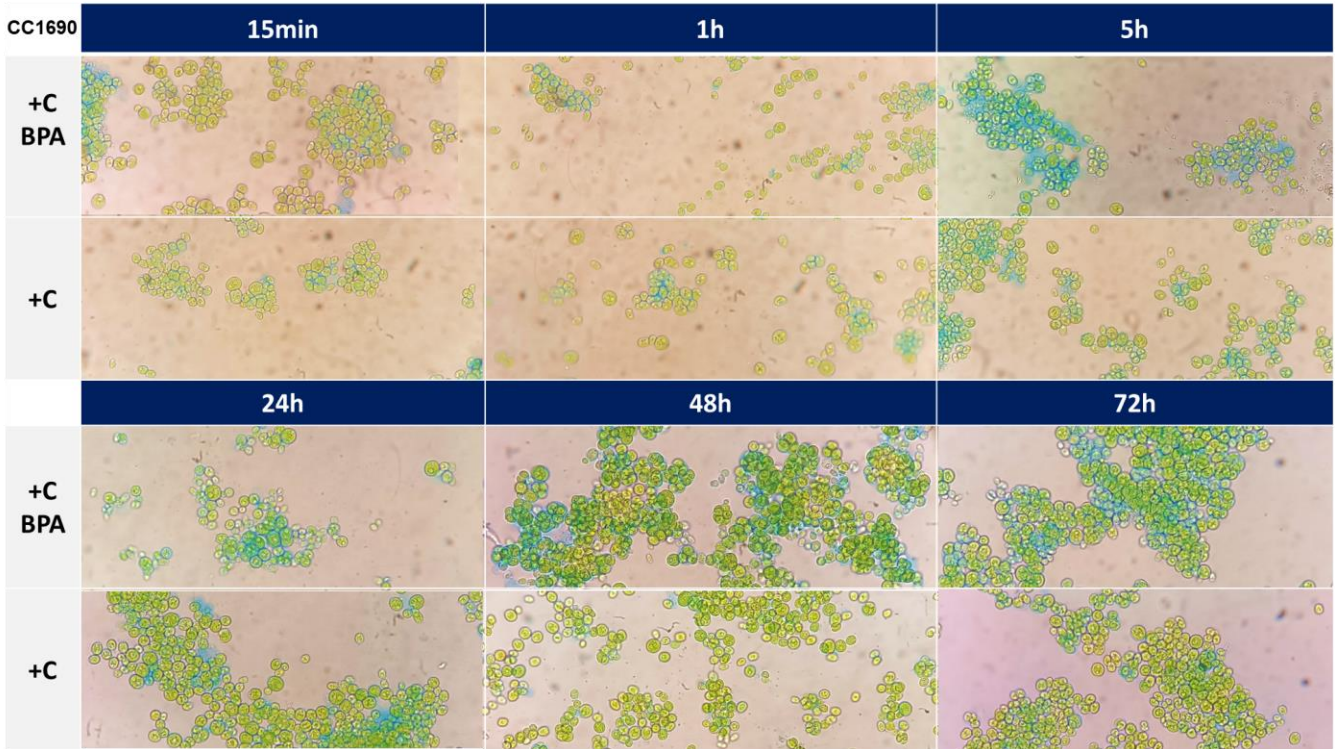


Figura 11. Fotografías de la matriz extracelular teñida con *Alcian Blue* de CC1690 cultivada con carbono tomadas al microscopio con un aumento 40x.

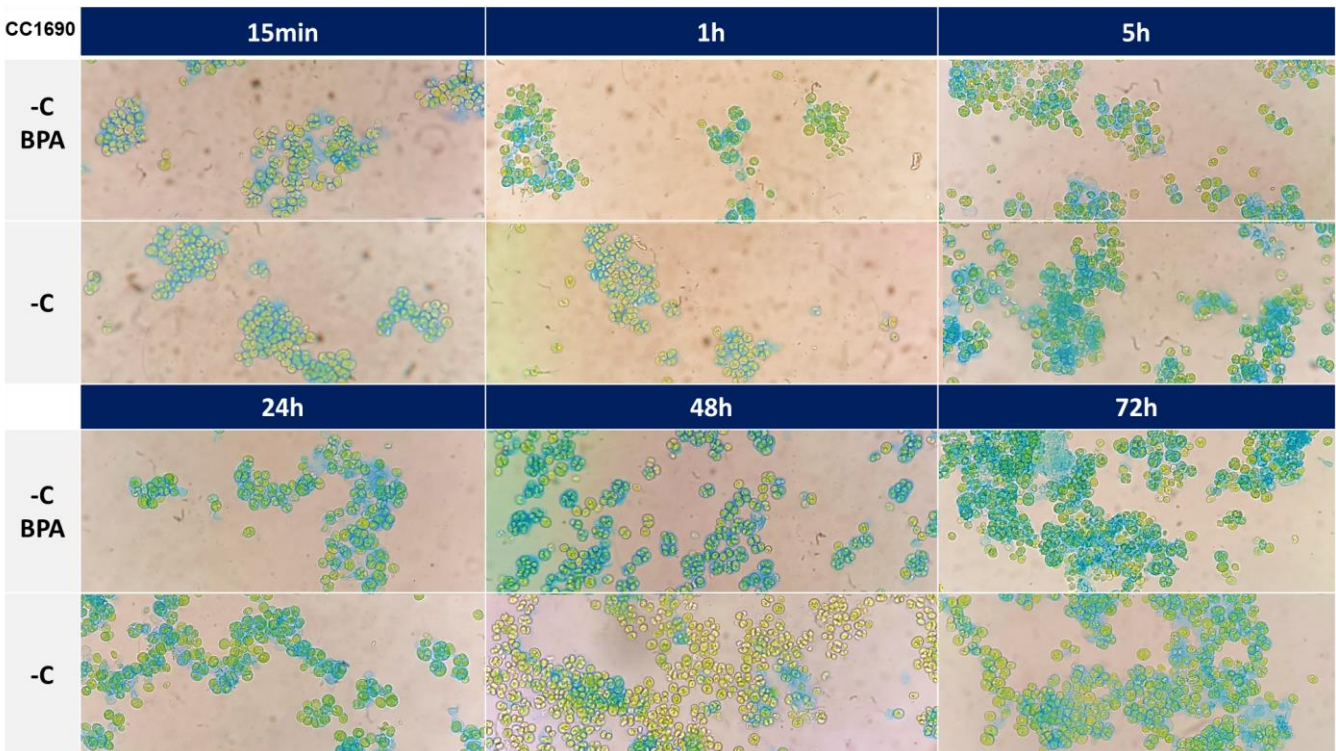


Figura 12. Fotografías de la matriz extracelular teñida con *Alcian Blue* de CC1690 sin carbono tomadas al microscopio con un aumento 40x.

En el caso de los cultivos CC1690 sin carbono, mostraron un engrosamiento de la matriz extracelular considerablemente mayor que en el caso anterior tanto para los controles como para las tratadas con BPA. Dicha matriz extracelular fue engrosándose especialmente a las 48 h y 72 h (**Figura 12**). Además, se puede observar la presencia de exopolisacáridos (EPS) excretados por las células.

Por último, la cepa CC503 cultivada en el medio con carbono no presentó matriz extracelular a los tiempos cortos, ya que esta cepa es un mutante natural deficiente en pared celular. Sin embargo, como se puede apreciar en la **Figura 13**, se observó la excreción de exopolisacáridos producidos por las células a los tiempos de 24 h y 48 h. El daño producido por el BPA se hizo patente principalmente a las 5 h y 24 h, en las que se pudo apreciar una pérdida de clorofilas en las células, la ruptura de las membranas y formas muy irregulares. A las 72 h se produjo una recuperación completa de su estado físico.

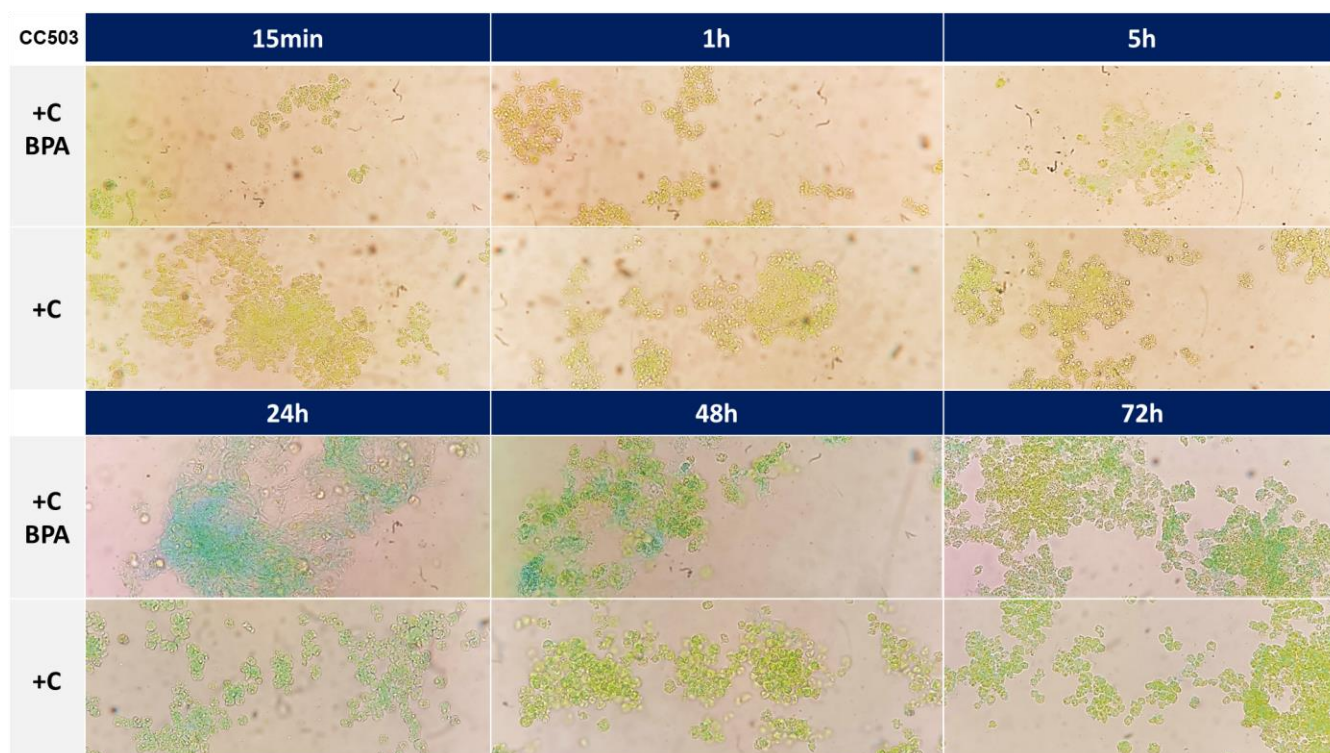


Figura 13. Fotografías de la matriz extracelular teñida con *Alcian Blue* de CC503 cultivada con carbono tomadas al microscopio con un aumento 40x.

3.3 Viabilidad celular y ROS total

Se obtuvo una mayor viabilidad celular en los controles que en los cultivos con BPA (**Figuras 14A, 15A y 16A**). Esta diferencia en la viabilidad celular fue especialmente significativa a las 24 h en los tres casos y más acusada para la cepa CC503.

La cepa CC1690 crecida con carbono y BPA presentó un ratio de especies reactivas del oxígeno máximo a las 5 h de $0,40697 \pm 0,10603$ (**Figura 14B**), coincidiendo con el punto de disminución del crecimiento celular y daño en la eficiencia fotosintética anteriormente vistos (**Figuras 2A y 2B**).

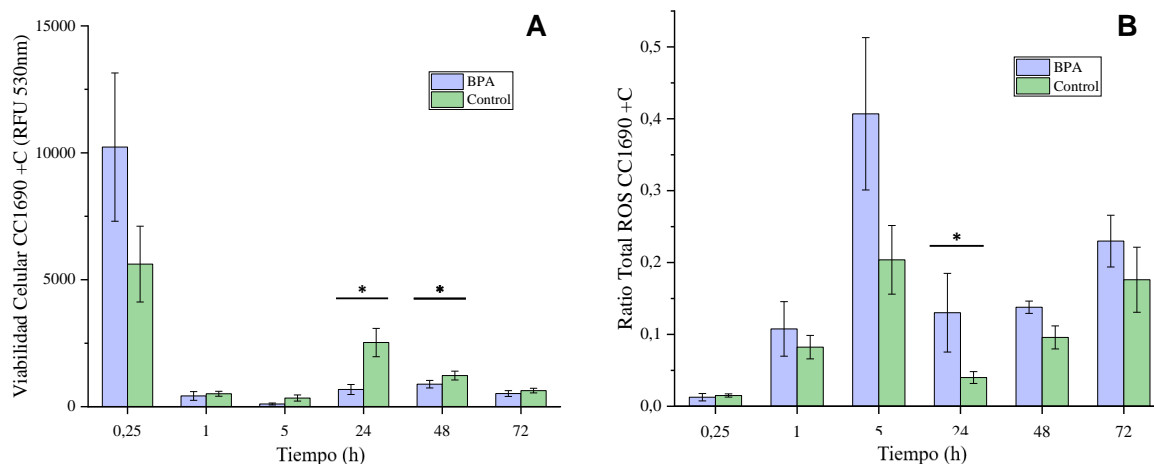


Figura 14. Viabilidad celular (A) y ROS (B) de CC1690 con carbono. El asterisco indica significancia (p-valor <0.05).

La cepa CC1690 cultivada sin carbono y BPA mostró un menor ratio de ROS que el tratamiento anterior (**Figura 15B**). Si bien, sí se pudo observar un aumento de especies reactivas de oxígeno respecto a su control, que fue mayor a las 24 h y 72 h llegando a acumular hasta un 418,34% más de ROS respecto a su control.

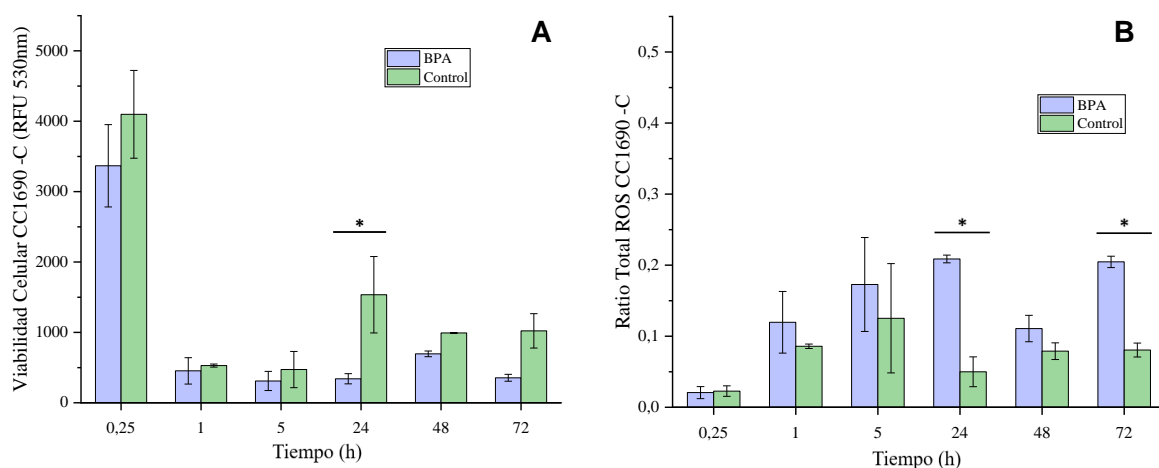


Figura 15. Viabilidad celular (A) y ROS (B) de CC1690 sin carbono. El asterisco indica significancia (p-valor <0.05).

La cepa CC503 tratada con BPA presentó una fuerte disminución en su viabilidad respecto a su control para los tiempos posteriores a las 24 h (**Figura 16A**). Además, presentó una mayor acumulación de ROS respecto a sus controles, coincidente a las 24 h con la fuerte inhibición de la viabilidad celular de los cultivos (**Figura 16B**). Dicho efecto producido por la presencia del BPA en la viabilidad celular a las 24 h estuvo presente en los tres tratamientos.

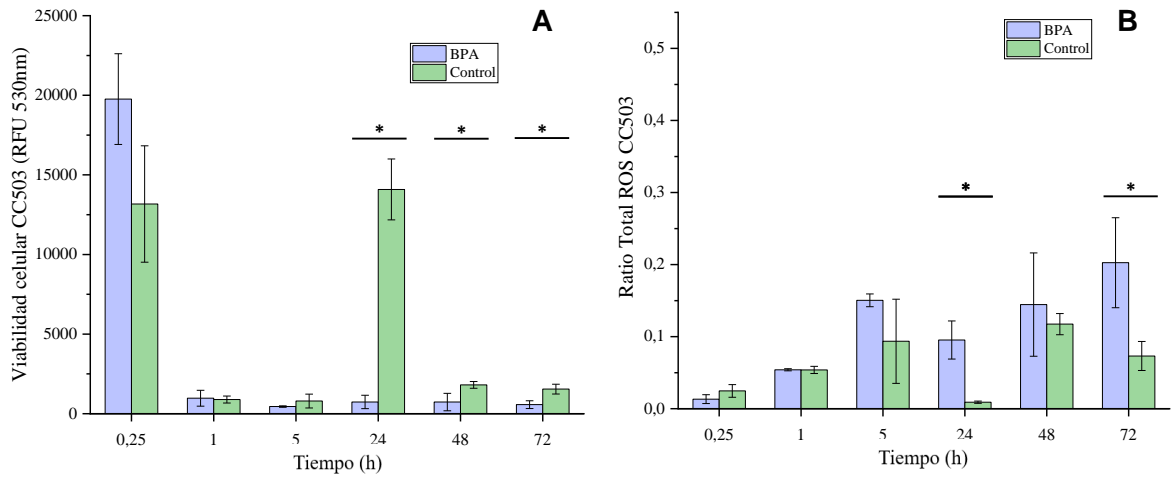


Figura 16. Viabilidad celular (A) y ROS (B) de CC503 con carbono.

3.4 Puesta a punto del análisis de la expresión génica

Se realizó la extracción de ARN de *Chlamydomonas* crecida sin carbono, obteniendo un patrón de bandas claro y definido (**Figura 17**), indicando su buen estado de conservación.

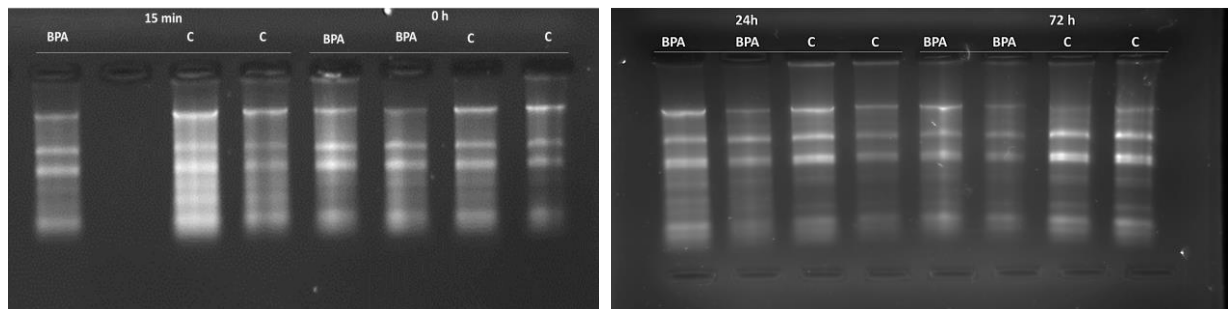


Figura 17. ARN extraído visualizado en gel de agarosa al 1%.

Se llevó a cabo múltiples veces la digestión del ADN mediante la ADNasa. Sin embargo, no fue posible continuar con la síntesis del ADNc todas las muestras (**Anexos 3 y 4**) debido a que muchas de ellas presentaron degradación de las bandas del ARN ribosómico por lo que únicamente se llegó a sintetizar el ADNc de las que no presentaron esta degradación en la posterior visualización en gel de agarosa.

Se realizó una primera PCR con gradiente de temperatura para todos los cebadores en la que se observó la amplificación únicamente de las parejas de cebadores de los genes: *UBI*, *IDA5*, *RACK1* y *BTUB* (**Figura 18**).

Se hizo una segunda PCR con gradiente en la que se obtuvieron bandas de amplificación de la PCR para la pareja de cebadores del gen de expresión constitutiva *IDA5* a las 4 temperaturas probadas, y de los cebadores de los genes *LOX*, *GST* a la temperatura de 55 °C y del cebador del gen *FSP1* para la temperatura de 61,1 °C (**Figura 19**).

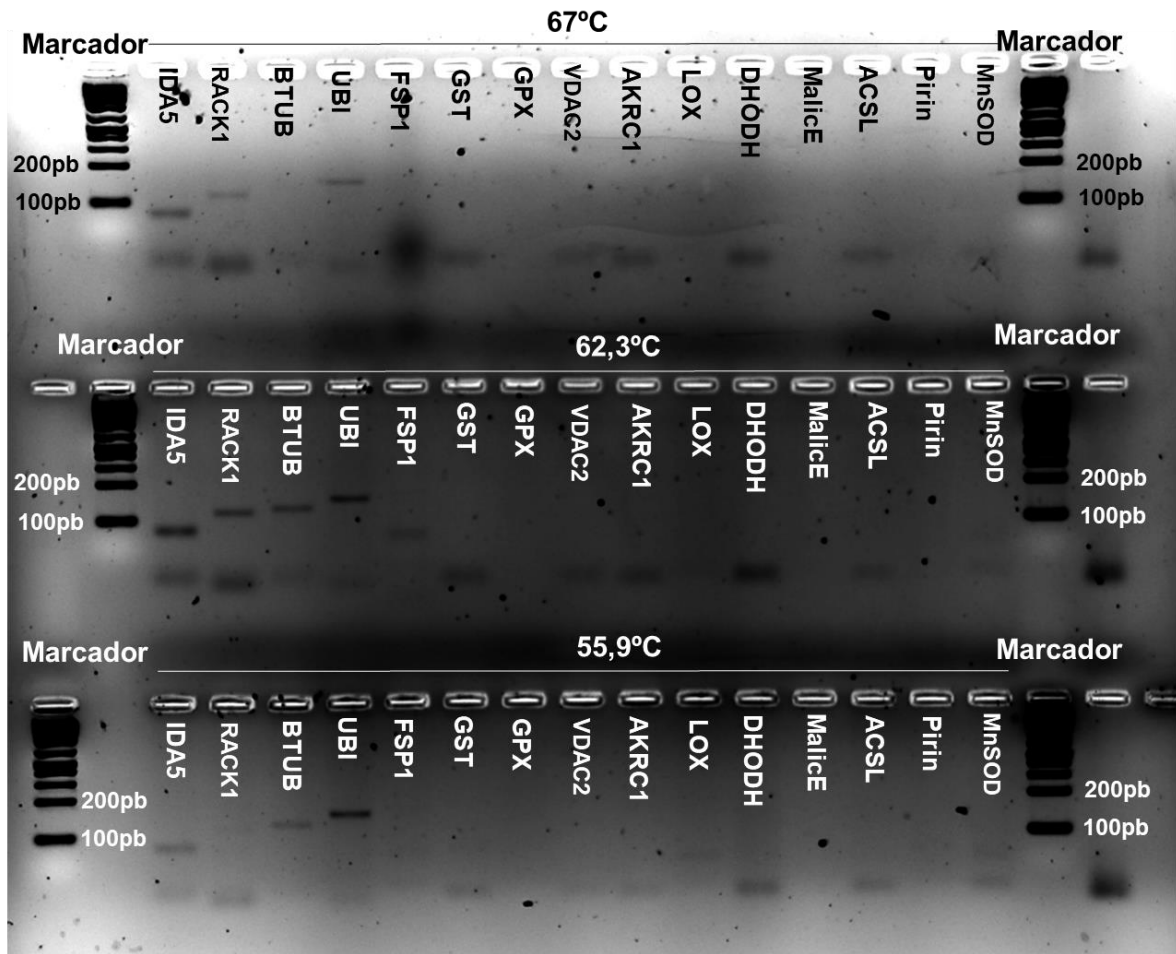


Figura 18. Resultado de la PCR con gradiente de temperatura para todos los cebadores en gel de agarosa al 2%.

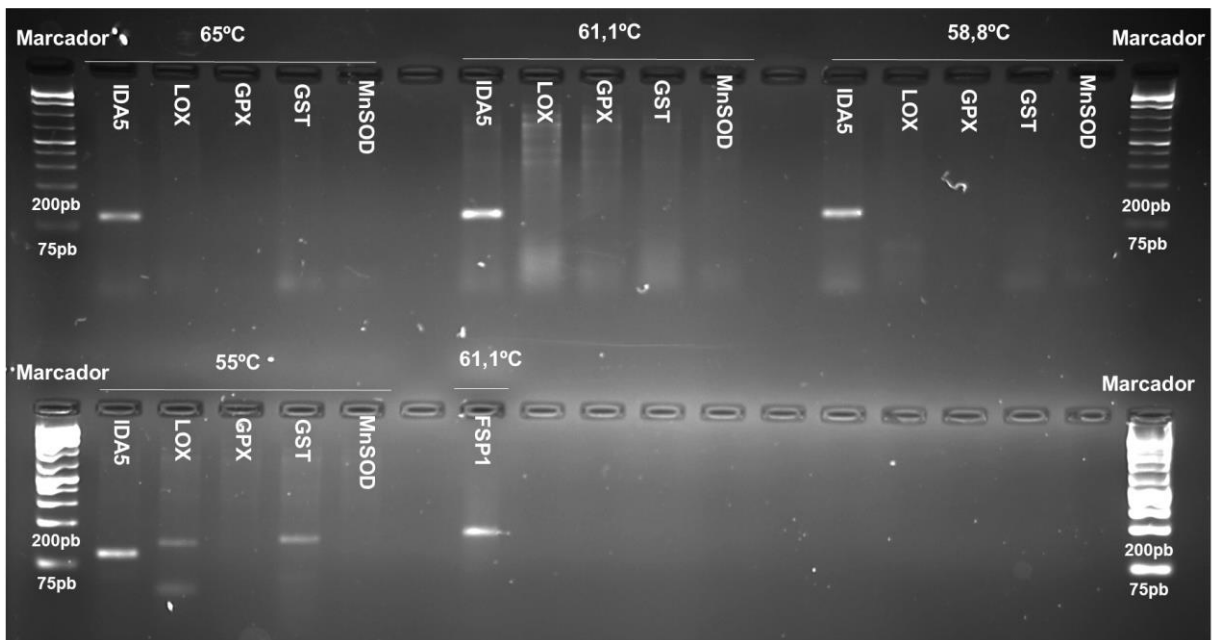


Figura 19. Resultado de la PCR con gradiente de temperatura para 6 parejas de cebadores distintas en gel de agarosa al 2% con ADNc de *Chlamydomonas*.

4 DISCUSIÓN

4.1 Efectos Bisfenol A

Se realizó un seguimiento de la respuesta de dos cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* (CC1690 con pared celular y CC503 deficiente en pared celular) durante la exposición al BPA en diferentes regímenes nutricionales (autotrofia y mixotrofia) desde las 0 hasta las 144 h. Se tomaron datos de densidad celular, F_v/F_m , viabilidad celular, engrosamiento de la matriz extracelular y ROS total permitiendo caracterizar la evolución de los cultivos. A lo largo del proceso se diferenciaron 3 etapas que atravesaron aquellos cultivos con carbono: una inicial a tiempos muy cortos (15 min-1 h), en la que la viabilidad y crecimiento celular no se ven comprometidos, aunque el estrés oxidativo ya está presente reduciendo drásticamente la eficiencia fotosintética; una segunda a tiempos intermedios (5-48 h), en la que el estrés y toxicidad del BPA se manifestaron produciendo una reducción del crecimiento coincidiendo con una mayor acumulación de especies reactivas del oxígeno; y una tercera a los tiempos más largos (72-144 h) en la que se produce una recuperación rápida de los cultivos llegando a igualarse en eficiencia fotosintética y en densidad celular con sus respectivos controles. Otros estudios (Gomes *et al.*, 2019) hallaron una muerte celular de hasta el 100% en organismos eucariotas fotosintéticos acuáticos, como *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Tetraselmis chuii*, para una concentración de entre 10 μM y 15 μM de BPA, considerablemente inferior a la usada en este estudio con *Chlamydomonas* (175 μM).

Ambas cepas de *Chlamydomonas* se aclimataron al BPA, observándose la recuperación a partir de las 48 h de exposición tanto en el crecimiento celular como en la eficiencia del fotosistema II. Estos resultados fueron muy similares a los encontrados por Carbó *et al.* (2023). En dicho trabajo de investigación se observó una rápida recuperación muy similar de la cepa CC1690 a la que se muestra en este estudio, caracterizada por un daño oxidativo y fotosintético máximo a las 5 h de crecimiento, así como menor viabilidad celular. La disminución de F_v/F_m fue más acusada, disminuyendo por debajo de 0,25, la observada en este estudio alcanzó un valor mínimo de 0,434 para uno de los cultivos. La acumulación de ROS total observada en ambos estudios es prácticamente idéntica, alcanzando a las 5 h un pico máximo. Es decir, el daño oxidativo es equivalente en ambos muestreos, pero los parámetros de densidad celular y F_v/F_m no son similares a tiempos cortos de exposición, siendo menos acusado el daño observado en este estudio. Sin embargo, los resultados de densidad celular obtenidos por Carbó *et al.* (2023) durante la prueba de distintas concentraciones de BPA para 40 mg L^{-1} son mucho más similares a los presentes en este estudio. Estas diferencias entre ensayos llevados a cabo en las mismas condiciones pueden deberse a múltiples factores.

Por otra parte, en ese mismo estudio (Carbó *et al.* 2023) la cepa CC503 deficiente en pared celular muestra mayor resistencia al BPA que la cepa con pared celular CC1690. Esta diferencia podría explicarse porque al carecer de pared celular, la capacidad del BPA para entrar en la célula es menor. En contraposición, los resultados de este estudio mostraron una reducción en el crecimiento celular y F_v/F_m de la cepa CC503 equiparables a las de CC1690. Cabe resaltar que se observó el engrosamiento de la matriz extracelular en todas las cepas expuestas al BPA ante todos los regímenes nutricionales. A pesar de ello, el aumento de matriz extracelular fue mayor en CC1690, especialmente bajo deficiencia de carbono. Por ello,

cabe proponer que el engrosamiento de la matriz extracelular es un mecanismo de defensa de la célula ante este compuesto.

El resultado más sorprendente fue que la cepa CC1690 crecida sin carbono y expuesta al BPA no viese comprometido su crecimiento celular con respecto a su control. A pesar de ello, sí experimentó una disminución en su viabilidad celular, una mayor acumulación de especies reactivas del oxígeno y una disminución en la eficiencia fotosintética para los tiempos más cortos de 15 min y 1 h, produciéndose una rápida recuperación de dicho parámetro fisiológico a las 5 h de crecimiento. Mientras que durante este tratamiento se observó una aclimatación a través del engrosamiento de la matriz extracelular al shock tóxico ya presente a tiempo 0 h en los controles crecidos sin carbono de CC1690, las dos cepas cultivadas con carbono no presentaron dicha aclimatación en sus respectivos controles pero fue inducida a lo largo del proceso como respuesta a la toxicidad del BPA, observándose en ambas una mayor producción de esta matriz extracelular a partir de las 24 h. En concreto la cepa CC503 fue la que presentó un mayor daño celular a este tiempo, coincidiendo con una mayor diferencia en la excreción de exopolisacáridos en comparación con otros tiempos de muestreo.

Las dos cepas crecidas en presencia de una fuente de carbono presentaron una estimulación en su crecimiento a los tiempos de 15 min para CC503, y 15 min y 1 h para CC1690 de exposición al BPA, lo cual coincide con un aumento en su viabilidad celular a este mismo tiempo. Este incremento en su crecimiento y viabilidad celular frente a sus respectivos controles para tiempos de exposición bajos a un compuesto tóxico es conocida como hormesis y puede estar directamente ligada a una estrategia de supervivencia frente al estrés induciendo una división celular acelerada. Este efecto de hormesis ya ha sido caracterizado con anterioridad en *Chlamydomonas reinhardtii* para bajas concentraciones de algunos compuestos xenobióticos como la cefradina (Cao *et al.*, 2018), nanopartículas de óxido de bismuto (Huang *et al.*, 2022) o, en el caso de otra alga verde unicelular como *Chlorella pyrenoidosa*, Duan *et al.* (2019) hallaron una ligera estimulación en su crecimiento para concentraciones de BPA inferiores a 0,1 mg L⁻¹. En este estudio se caracteriza por primera vez una respuesta de hormesis en *Chlamydomonas reinhardtii* a tiempos cortos para una concentración elevada de BPA (40 mg L⁻¹). Comprender los mecanismos biológicos que median esta respuesta podría ser una herramienta de cara a desarrollar nuevas estrategias de biorremediación a través de este organismo. Por otra parte, CC1690 sin carbono no presentó esta promoción en su crecimiento inicial puesto que posiblemente ya se encuentra aclimatada a una situación de estrés.

Considerando que *Chlamydomonas* es capaz de crecer en un medio en el que el BPA es su única fuente de carbono sin inhibir su crecimiento frente al consecuente estrés oxidativo, es posible que la aclimatación se deba a un aumento en la actividad de la subfamilia 1 de las *sucrose non-fermenting related kinases* (*SnRK1*). Las *SnRK1* se activan ante la falta de carbono en el medio de cultivo en *Chlamydomonas* (Halford y Hey, 2009). La activación de las *SnRK1* está directamente ligada a la resistencia al estrés oxidativo, confiriendo una aclimatación previa a la presencia del BPA. Una vez se introduce el BPA en los cultivos, estos ya habrían adquirido mecanismos moleculares para reducir la acumulación y el daño por ROS. Esto, de hecho, se observó con una acumulación de ROS total inferior a las 5 h de exposición de CC1690 sin carbono respecto a CC1690 con carbono. La capacidad de la cepa crecida sin carbono de responder favorablemente al estrés oxidativo y de reducir su acumulación frenaría la inducción de la muerte celular por ferroptosis característica de este proceso (**Figura 3**).

Teniendo en cuenta estas características, la cepa CC1690 crecida en condiciones autotróficas son las condiciones que proponemos para continuar con el estudio y desarrollo de programas de biorremediación para el BPA. Para ello, es necesario conocer a fondo los mecanismos celulares clave en el proceso de detoxificación y aclimatación de *Chlamydomonas* a este xenobiótico, pudiendo permitir en un futuro desarrollar herramientas de ingeniería genética con el fin de lograr la mayor eficiencia posible.

4.2 Puesta a punto del análisis de expresión génica

Se logró extraer y purificar el ARN de varios de los cultivos y sintetizar su ADNc. Además, se logró determinar la temperatura de alineamiento adecuada de algunos de los cebadores diseñados para el análisis genético de *Chlamydomonas*, siendo 55 °C la temperatura en la que se obtuvieron más amplicones. Es posible que en muchos casos no se haya obtenido amplificación para la pareja de cebadores porque los genes en cuestión no se encuentran expresados en el ADNc utilizado. Para solventar esto, sería necesario obtener el ADNc de un cultivo expuesto al BPA, para asegurar la expresión y amplificación de una mayor cantidad de genes. Con los resultados obtenidos, en un futuro se realizará qPCR para determinar la expresión de los genes más relevantes en los procesos de homeostasis redox y ferroptosis como *FSP1*, *GST* o *LOX*.

5 CONCLUSIONES

- La exposición a bisfenol A en *Chlamydomonas reinhardtii* induce una respuesta diferente según su régimen nutricional.
- La presencia de pared celular es clave en la respuesta a bisfenol A. Su presencia permite el engrosamiento de la matriz extracelular, posiblemente influyendo en la entrada de este compuesto en la célula.
- Por primera vez, se observa la respuesta de hormesis en *Chlamydomonas* en respuesta a tiempos de exposición cortos a BPA.
- La cepa CC1690 en condiciones autotróficas presenta una recuperación más rápida ante la exposición a BPA. Por ello, sugerimos continuar con estas condiciones en estudios moleculares con el fin de lograr una mayor eficiencia en la biorremediación del BPA.
- Se optimizó la extracción y purificación del ARN de *Chlamydomonas* y se logró sintetizar el ADNc de las muestras. Se pusieron a punto las condiciones de amplificación para los genes de interés para realizar qPCR sobre las muestras de CC1690 cultivada sin carbono sometida al BPA y sus respectivos controles.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, A., y Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*. 35(2), 201–210. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0034>
2. Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Leboulanger, C., Ben Ouada, H., y Sayadi, S. (2018). Effect of Bisphenol A on the extremophilic microalgal strain *Picocystis* sp. (Chlorophyta) and its high BPA removal ability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158(April), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.008>
3. Cao, J., Jiang, R., Wang, J., Sun, J., Feng, Q., Zhao, Z.-L., Chen, G.-D., Zhou, C., y Yin, E. (2018). Study on the interaction mechanism between cefradine and *Chlamydomonas reinhardtii* in water solutions under dark condition. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 159, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.068>
4. Carbó, M., Chaturvedi, P., Álvarez, A., Pineda-Cevallos, D., Ghatak, A., Rodríguez González, P., Cañal, M. J., Weckwerth, W., y Valledor, L. (2022). Ferroptosis is the Key Cellular Process Mediating Bisphenol a Responses in *Chlamydomonas* and a Promising Target for Enhancing Microalgae-Based Bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 448(January). <https://doi.org/10.2139/ssrn.4287865>
5. Colina, F., Barros, L., Doménech, T., Pinto, G., Amadeu M.V.M. Soares, María Jesús Cañal, y Valledor, L. (2019). Genome-wide identification and characterization of CKIN/SnRK gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35625-8>
6. Duan, L., Chen, Q., y Duan, S. (2019). Transcriptional Analysis of *Chlorella pyrenoidosa* Exposed to Bisphenol A. *Internal Journal of Environmental Research and Public Health*. 16(8), 1374–1374. <https://doi.org/10.3390/ijerph16081374>
7. Ďurovcová, I., Stanislav Kyzek, Fabová, J., Makuková, J., Eliška Gálová, y Sevcovicova, A. (2022). Genotoxic potential of bisphenol A: A review. *Environmental Pollution* 306, 119346–119346. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119346>
8. Esperanza, M., Seoane, M., Servia, M. J., y Cid, Á. (2020). Effects of Bisphenol A on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197(January). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110609>
9. Gomes, V., Carvalho, D., Solange, A., Dias-da-Silva, M. R., Alfa, A., y Telles, S. (2019). Analyzing the toxicity of bisphenol-A to microalgae for ecotoxicological applications. *Environmental Monitoring and Assessment*. 192(1). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7984-0>
10. Gorman, D. S. y Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. 54(6), 1665–1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>
11. Halford, N., y Hey, S., (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*. 419(2), 247–259. <https://doi.org/10.1042/bj20082408>

12. Harris, E. H. (1989): The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, 780pp.
13. Harris, E. (2001). CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM. 52(1), 363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
14. Hasan, R., Zhang, B., Wang, L., Shahbazi, A., y Zhang, B. (2014). Bioremediation of Swine Wastewater and Biofuel Potential by using *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Chlamydomonas debaryana*. <https://doi.org/10.13140/2.1.3348.4168>
15. Hernández J., Cano H. y Puello E. (2022). Emission of Bisphenol A and Four New Analogs from Industrial Wastewater Treatment Plants in the Production Processes of Polypropylene and Polyethylene Terephthalate in South America. *Sustainability*. 14(17). <https://doi.org/10.3390/su141710919>
16. Huang, Y., Lai, J., Huang, Y., Luo, X., Yang, X., Liu, Z., Duan, Y., y Li, C. (2022). Response mechanism of Chlamydomonas reinhardtii to nanoscale bismuth oxyiodide (nano-BiOI): Integrating analysis of mineral nutrient metabolism and metabolomics. *Journal of Environmental Sciences*. 121, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.09.008>
17. Ji, M. K., Kabra, A. N., Choi, J., Hwang, J. H., Kim, J. R., Abou-Shanab, R. A. I., Oh, Y. K., y Jeon, B. H. (2014). Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 73, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.070>
18. Kang, J. H., Kondo, F., y Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226(2–3), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.009>
19. Karalija, E., Carbó, M., Coppi, A., Colzi, I., Dainelli, M., Gašparović, M., Grebenc, T., Gonnelli, C., Papadakis, V., Pilić, S., Šibanc, N., Valledor, L., Poma, A., y Martinelli, F. (2022). Interplay of plastic pollution with algae and plants: hidden danger or a blessing? *Journal of Hazardous Materials*, 438(April). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129450>
20. Kassambara A. (2023). _rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests_. R package version 0.7.2. <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>
21. Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8), 724–725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
22. Lee, H.B., Peart, T.E. (2000). Determination of bisphenol A in sewage effluent and sudge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 83, 290–297 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10772166/>
23. Li, R., Chen, G. Z., Tam, N. F. Y., Luan, T. G., Shin, P. K. S., Cheung, S. G., y Liu, Y. (2009). Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.012>
24. Margarida A., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K. V., y Knut Erik Tollefsen. (2017). Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides. *Aquatic Toxicology*. 189, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.014>

25. Nakajima, N., Teramoto, T., Kasai, F., Sano, T., Masanori Tamaoki, Aono, M., Kubo, A., Kamada, H., Yoshitaka Azumi, y Hikaru Saji. (2007). Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. *Chemosphere*. 69(6), 934–941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.088>
26. Nazos, T. T., Kokarakis, E. J., y Ghanotakis, D. F. (2016). Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis. *Photosynthesis Research*. 131(1), 31–40. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0294-2>
27. OriginPro, Version 2023b. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.
28. PLS: Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. (2023, April 19). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. <https://www.efsa.europa.eu/es/node/17275>
29. R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
30. Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132–155. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2013.08.008>
31. RStudio Team (2022). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
32. Sánchez, J., Baldiris, I., Torres, M. y Bohorquez, C. (2019). Bioremediation of Phenolic Waters using the Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Oriental Journal Of Chemistry*. 35.1274-1278. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/350404>
33. *Scientific Image and Illustration Software | BioRender*. (2023). Biorender.com. <https://www.biorender.com/>
34. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., y Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
35. Staples, C. A., Nelly, Clark, K., Mihaich, E., Woelz, J., y Hentges, S. G. (2018). Distributions of concentrations of bisphenol A in North American and European surface waters and sediments determined from 19 years of monitoring data. *Chemosphere*. 201, 448–458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.175>
36. Tripathi, A. D., Mishra, R., Maurya, K. K., Singh, R. B. y Wilson, D. W. (2018). Estimates for world population and global food availability for global health. *The Role of Functional Food Security in Global Health*, 3-24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00001-3>
37. Valledor, L., Mónica Escandón, Mónica Meijón, Nukarinen, E., María Jesús Cañal, y Weckwerth, W. (2014). A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms. *The Plant Journal*. 79(1), 173–180. <https://doi.org/10.1111/tpj.12546>

38. Wakao, S., y Niyogi, K. (2021). Chlamydomonas as a model for reactive oxygen species signaling and thiol redox regulation in the green lineage. *Plant Physiology*. 187(2), 687–698. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab355>
39. Wickham. H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016. <https://ggplot2.tidyverse.org>
40. Xiao, C., Wang, L. V., Hu, D., Zhou, Q., y Huang, X. (2019). Effects of exogenous bisphenol A on the function of mitochondria in root cells of soybean (*Glycine max* L.) seedlings. *Chemosphere* 222, 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.195>
41. Zhan, J., Rong Junfeng, y Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *Internal Journal of Hydrogen Energy*. 42(12), 8505–8517. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.021>

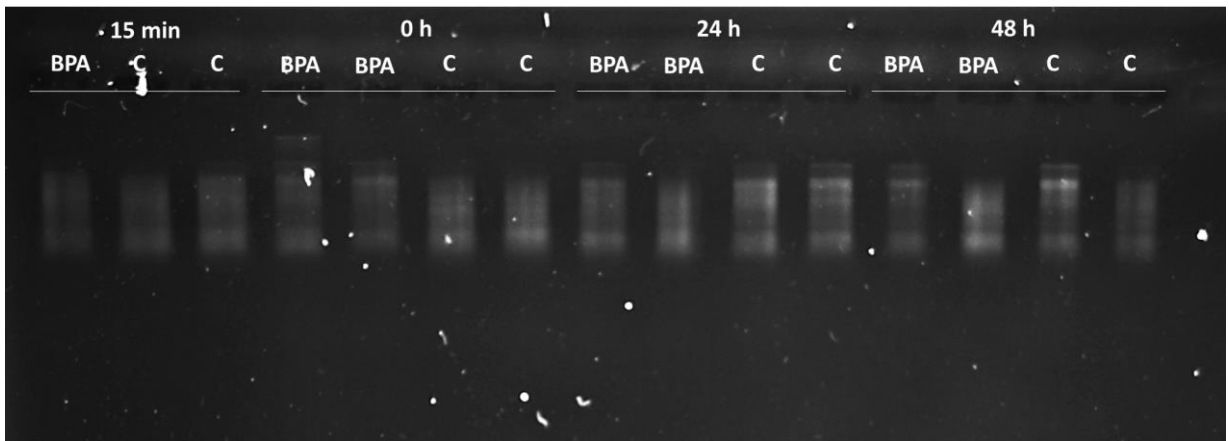
7. ANEXOS



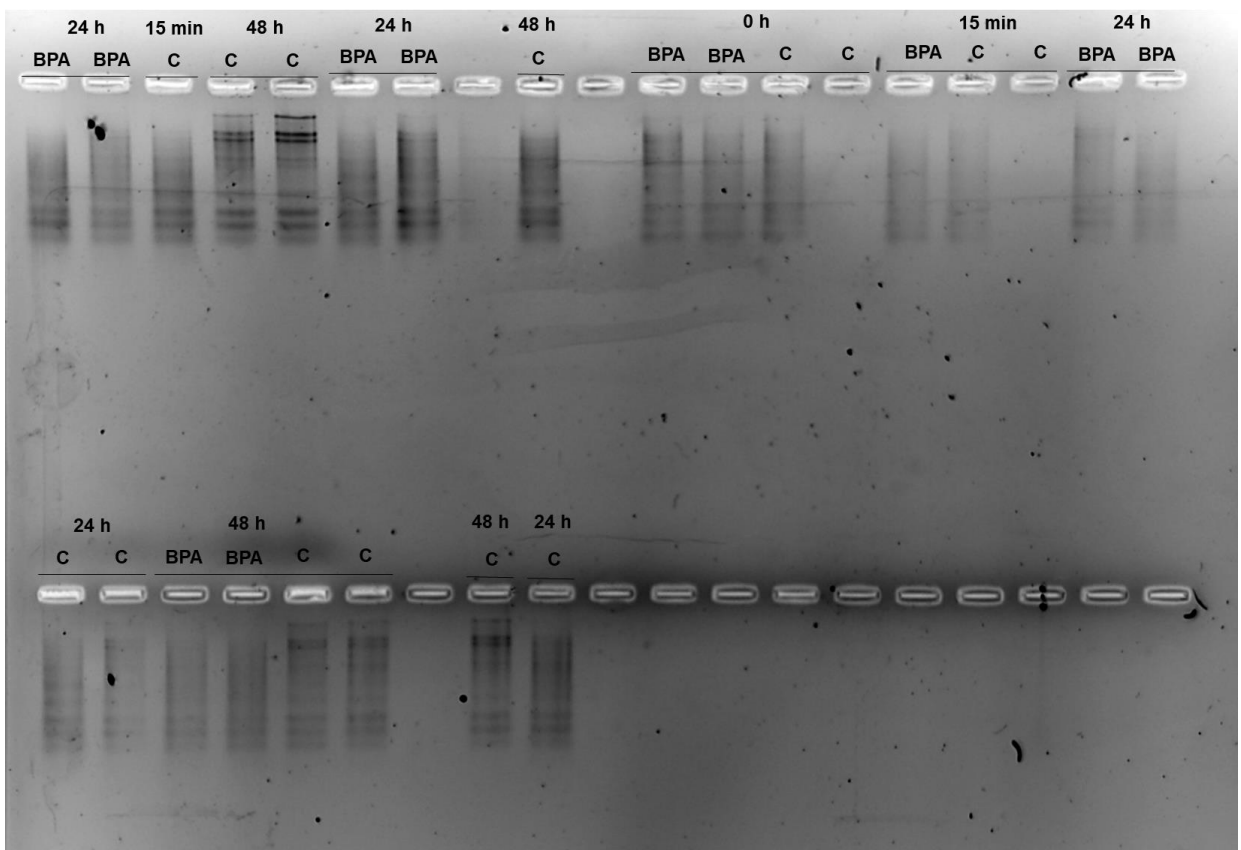
Anexo 1. Incubadora utilizada para mantener las condiciones de crecimiento constantes



Anexo 2. Matrices del ensayo creciendo en la incubadora en condiciones homogéneas y constantes.



Anexo 3. Muestras en gel de agarosa al 1% posterior al tratamiento con ADNasa.



Anexo 4. Muestras en gel de agarosa al 2% posterior al tratamiento con ADNasa.