



Facultad de Biología

Facultá de Bioloxía
Faculty of Biology

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

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

TRABAJO FIN DE MÁSTER

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA DE MICROALGAS Y HEPÁTICAS A BISFENOL A.



Nicolás Antonio Rivas Mac Kay

Tutorizado por Luis Valledor González y Mónica Meijón Vidal

Julio 2025

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

TRABAJO FIN DE MÁSTER

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA DE MICROALGAS Y
HEPÁTICAS A BISFENOL A.

EVALUATION OF THE ADAPTIVE RESPONSE OF MICROALGAE
AND LIVERWORTS TO BISPHENOL A.

Nicolás Antonio Rivas Mac Kay

TUTORES

Luis Valledor González



Mónica Meijón Vidal



RESUMEN

El bisfenol A (BPA) es un contaminante xenobiótico derivado de plásticos con efectos adversos sobre la salud y los ecosistemas resgitrados. Esta investigación evaluó las respuestas adaptativas de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y la hepática *Marchantia polymorpha* al BPA, integrando análisis fisiológicos y moleculares para descifrar sus mecanismos de tolerancia. En *C. reinhardtii*, el BPA provocó una citotoxicidad inicial, manifestada en un crecimiento retardado y una afectación variable de la eficiencia fotosintética entre las distintas cepas. No obstante, los cultivos mostraron una recuperación tras 120 horas, indentificando como respuesta clave el engrosamiento de la matriz extracelular a modo de barrera protectora. A nivel molecular, la exposición al contaminante alteró la expresión de genes asociados al estrés oxidativo y la supervivencia (*GST*, *DHODH*, *VDAC2*), revelando complejas estrategias de detoxificación dependientes de la cepa. En contraste, *M. polymorpha* mostró una inhibición del crecimiento dosis-dependiente, pero mantuvo una alta y estable eficiencia fotosintética, lo que sugiere la posesión mecanismos de defensa eficientes que le permiten adaptarse al estrés químico sin comprometer su aparato fotosintético. El estudio concluye que la respuesta al BPA no es universal, sino específica de cada especie y cepa, demostrando la existencia de distintas estrategias evolutivas de adaptación.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a xenobiotic contaminant derived from plastics with documented adverse effects on health and ecosystems. This research evaluated the adaptive responses of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the liverwort *Marchantia polymorpha* to BPA by integrating physiological and molecular analyses to elucidate their tolerance mechanisms. In *C. reinhardtii*, BPA induced initial cytotoxicity, manifested as retarded growth and a variable impact on photosynthetic efficiency among the different strains. However, the cultures showed recovery after 120 hours, with the thickening of the extracellular matrix identified as a key response, acting as a protective barrier. At the molecular level, exposure to the contaminant altered the expression of genes associated with oxidative stress and survival (*GST*, *DHODH*, *VDAC2*), revealing complex, strain-dependent detoxification strategies. In contrast, *M. polymorpha* exhibited dose-dependent growth inhibition but maintained high and stable photosynthetic efficiency, suggesting the possession of efficient defense mechanisms that allow it to adapt to chemical stress without compromising its photosynthetic apparatus. The study concludes that the response to BPA is not universal but is species- and strain-specific, demonstrating the existence of distinct evolutionary adaptation strategies.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	4
2	OBJETIVOS.....	6
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1	Cepas y cultivo.....	7
3.1.1	C. reinhardtii.....	7
3.1.2	M. polymorpha.....	7
3.2	Diseño experimental.....	7
3.2.1	C. reinhardtii.....	7
3.2.2	M. polymorpha.....	7
3.3	Crecimiento celular y actividad fotosintética.....	8
3.3.1	C. reinhardtii.....	8
3.3.2	M. polymorpha.....	8
3.4	Engrosamiento de la matriz extracelular en C. reinhardtii.....	9
3.5	Extracción de ARN y síntesis de ADNc de C. Reinhardt	9
3.6	Análisis de expresión de genes en C. reinhardtii mediante RT-qPCR.....	10
3.7	Análisis estadístico.....	11
4	RESULTADOS.....	12
4.1	Crecimiento celular y actividad fotosintética.....	12
4.1.1	C. reinhardtii.....	12
4.1.2	M. polymorpha.....	13
4.2	Engrosamiento de la matriz extracelular en C. reinhardtii.....	14
4.3	Análisis de expresión de genes en C. reinhardtii mediante RT-qPCR.....	16
5	DISCUSIÓN.....	19
5.1	CONCLUSIONES.....	22
6	BIBLIOGRAFÍA.....	23

1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, xenobióticos como los microplásticos, se han hecho más frecuentes en el medio ambiente a causa del desarrollo industrial (1). Actualmente la producción de plásticos excede los 350 millones de toneladas anuales, encontrándose residuos prácticamente en casi todos los ecosistemas (2). Para el año actual, se estima que cerca de 69 millones de toneladas de estos plásticos terminarán en vertederos y en océanos, fragmentándose en microplásticos (MPs) (tamaño entre 0.1 μm y 5 mm de diámetro) y nanoplásticos (NPs) (tamaño inferior a 0.1 μm) (3).

Entre estos contaminantes, uno de los componentes de los plásticos más comunes es el Bisfenol A (BPA), el cual se encuentra en resinas epoxi y fenólicas, plásticos de policarbonato y recubrimientos de envases para alimentos (4). Debido a su uso extendido y a la inestabilidad de los polímeros en donde se encuentra, el BPA se libera al medio ambiente, pudiéndose hallar en suelos, sedimentos, masas de agua e incluso en organismos vivos (5). Para el ser humano, la exposición al BPA, así como otros MPs y NPs, ocurre principalmente a través de la dieta, su inhalación y el contacto dérmico (6,7). En cuanto a sus efectos en la salud, el BPA actúa como disruptor endocrino, mimetizando la acción de hormonas naturales, al interactuar con receptores hormonales como el receptor de estrógeno gamma, el de andrógenos y el de la hormona tiroidea (8,9). Esta interferencia puede alterar funciones críticas de los sistemas reproductivo, inmune y neuroendocrino (10).

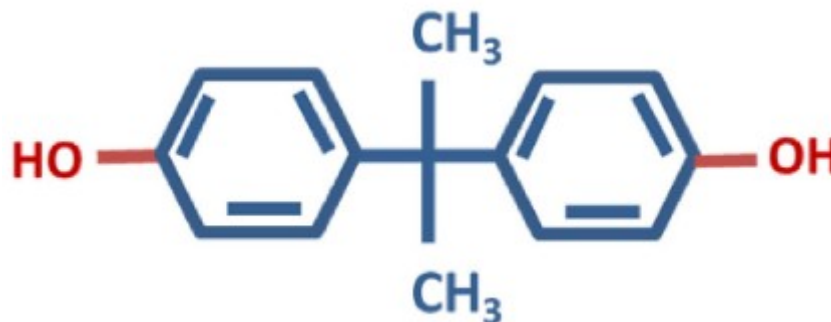


Figura 1. Estructura química del BPA. Fuente: Ma et al. (10).

En este contexto, la biorremediación mediante organismos fotosintéticos, como microalgas y hepáticas, puede surgir como una alternativa prometedora y ecológicamente viable (11). Estos organismos poseen mecanismos fisiológicos y bioquímicos capaces de tolerar, capturar o degradar contaminantes orgánicos. Las microalgas, en particular, han demostrado ser eficaces en la eliminación de diversos contaminantes en medios acuáticos gracias a su rápido crecimiento, su alta superficie de contacto y su capacidad para secretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que facilitan la adsorción de compuestos tóxicos (12).

Chlamydomonas reinhardtii es una especie que en los últimos años se ha utilizado como organismo modelo para estudiar varios parámetros fisiológicos y moleculares, ya que posee un ciclo celular simple, rápido crecimiento y además una buena disponibilidad de herramientas moleculares y bioinformáticas (13,14). Este organismo unicelular cuenta con su genoma completamente secuenciado, además de disponer de librerías génicas de mutantes, lo que ha favorecido su uso en investigaciones en los campos como la biología y la biotecnología (15). Diversos estudios han confirmado la capacidad de *C. reinhardtii* para interactuar y mitigar la toxicidad del BPA. Investigaciones recientes, además, han permitido comprender mejor este

proceso, demostrando que *C. reinhardtii* bioacumula BPA y lo detoxifica mediante una ruta dependiente del glutatión (*GSH*) (13,16). Este mecanismo, catalizado por enzimas como la Glutatión S-Transferasa (*GST*), tiene un alto coste celular: el agotamiento de las reservas de *GSH* provocando un desequilibrio en la homeostasis del hierro y una elevada peroxidación lipídica, una respuesta antioxidante general ante xenobióticos (13,17). Esta cascada de eventos desencadena un proceso denominado ferroptosis, un tipo de muerte celular regulada por hierro, identificada como la respuesta toxicológica central al BPA en este organismo- Además, en este proceso se ven involucrados genes como la Dehidroorotato deshidrogenasa (*DHODH*) y el del Canal de anión dependiente del voltaje 2 (*VDAC2*), lo que se ven afectados por la exposición al BPA y son marcadores de este proceso apoptótico (13). A pesar de este severo estrés inicial, las células supervivientes son capaces de iniciar una fase de recuperación y aclimatación después de 72 horas. Aunque la identificación de la ferroptosis representa un avance significativo, los mecanismos moleculares que orquestan esta compleja respuesta adaptativa y su potencial biotecnológico aún no se comprenden en su totalidad.

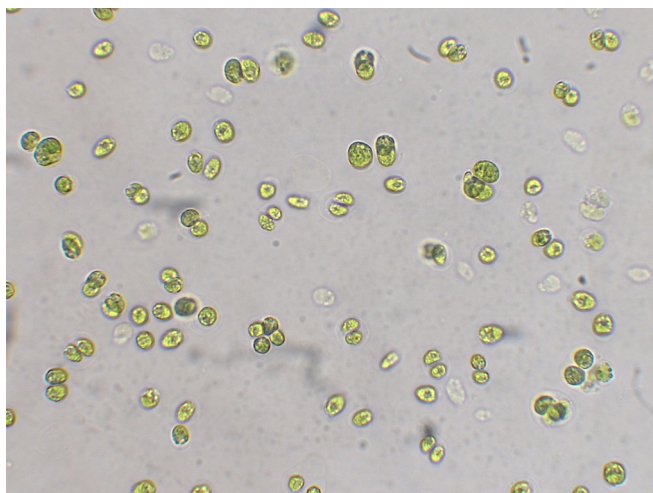


Figura 2. *C. reinhardtii* observada bajo microscopio óptico con un aumento de 40X.
Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, las hepáticas, también presentan características idóneas para la biorremediación, como una alta relación superficie-volumen y una gran capacidad adaptativa (18). Este grupo de plantas no vasculares, se sitúa en la base del linaje de las plantas terrestres y resulta clave para comprender la evolución de los mecanismos de respuesta al estrés en el reino vegetal (19).

Marchantia polymorpha se ha consolidado como una especie modelo en biología vegetal evolutiva y del desarrollo debido a ventajas como su fácil cultivo y propagación, así como a la disponibilidad de herramientas para su transformación genética (20,21). Su genoma secuenciado, se caracteriza por una baja redundancia génica, especialmente en genes reguladores, lo que sugiere que *M. polymorpha* posee una red reguladora simple y conservada, que ha sufrido pocas modificaciones evolutivas a lo largo del tiempo (22). Aunque los estudios de biorremediación en hepáticas se han centrado principalmente en metales pesados, donde se ha observado la activación de respuestas basadas en ROS y el metabolismo del glutatión (23), la evidencia de su interacción con contaminantes orgánicos como el BPA es todavía limitada. No obstante, un estudio en la hepática *Heteroscyphus planus* demostró su capacidad para degradar hasta un 63% de BPA en cinco días mediante

una peroxidasa extracelular (24). Este hallazgo sugiere que otras hepáticas, como *M. polymorpha*, podrían poseer mecanismos de detoxificación similares o novedosos. Sin embargo, la respuesta fisiológica y molecular de *M. polymorpha* frente al BPA permanece, hasta la fecha, inexplorada.



Figura 3. Cultivo *M. polymorpha* (Tak-1) en placa con medio Gamborg B5 a media concentración ($\frac{1}{2}$) con 1% de agar. Fuente: Elaboración propia.

Es importante señalar que, en diferentes individuos o cepas, puede existir variación natural intraespecífica impulsada por diferencias genéticas, que se traduce en un amplio espectro de respuestas fisiológicas y moleculares frente a un mismo contaminante (25). Esta variabilidad es la base de la adaptación local, donde poblaciones que han evolucionado en entornos con presiones selectivas específicas, como la presencia de xenobióticos, pueden presentar una mayor tolerancia o una capacidad de adaptación diferente (26). Por lo tanto, explorar esta diversidad natural es un paso fundamental, no solo para comprender los mecanismos evolutivos de la tolerancia al estrés, sino también para identificar los genotipos más eficientes y adaptables a estos compuestos.

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue analizar los efectos del bisfenol A (BPA) sobre la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y la hepática *Marchantia polymorpha*, integrando respuestas fisiológicas y moleculares, con el fin de identificar mecanismos de tolerancia diferencial que puedan ser aprovechados en el diseño de estrategias de biorremediación basadas en organismos fotosintéticos. Para alcanzar este objetivo general, se planteron los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la respuesta fisiológica de distintas cepas de *C. reinhardtii* y poblaciones de *M. polymorpha* expuestas a concentraciones crecientes de BPA, mediante el análisis de parámetros como crecimiento, eficiencia fotosintética y modificación de la matriz extracelular.

· Analizar la expresión diferencial de genes clave implicados en la respuesta al estrés oxidativo y a xenobióticos (e.g., *GST*, *DHODH*, *VDAC2*), con el fin de identificar marcadores moleculares asociados a la tolerancia o sensibilidad al contaminante.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas y cultivo

3.1.1 *C. reinhardtii*

Las cepas de *C. reinhardtii* utilizadas fueron CC4278, CC1690 y CC621, obtenidas del Chlamydomonas Culture Collection (<https://www.chlamycollection.org/>). Las células se cultivaron en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) (27). Este medio de cultivo contiene ácido acético (1 mL/L) como única fuente de carbono. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a una temperatura de 25 °C, un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad utilizando luz blanca LED (F-Bright LED 4000K) con una intensidad de 200 $\mu\text{mol foton}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ y en agitación de 180 rpm.

3.1.2 *M. polymorpha*

Yemas conservadas en oscuridad a -4°C de Tak-1 (Takaragaike-1, masculino) y Tak-2 (Takaragaike-2, femenino) de *M. polymorpha* fueron cultivadas en medio B5 de Gamborg a ½ de concentración con 1 % de agar (p/v) a 21 °C. Se mantuvieron bajo condiciones de días largos (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad) en cámara de cultivo utilizando luz blanca LED (KEMA KEUR EAC 4000K) con una intensidad lumínica de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR) durante 15 días. Se mantuvieron en estas condiciones por 3 semanas, hasta que los talos formaron conceptáculos con nuevas yemas. Estas fueron colectadas y suspendidas en tubo eppendorf con agua destilada estéril al momento de montar el ensayo.

3.2 Diseño experimental

3.2.1 *C. reinhardtii*

Los cultivos de las cepas se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento y se diluyeron a 5×10^4 células/mL en TAP antes de la exposición al BPA. Los cultivos se alicuotaron en 18 matraces de 0,5 L con un volumen de 280 mL organizándolo en 3 grupos (3 cepas distintas) de 6 replicas, 3 de estas con tratamiento con BPA y 3 correspondientes al control sin BPA. La concentración de BPA utilizada fue de 40 mg/L basada en el estudio realizado por Carbó et al. (2023) (13), para lo cual se adicionaron 84.21 μL de un stock de 0,133 g/mL de BPA y la misma cantidad de volumen en metanol (disolvente del BPA) a los cultivos control.

3.2.2 *M. polymorpha*

El ensayo consistió en cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de BPA, cada uno con 15 réplicas por sexo. Las yemas fueron cultivadas en el medio de cultivo con diferentes concentraciones de BPA: 5, 10 y 20 mg/L, para las cuales se añadieron 2,6 μL , 5,62 μL y 10,4

µL respectivamente de stock de BPA disuelto en metanol a una concentración de 0,133 g/mL, aforando cada una al volumen mayor con metanol. Al tratamiento control se le añadió el mismo volumen de metanol utilizado en los tratamientos experimentales. Cada tratamiento se dispuso en dos placas de cultivo, distribuyendo aleatoriamente las 15 réplicas de cada sexo. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a 21 °C, bajo condiciones de días largos (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad), con una intensidad lumínica de 80 µmol m⁻² s⁻¹ (PAR), durante 15 días.

3.3 Crecimiento celular y actividad fotosintética

3.3.1 *C. reinhardtii*

Se realizaron muestreos de densidad celular y fotosíntesis para los tiempos de 0 h, 24 h, 48 h, 120 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:

Para la cepa CC1690:

$$CC\ 1690\ (\text{células mL}^{-1}) = \frac{\left(\frac{\text{Abs } 630\ \text{nm} + 0.0067}{3 \cdot 10^{-6}} + \frac{\text{Abs } 750\ \text{nm} - 0.0065}{2 \cdot 10^{-6}} \right)}{2}$$

Para las cepas CC4278/621:

$$CC\ 4278/621\ (\text{células mL}^{-1}) = \frac{\left(\frac{\text{Abs } 630\ \text{nm} - 0.0123}{1 \cdot 10^{-6}} + \frac{\text{Abs } 750\ \text{nm} - 0.0119}{9 \cdot 10^{-7}} \right)}{2}$$

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

3.3.2 *M. polymorpha*

Para determinar la tasa de crecimiento de las yemas, se escanearon las placas cada 48 horas con el programa MultiScan V1.1 conectado escaner Epson Perfection V600 Photo. Para calcular el área de crecimiento se utilizó el programa el Biodock.ai, basado en inteligencia artificial que fue entrenado para automatizar la mediciones, la cual expresa el resultado en cm². Para determinar la eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm) se utilizó un fluorímetro de modulación de amplitud de pulso (Walz, JUNIOR-PAM) tras un periodo de incubación de 15 min en oscuridad.

3.4 Engrosamiento de la matriz extracelular en *C. reinhardtii*

En cada uno de los tiempos de muestreo, se llevó a cabo la tinción de la matriz extracelular de los distintos cultivos con el objetivo de identificar posibles diferencias inducidas por el BPA entre los tratamientos empleando microscopía óptica. Para la fijación de las muestras, se tomaron 1 mL de cultivo en cada punto de muestreo y se le añadieron 500 μ L de una solución fijadora (12 % (v/v) formaldehído en tampón fosfato (0,30 M, pH 7.2), con el fin de alcanzar concentraciones finales de 4 % de formaldehído y 0,1 M de tampón fosfato. Luego, estas fueron almacenadas a 4°C hasta realizar la tinción. Posteriormente, se resuspendieron 20 μ L de muestra almacenada en un microtubo junto con 20 μ L de solución de *Alcian Blue* (0,5 % p/v), incubando la mezcla durante 30 minutos a 4 °C. Finalizada la incubación, se depositaron los 40 μ L sobre un portaobjetos y se dejó secar parcialmente durante 3 a 4 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 150 μ L de metanol para fijar la muestra, dejándola reposar durante 2 minutos. El metanol se evaporó completamente utilizando una corriente de aire caliente, cuidando de no calentar excesivamente el portaobjetos. Finalmente, la muestra se lavó suavemente con agua corriente, y se escurrió el exceso de agua. Se colocó un cubreobjetos y se procedió a la observación inmediata bajo el microscopio óptico.

3.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc de *C. Reinhardt*

Para la extracción de ARN, se centrifugaron 50 mL de cada cepa de *C. reinhardtii* durante 5 min a 1900g a los tiempos de muestreo 24 h y 48 h, se descartó el sobrenadante y se congelaron rápidamente en un tubo Eppendorf junto bolas de vidrio de 0,75 mm de diámetro en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta realizar la extracción del ARN.

Para llevar a cabo la extracción se empleó el protocolo de Valledor et al. (2014) (28). Las muestras se homogenizaron mecánicamente ultracongeladas para romper las células utilizando un homogenizador Silamat S6 (Ivoclar Vivadent). Luego se agregaron 600 μ L de tampón de extracción (PBS, Pellet Solubilization Buffer), el cual contenía 7 M Guanidina-HCl, 2% (v/v) TWEEN-20, 4 % (v/v) NP-40, 50 mM Tris, pH 7,5, y β -mercaptoethanol al 1% v/v, a cada tubo y se volvió a homogenizar. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 37 °C y, posteriormente, se centrifugó a 14,000 x g durante 3 minutos para clarificar el lisado. El sobrenadante, que contenía los ácidos nucleicos totales, fue cuidadosamente transferido a un nuevo tubo de microcentrifuga. Para facilitar la unión del ARN a la membrana de sílice, se añadieron 300 μ L de acetonitrilo al sobrenadante y la mezcla se transfirió a una columna de purificación de sílice y se centrifugó a 12,000 x g durante 2 minutos. El eluido fue descartado. Para eliminar contaminantes, la columna fue lavada con 600 μ L de WB1 (Washing Buffer 1) conformado por 2 mM Tris pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, etanol 90%. A continuación se centrifuga 2 minutos a 12.000 g. Para eliminar el ADN genómico contaminante, se realizó un tratamiento con DNasa I directamente en la columna, añadiendo 50 μ L de una solución de DNasa I (Thermo Fisher Scientific, #EN0525) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego la columna nuevamente se sometió a una serie de lavados, primero con 600 μ L de WB1 y a continuación con otros 600 μ L WB2 (2 mM Tris pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, etanol 70%). Tras esto se centrifuga a gran velocidad (1 minuto a 20.000 g) para eliminar resto de los componentes añadidos anteriormente permitiendo este último paso un secado de la columna. Para la elución del ARN, la columna de sílice seca se colocó en un

nuevo tubo de recolección de 1.5 mL. Se añadieron 50 µL de agua libre de ARNasas directamente sobre el centro de la membrana y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. El ARN purificado fue eluido mediante centrifugación a 21,000 x g durante 1 minuto. La concentración y pureza del ARN obtenido fueron determinadas mediante espectrofotometría, y su integridad fue verificada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ARN fue almacenado a -80 °C para su conservación a largo plazo.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante transcripción inversa a partir de aproximadamente 1 µg de ARN total por muestra. Para ello, el ARN se combinó con 1.5 µL de cebadores hexámeros aleatorios (Random Hexamers, 100 pmol/µL) y se ajustó el volumen final a 12.5 µL con agua libre de ARNasas. Para desnaturalizar la estructura secundaria del ARN y permitir la unión de los cebadores, la mezcla fue incubada a 65 °C durante 5 minutos en un termociclador. Inmediatamente después, se añadió a cada tubo una mezcla maestra para la reacción de retrotranscripción, compuesta por 4.0 µL de tampón de reacción 5x, 2.0 µL de una mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno), 0.5 µL del inhibidor de ARNasas Ribolock® (Thermo Fisher Scientific, #E00381) y 1.0 µL de la enzima transcriptasa inversa M-MuLV (Thermo Fisher Scientific, #EP0742). La reacción de síntesis se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: una incubación inicial a 25 °C durante 10 minutos para el alineamiento de los cebadores, seguida de la elongación o síntesis de la hebra de ADNc a 45 °C durante 75 minutos. Finalmente, la reacción se detuvo mediante la inactivación de la enzima a 80 °C durante 10 minutos. El ADNc sintetizado se diluyó en una proporción de 1:5 con agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C para su posterior uso en análisis de qPCR.

3.6 Análisis de expresión de genes en *C. reinhardtii* mediante RT-qPCR

Para evaluar el impacto del BPA a nivel transcripcional en *C. reinhardtii*, se midió la expresión relativa de genes clave mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se analizaron tres genes diana asociados a la respuesta al estrés: GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (*GST*), DEHIDROOROTATO DESHIDROGENASA (*DHODH*) y CANAL DE ANIÓN DEPENDIENTE DEL VOLTAJE 2 (*VDAC2*) de acuerdo con datos previos del grupo de investigación (13). Para la normalización de los datos, se empleó como gen de referencia (*housekeeping*) el gen de la ACTINA (*IDA5*). Se emplearon cebadores específicos disponibles en el grupo de investigación (Tabla 1) para cada uno de los genes mencionados, cuya especificidad fue confirmada mediante el análisis de la curva de fusión.

Tabla 1. Cebadores utilizados.

Gen	Identificador	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tm teórica (°C)	Tamaño (pb)
Actina (<i>IDA5</i>)	Cre13.g603700	GCGGCTACTCGTTCACCACCAC	60	93
Glutati3n-S-transferasa (<i>GST</i>)	Cre12.g538100	TCTCCTGCTCGAAGTCCAGGGC TACGTGGTCTATTTCAAGAC	59,6	135
Dehidroorotato deshidrogenasa (<i>DHODH</i>)	Cre03.g199423	TGAAGTAGTGCGTCTTGAT CACTCCACACAAAAGTGTT	60,6 60,4 60,6	135
Canal de an3n dependiente del voltaje 2 (<i>VDAC2</i>)	Cre05.g241950	GTGTGATTGAGCCTT CGTCACCAAATACAACCTT GTGGCTGTAGATGAGCTT	60,7 60,2	103

Para cuantificar los niveles de expresión génica, se llevó a cabo una RT-qPCR. utilizando el Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, #4385610), conforme al protocolo del fabricante. Para cada gen en estudio, se preparó una mezcla de reacción en condiciones de oscuridad y sobre hielo. La composición de la mezcla para una reacción individual fue la siguiente: 5 µL de 2X Sybr Green Master Mix, 1 µL de la mezcla de cebadores (forward y reverse, a una concentración final de 10 pmol/µL cada uno) y 2 µL de agua libre de ARNasas, para un volumen parcial de 8 µL.

En cada pocillo de la placa, se dispensaron primero 2 µL del ADNc previamente sintetizado y diluido (1:5). A continuación, se añadieron 8 µL de la mezcla de reacción, previamente preparada, a cada pocillo. Una vez dispensados todos los componentes, la placa fue sellada con una película óptica adhesiva, mezclada suavemente y centrifugada brevemente para asegurar que todo el volumen estuviera en el fondo de los pocillos. La amplificación se realizó con el sistema CFX Connect Real Time PCR (Bio-Rad), empleando el siguiente programa: Las condiciones del termociclador consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguida de 45 ciclos de amplificación. Cada ciclo incluyó una desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y una fase de alineamiento y extensión a 60 °C por 30 segundos, adquiriendo la señal de fluorescencia al final de este último paso. Finalmente, para verificar la especificidad del producto amplificado, se generó una curva de fusión mediante un incremento de temperatura desde 55 °C hasta 90 °C con aumentos de 0.5 °C. Los resultados fueron analizados mediante el software Bio-Rad CFX Manager, utilizando el método comparativo CT descrito por Schmittgen & Livak (2008).

3.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con R 4.2.2 en la versión de Rstudio 2023.05.1. Para el análisis de los datos de crecimiento celular y actividad fotosintética, tanto para *C. reinhardtii* como para *M. polymorpha*, 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. Debido a 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.

Para el análisis estadístico de la expresión génica en *C. reinhardtii* obtenida por RT-qPCR, se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Una vez verificados ambos supuestos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey para identificar diferencias significativas entre los tratamientos para cada gen evaluado en cada cepa.

4 RESULTADOS

4.1 Crecimiento celular y actividad fotosintética

4.1.1 *C. reinhardtii*

En comparación con los cultivos control, la exposición a BPA provocó un notable retraso en el crecimiento de las tres cepas. Mientras que los cultivos control mostraron una cinética de crecimiento rápida, alcanzando la fase estacionaria aproximadamente a las 48 horas, los cultivos tratados con BPA exhibieron una proliferación considerablemente más lenta. No obstante, tras 120 horas de exposición, estos cultivos lograron alcanzar densidades celulares similares a las de los controles, lo que sugiere un efecto citotóxico inicial inducido por el BPA, seguido de un eventual proceso de recuperación o adaptación celular (Figura 4A, 5A y 6A).

En cuanto a la eficiencia fotosintética del fotosistema II, las tres cepas mostraron resultados diferentes entre si. En la cepa 4278 (Figura 4B), se observa que el grupo control mantiene una eficiencia fotosintética muy alta y estable, con valores de Fv/Fm constantes alrededor de 0.75-0.77. En contraste, el grupo expuesto a BPA, aunque inicialmente similar al control, sufre una caída drástica en la eficiencia a las 48 horas, revelando un estrés agudo. Sin embargo, hacia las 120 horas, esta cepa muestra una recuperación, aunque con mayor dispersión de datos que la situación control.

En relación a la Cepa 1690 (Figura 5B), la respuesta es diferente. Aquí, el efecto negativo del BPA es mucho más rápido, con una disminución clara del Fv/Fm ya a las 24 horas. Este daño es sostenido y progresivo a lo largo del experimento, sin mostrar a penas signos de recuperación. Al final, a 120 horas, el tratamiento con BPA registra la media de valores Fv/Fm más bajos aunque las diferencias frente al control son menores que a 48 horas.

La Cepa 621 (Figura 6B) presenta un patrón de respuesta diferente al resto. El grupo control comienza con una eficiencia relativamente baja, pero mejora significativamente a las 24 horas y se mantiene alto. Esto sugiere una fase de adaptación inicial. Por el contrario, el grupo con BPA, partiendo del mismo nivel bajo, nunca logra mejorar; su eficiencia se mantiene en valores bajos y constantes.

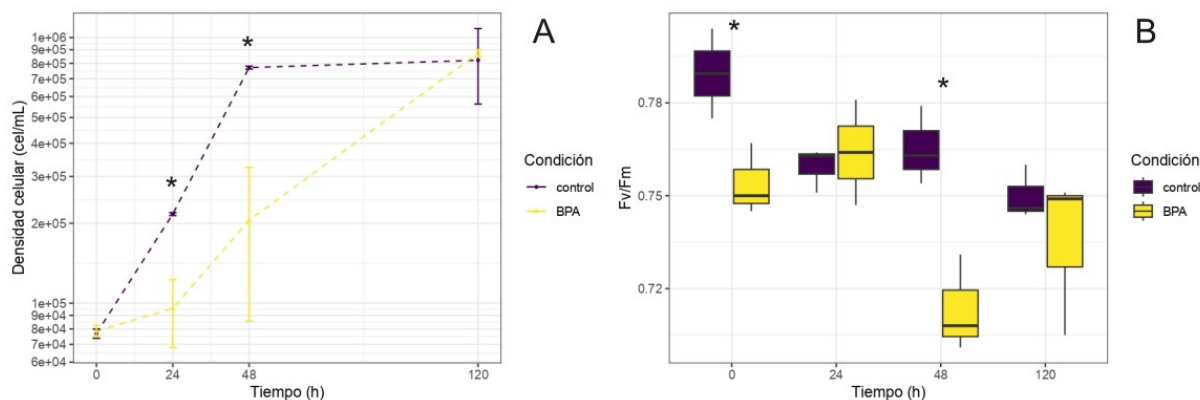
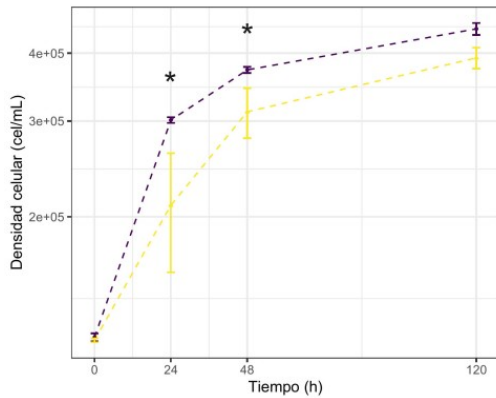
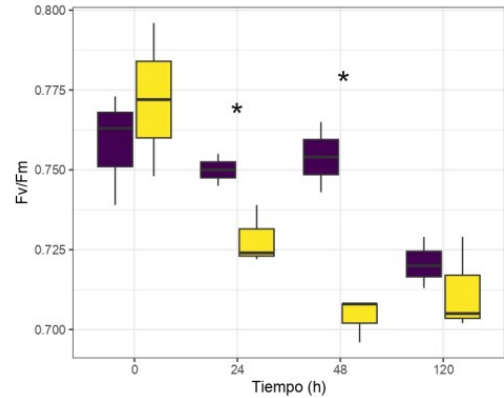


Figura 4. Crecimiento celular (A) y Fv/Fm (B) de la cepa 4278 del tratamiento control y con BPA tras 120 horas de exposición medido en células por mL de cultivo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tiempo ($p < 0,05$).

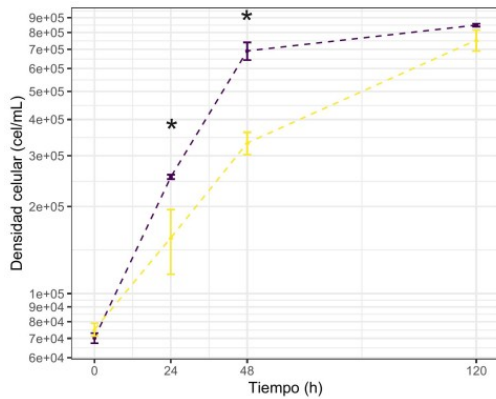


A

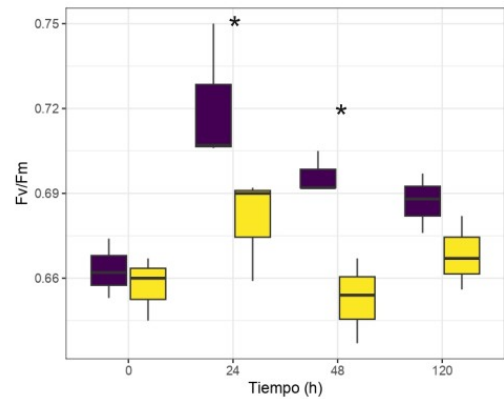


B

Figura 5. Crecimiento celular (A) y Fv/Fm (B) de la cepa 1690 del tratamiento control y con BPA tras 120 horas de exposición medido en células por mL de cultivo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tiempo ($p < 0,05$).



A



B

Figura 6. Crecimiento celular (A) y Fv/Fm (B) de la cepa 621 del tratamiento control y con BPA tras 120 horas de exposición medido en células por mL de cultivo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo tiempo ($p < 0,05$).

4.1.2 *M. polymorpha*

La exposición de *M. polymorpha*, tanto para Tak-1 y Tak-2, a BPA durante 16 días tuvo un efecto significativo en el crecimiento, pero no en la eficiencia fotosintética analizada el último día del experimento (Figura 7 y 8). Se observó una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis en los tratamientos con BPA. Mientras que los talos del cultivo control mostraron un crecimiento exponencial y superior a lo largo del experimento, los cultivos expuestos a 5, 10 y 20 mg/L de BPA exhibieron una tasa de crecimiento más lenta. Este efecto inhibitorio se hizo más evidente a medida que avanzaba el ensayo; a partir del día 7, las curvas de crecimiento de los tratamientos comenzaron a divergir claramente de la del control. La inhibición fue más pronunciada en el tratamiento con 20 mg/L, donde el aumento de la tasa de crecimiento fue la más baja durante los 16 días del ensayo (Figura 7A y 8A). A pesar del claro efecto sobre el crecimiento, la eficiencia fotosintética máxima del Fotosistema II (Fv/Fm) tanto para Tak-1 como Tak-2, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos en el punto de muestreo analizado, que dado las condiciones de esterilidad que se realizaba el experimento tuvo que hacerse al finalizar del mismo, a los 16 días de cultivo (Figura 7B y 8B). Los valores de Fv/Fm para todos los grupos, incluido el control, se mantuvieron en un rango alto y saludable, aproximadamente entre 0.75 y 0.78. Esto indica que, aunque el desarrollo de la

planta fue inhibido por el BPA, la funcionalidad de su aparato fotosintético se mantuvo intacta, al menos a los 16 días de cultivo.

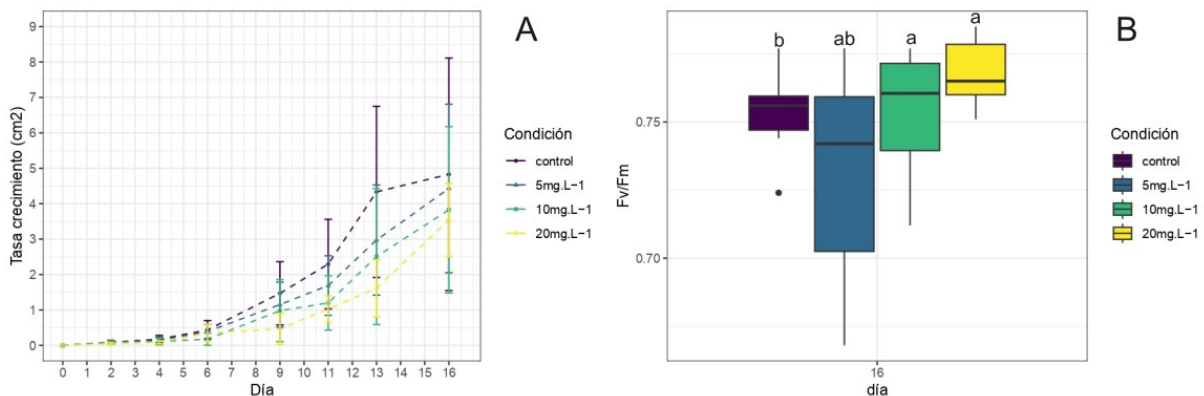


Figura 7. Tasa de crecimiento (A) y Fv/Fm (B) de *M. polymorpha* (Tak 1) de 4 tratamientos: 1 control y 3 con BPA (5, 10 y 20 mg/L), tras 16 días de exposición. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

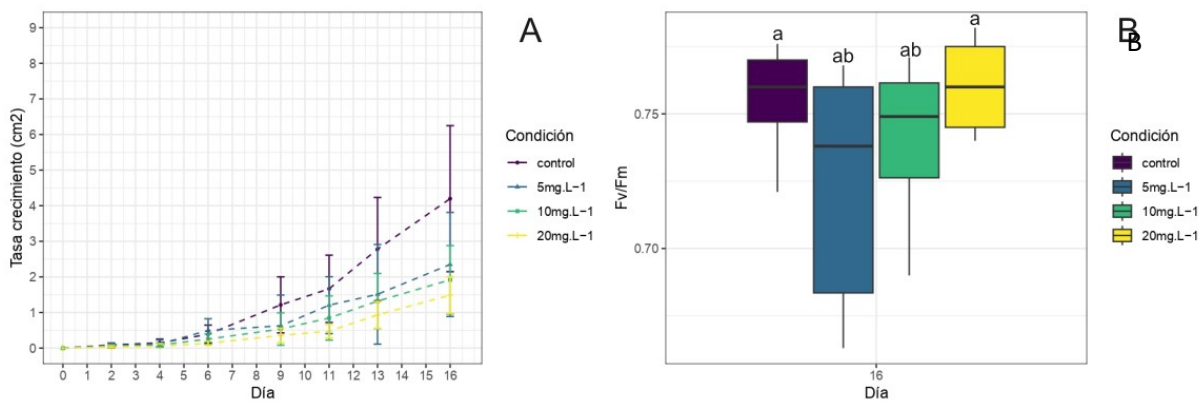


Figura 8. Tasa de crecimiento (A) y Fv/Fm (B) de *M. polymorpha* (Tak 2) de 4 tratamientos: 1 control y 3 con BPA (5, 10 y 20 mg/L), tras 16 días de exposición. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

4.2 Engrosamiento de la matriz extracelular en *C. reinhardtii*

Las tinciones del tratamiento control en la cepa 4278 (Figura 9), presentó un tenue marcaje de fondo, indicando una baja producción basal de EPS. Sin embargo, tras la exposición a BPA, se observó un aumento en la producción de EPS, con la formación de agregados compactos fuertemente teñidos a las 24 y 48 horas. Aunque los agregados parecían ligeramente más dispersos a las 120 horas, la tinción azul continuó siendo significativamente más intensa que en el control.

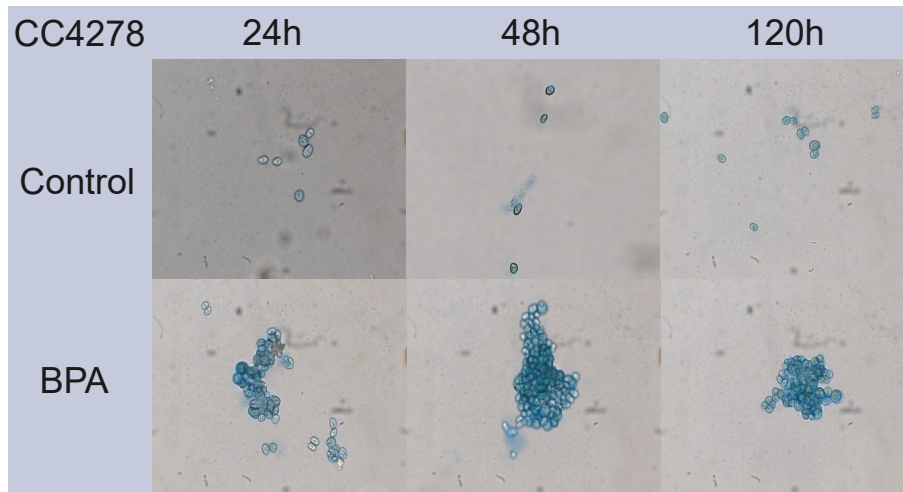


Figura 9. Matriz extracelular teñida con *Alcian Blue* de CC4278 de los tratamientos control y BPA a las 24, 48 y 120 horas.

Para la cepa 1690 (Figura 10), en el tratamiento control la tinción con *Alcian Blue* fue mucho menos intensa a lo largo de los tres tiempos de muestreo, observándose células mayoritariamente dispersas con escasa matriz teñida. Por otro lado, las células expuestas a BPA mostraron ya a las 24 horas la formación de agregados celulares en una intensa matriz de color azul. Esta agregación y producción de EPS se mantuvo durante los tiempos de muestreo de 48 y 120 horas.

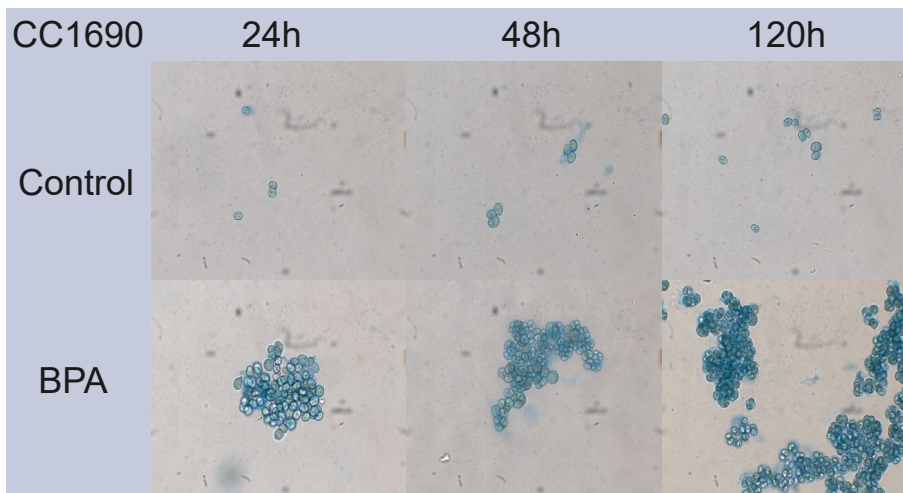


Figura 10. Matriz extracelular teñida con *Alcian Blue* de CC1690 de los tratamientos control BPA a las 24, 48 y 120 horas.

Con respecto a la cepa 621 (Figura 11), las células de control mostraron una producción basal de EPS ligeramente superior a las otras dos cepas, con pequeñas agrupaciones y una tinción azul leve pero más visible. Bajo la exposición a BPA, la producción de EPS aumentó considerablemente, formando un agregado denso a las 24 horas. Luego, a las 48 y 120 horas, los agregados en esta cepa parecieron desestructurarse, aunque la intensidad de la tinción empezó a asemejarse a la de los controles.

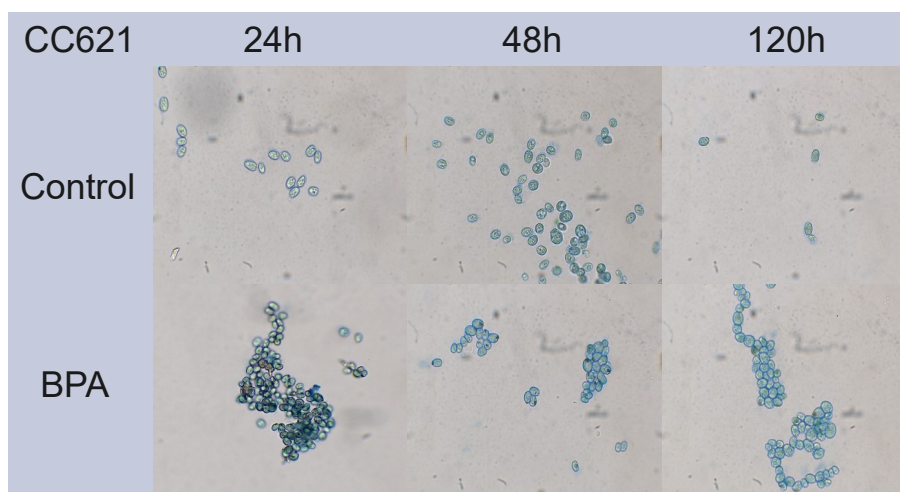


Figura 11. matriz extracelular teñida con *Alcian Blue* de CC621 de los tratamiento control y BPA a las 24, 48 y 120 horas.

4.3 Análisis de expresión de genes en *C. reinhardtii* mediante RT-qPCR

A las 24 horas de tratamiento (Figura 12A), se observaron diferencias en la expresión del gen *GST* entre las 3 cepas de *C. reinhardtii*. En la C621, el grupo control presentó el nivel de expresión significativamente más alto en comparación con el resto. En esta misma cepa, el tratamiento con BPA presentó una expresión significativamente menor en comparación con su propio control, existiendo diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, en las cepas C4278 y C1690, los niveles de expresión del gen *GST* fueron considerablemente más bajos tanto en control como en el tratamiento con BPA. La cepa C4278 mostró un ligero incremento de la expresión en presencia de BPA respecto a su control, aunque ninguna de estas condiciones mostró diferencias estadísticas significativas con los grupos de la cepa C1690 o el grupo BPA de la cepa C621, ni tampoco entre los tratamientos de una misma cepa.

Después de 48 horas de exposición (Figura 12B), el patrón de expresión del gen *GST* cambió notoriamente. En todas las cepas analizadas se observó una tendencia general de inducción de la expresión del gen *GST* por el tratamiento con BPA en comparación con sus respectivos controles. Este efecto fue especialmente destacado en la cepa C621, donde la exposición a BPA provocó el nivel de expresión más alto de todos, siendo este significativamente mayor que los niveles observados en las cepas C4278 y C1690. El grupo control de la cepa C621 mostró una expresión basal de *GST* elevada, ya apreciada a las 24h, pero cuyas diferencias no fueron significativas al comparar todos ni con su tratamiento con BPA. En las cepas C4278 y C1690, el tratamiento con BPA también indujo un claro aumento en la expresión del gen *GST* en comparación con sus controles, existiendo diferencias estadísticamente significativos para cada caso.

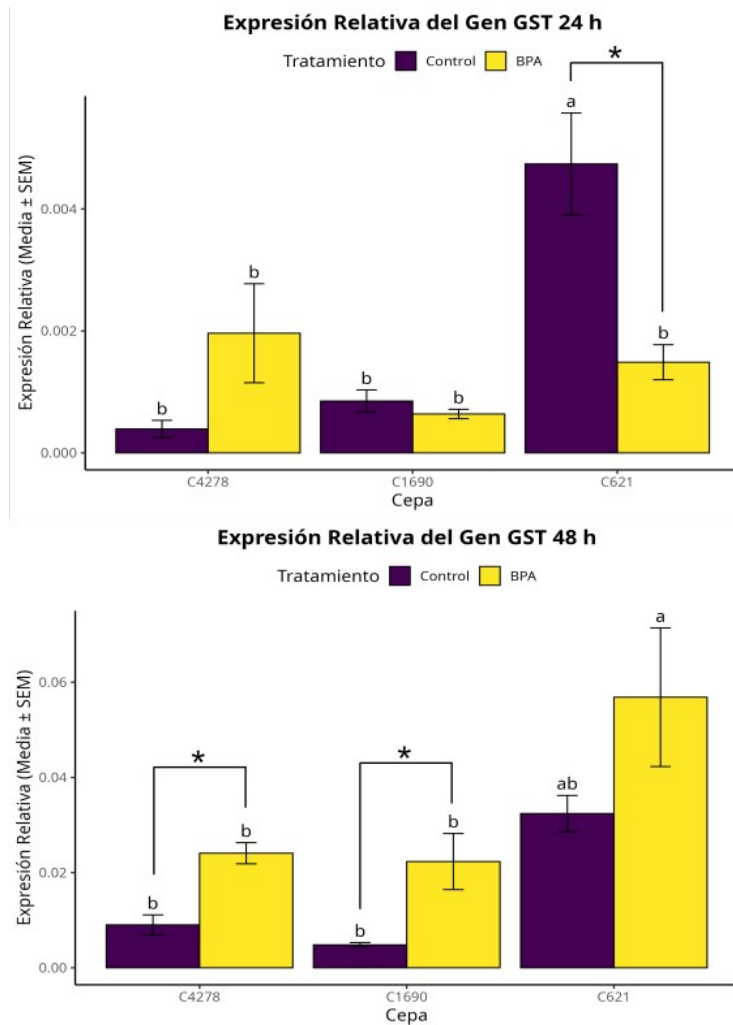


Figura 12. Expresión relativa del gen GST de los tratamientos Control y BPA a las 24h y 48h para las cepas 4278, 1690 y 621. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas y los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los tratamientos de una misma cepa ($p < 0,05$).

A las 24 horas de tratamiento (Figura 13A), la expresión del gen *DHODH* mostró una tendencia a la baja en presencia de BPA en todas las cepas. Las cepas C4278 y C1690 presentaron los niveles de expresión basal (control) más elevados, siendo estadísticamente significativo para 1690. El grupo control de la cepa C4278 mostró el nivel de expresión más alto de todo el ensayo. Tras el tratamiento con BPA, la expresión en las cepas C4278 y C1690 disminuyó notablemente. Esta reducción fue estadísticamente significativa en la cepa C1690, cuyo grupo tratado con BPA presentó uno de los niveles de expresión más bajos. Por su parte, la cepa C621 mostró niveles de expresión bajos tanto en la condición control como en la de tratamiento con BPA, existiendo diferencias significativas entre ellas y siendo significativamente inferiores a los controles de las otras dos cepas.

A las 48 horas (Figura 13B), los patrones de expresión mostraron algunas variaciones. La cepa C4278 mantuvo una expresión relativa alta y estable tanto en el grupo control como en el tratado con BPA, sin diferencias significativas entre ambos. En contraste, la cepa C1690 continuó mostrando una baja significativa de la expresión del gen *DHODH* por efecto del BPA, aunque el nivel de su grupo control fue intermedio. La cepa C621, de manera similar a las 24 horas, mantuvo niveles de expresión bajos y sin diferencias entre el grupo control y el

expuesto a BPA, los cuales fueron significativamente menores a los observados en la cepa C4278.

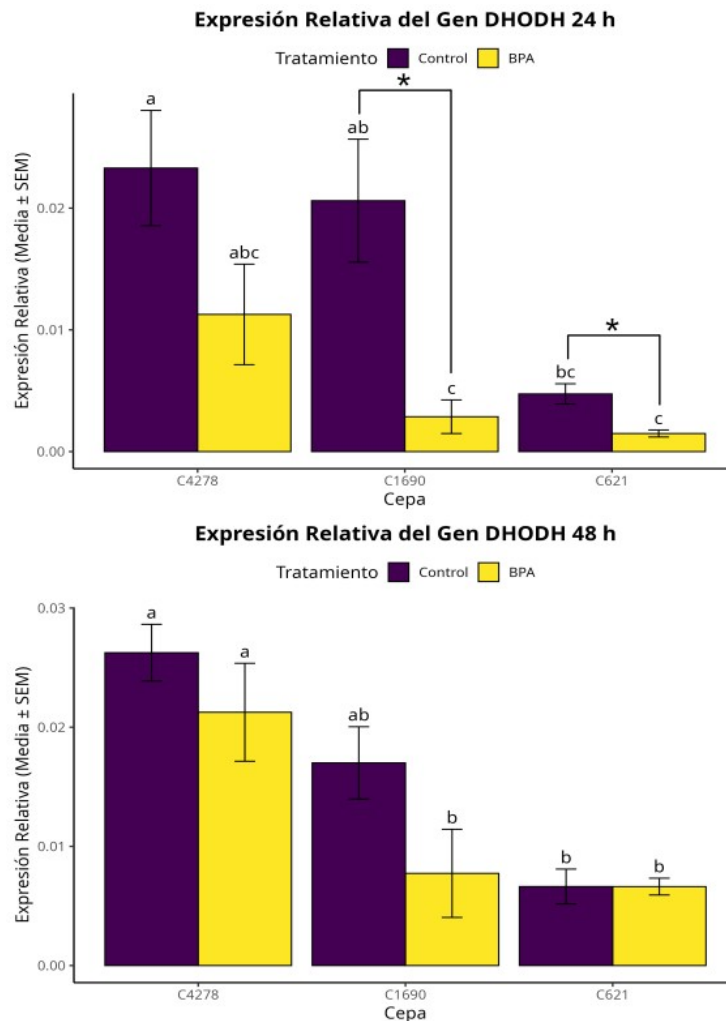


Figura 13. Expresión relativa del gen *DHODH* de los tratamientos Control y BPA a las 24h y 48h para las cepas 4278, 1690 y 621. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas y los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los tratamientos de una misma cepa ($p < 0,05$).

La respuesta del gen *VDAC2* al BPA fue marcadamente dependiente de la cepa. A las 24 horas de exposición (Figura 14A), la cepa C1690 mostró un aumento de la expresión en respuesta al BPA, alcanzando uno de los niveles más altos del ensayo, con diferencias estadísticamente significativas con su nivel de control, que también fue uno de los más bajos. En la cepa C621, los niveles de expresión fueron elevados tanto en la condición de control como en la de tratamiento con BPA, sin diferencias significativas entre ellos. En contraste, la cepa C4278 mostró un comportamiento opuesto, con una diferencia significativa de la expresión del gen *VDAC2* en el grupo tratado con BPA en comparación con su control.

A las 48 horas de tratamiento (Figura 14B), el patrón de expresión cambió considerablemente, siendo la cepa C621 en la situación control la que alcanza los niveles de expresión más elevados de todos. En esta cepa, el tratamiento con BPA presentó una expresión menor que su control, invirtiendo la tendencia observada a las 24 horas. Por otro lado, tanto en la cepa C4278 como en la C1690, la exposición a BPA indujo un aumento en la expresión de *VDAC2*

en comparación con sus respectivos controles. Este efecto fue más marcado en la cepa C4278, presentado diferencias significativas con su control. La cepa C1690, a su vez, mostró el nivel de expresión más bajo en su grupo control.

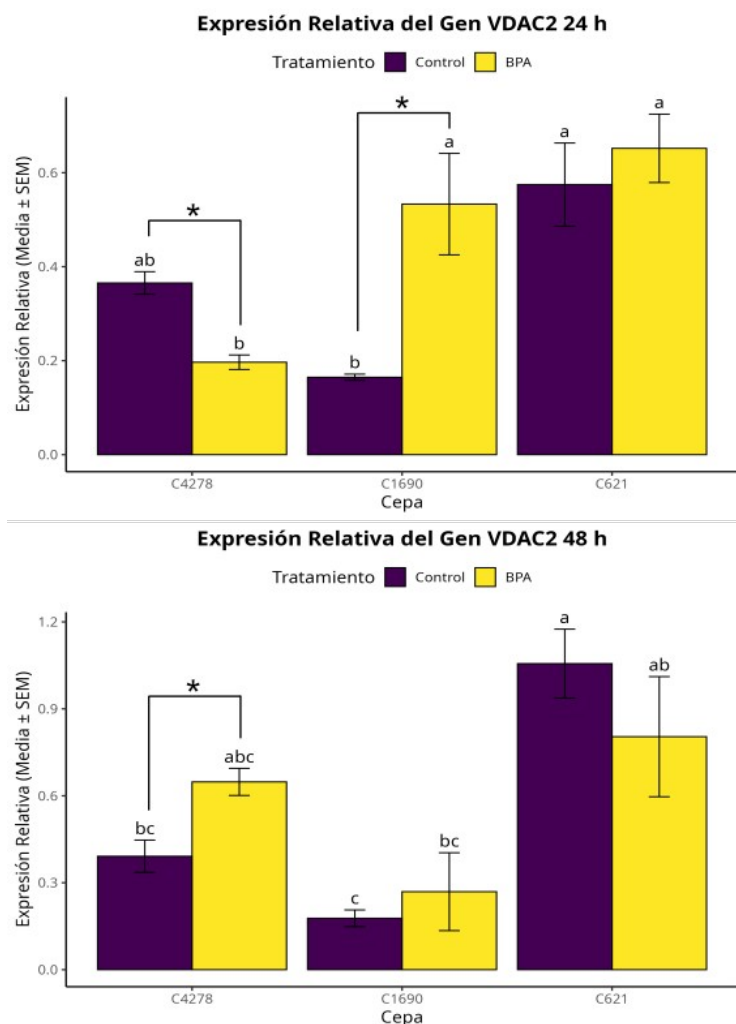


Figura 14. Expresión relativa del gen VDAC2 de los tratamientos Control y BPA a las 24h y 48h para las cepas 4278, 1690 y 621. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas y los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los tratamientos de una misma cepa ($p < 0,05$).

5 DISCUSIÓN

Este trabajo se investiga los efectos del BPA sobre dos organismos fotosintéticos: la microalga unicelular *C. reinhardtii* y la hepática *M. polymorpha*. Los resultados revelaron respuestas toxicológicas complejas y específicas de cada especie y cepa, que abarcan desde la fisiología general hasta la expresión de genes concretos, proporcionando una visión integral de los mecanismos de defensa y sensibilidad frente a este compuesto.

En *M. polymorpha*, el BPA causó una inhibición inicial del crecimiento de forma dosis-dependiente; sin embargo, la planta logró recuperarse posteriormente, alcanzando una tasa de crecimiento similar en todos los tratamientos, esto tanto para Tak-1 como Tak-2. A pesar de esto, el aparato fotosintético no sufrió daños significativos tras 16 días de exposición a la concentración más alta. Si bien no se tomaron mediciones durante los días previos, dadas las condiciones de esterilidad en las que se realizó el ensayo, se podría inferir que el Fotosistema II se mantuvo funcionalmente estable luego los días de exposición. Este diseño experimental

deberá ser mejorado en próximas iteraciones del experimento, considerando el muestreo en todos los tiempos intermedios para la realización de análisis moleculares.

Esta relación entre crecimiento y eficiencia fotosintética podría indicar que *M. polymorpha* posee un complejo sistema que permite adaptarse a la exposición del BPA durante un periodo de tiempo. Las hepáticas, como plantas terrestres primitivas, han desarrollado robustos mecanismos de defensa para sobrevivir en ambientes hostiles, lo que podría explicar su mayor tolerancia y adaptación al BPA (29).

La capacidad de mantener la en buen funcionamiento el Fotosistema II bajo estrés crónico mientras se reduce el crecimiento puede ser una estrategia de supervivencia eficaz, permitiendo a la planta conservar energía y recursos hasta que las condiciones mejoren

La exposición a BPA también indujo un claro efecto citotóxico en las tres cepas de *C. reinhardtii*, visualizándose como un retraso inicial en el crecimiento. Este hallazgo es consistente con estudios previos que mostraron la toxicidad del BPA en diversas microalgas, incluyendo *C. reinhardtii*, donde se ha establecido una inhibición del crecimiento dependiente de la concentración (16,30). La recuperación de la densidad celular observada en los cultivos tras 120 horas podría deberse a la activación de mecanismos de adaptación o detoxificación (13) que permiten a las células sobreponerse al estrés inicial lo cual parece también observarse en *M. polymorpha*.

El análisis de la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) mostró respuestas heterogéneas en la respuesta entre cepas. La cepa C4278 mostró una dramática caída en F_v/F_m a las 48 horas, seguida de una recuperación, lo que apunta a un daño agudo pero reversible, resultado similar al hallado por Carbó et al. (13). En contraste, la cepa C1690 sufrió un daño rápido y sostenido, indicando una mayor sensibilidad o una menor capacidad de reparación. La cepa C621, por su parte, mantuvo una baja eficiencia fotosintética de forma constante bajo exposición a BPA. Esta variabilidad entre cepas revela la importancia del aspecto genético en la determinación de la sensibilidad a contaminantes y podría indicar que diferentes cepas pueden emplear estrategias de defensa distintas.

Una de las respuestas defensivas más notable fue el engrosamiento de la matriz extracelular compuestas por las EPS. Estas han sido descritas como una barrera protectora en microalgas frente a estreses abióticos, como metales pesados o contaminantes orgánicos (10,31,32). Las tres cepas incrementaron la producción de EPS en presencia de BPA, lo que se correlaciona con estar expuesto a un mayor estrés fisiológico. La formación de agregados celulares ensamblados en esta matriz sugiere un mecanismo de defensa frente a agentes tóxicos para *C. reinhardtii*, limitando su entrada a las células y, por tanto, su toxicidad interna.

El análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR proporcionó una visión molecular de las estrategias de respuesta al BPA, revelando patrones dependientes del tiempo y de la cepa.

La *GST* es una enzima clave en la detoxificación celular, catalizando la conjugación del glutatión a xenobióticos para facilitar su eliminación (33,34) Los resultados obtenidos a las 48 horas, donde todas las cepas mostraron una tendencia a la sobreexpresión de *GST* en presencia de BPA, concuerda con esta función protectora descrita (35). El marcado aumento en la cepa C621 a las 48 horas, coincidiendo con la recuperación del crecimiento, podría

sugerir que una activación de esta vía de detoxificación es relevante para la tolerancia a largo plazo en esta cepa. A las 24 horas, el control de la cepa C621 mostró una expresión elevada de *GST*, que fue menor en el tratamiento con BPA. Esto podría indicar una desregulación inicial del sistema de respuesta al estrés o una respuesta de choque donde los recursos con desviados hacia otras funciones o mecanismos.

El gen *DHODH* codifica un enzima mitocondrial esencial para la síntesis de novo de pirimidinas y está acoplada a la cadena de transporte de electrones (36,37). Su inhibición puede llevar a la detención del ciclo celular y a la muerte celular por ferroptosis (13,38). Los resultados de este trabajo mostraron que la expresión de *DHODH* fue disminuida por el BPA, especialmente a las 24 horas. Esta represión, que fue mayor en la cepa C1690, se correlaciona con el daño generado en la eficiencia fotosintética y el crecimiento, sugiriendo que la alteración del metabolismo de nucleótidos y la función mitocondrial es un mecanismo de toxicidad importante del BPA. La cepa C4278, que recuperó el crecimiento, también mostró una recuperación en la expresión de *DHODH* a las 48 horas, reforzando la idea de que mantener la función mitocondrial y la síntesis de nucleótidos es vital para la supervivencia.

El gen *VDAC2* codifica para una porina de la membrana mitocondrial externa que regula el flujo de metabolitos y iones, como el ATP, y juega un papel central en la homeostasis mitocondrial y la apoptosis (39,40). La expresión de *VDAC2* fue bastante desigual entre las cepas y especialmente en comparación entre los otros genes. La elevada expresión en la cepa C1690 a las 24 horas podría interpretarse como una respuesta de estrés mitocondrial. Por otra parte, la represión de la expresión en la C4278 en la misma medición podría ser parte de un mecanismo protector para limitar la permeabilización de la membrana mitocondrial. El nivel más alto de expresión en el control de la cepa C621 a las 48 horas es un resultado inesperado que podría indicar un estado metabólico particular de esta cepa en esta fase, que se ve alterado por el BPA. La alteración de *VDAC2* sugiere que la disfunción mitocondrial es un componente central de la toxicidad del BPA, afectando el metabolismo energético y la señalización celular.

Este trabajo demuestra de manera integrada que *C. reinhardtii* y *M. polymorpha* exhiben estrategias de adaptación al BPA notablemente distintas: la microalga recurre a rutas de detoxificación y refuerzo de la matriz extracelular para mitigar el daño inicial, mientras que la hepática restablece su fotosíntesis mediante mecanismos de reparación y reprogramación metabólica. La heterogeneidad entre las cepas y la regulación diferencial de genes clave (*GST*, *DHODH*, *VDAC2*) resaltan el papel central de la variabilidad genética y mitocondrial en la tolerancia al contaminante exhibida por el alga.

Aunque este estudio proporciona una base robusta para comprender la diversidad de respuestas al BPA en organismos fotosintéticos, aún quedan numerosos interrogantes por resolver. Resulta de vital importancia ampliar estos hallazgos a escenarios ambientales más complejos y caracterizar los determinantes genéticos y moleculares de la resistencia en distintas cepas y especies.

De cara al futuro, la integración de tecnologías ómicas (epigenómica, transcriptómica, metabolómica, proteómica) con ensayos de campo y exposiciones crónicas constituye una vía prometedora para identificar marcadores predictivos de resistencia y diseñar consorcios microbianos o cepas optimizadas. Estas investigaciones transformarán el conocimiento

adquirido en soluciones prácticas para la biorremediación del BPA y otros xenobióticos emergentes.

5.1 CONCLUSIONES

1. El efecto del BPA como disruptor metabólico en organismos fotosintéticos no es universal, dependiendo sus efectos de la especie y el ecotipo ensayado.
2. En *C. reinhardtii* la toxicidad afecta directamente su capacidad de crecimiento, daña la maquinaria fotosintética y activa una compleja respuesta molecular de defensa de forma específica para cada una de las cepas ensayadas.
3. En *M. polymorpha*, aunque se observa un impacto inicial sobre el crecimiento, la especie muestra una capacidad de adaptación, recuperando y manteniendo la funcionalidad fotosintética a largo plazo.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Goyal P, Basniwal RK. Environmental Bioremediation: Biodegradation of Xenobiotic Compounds. En: Hashmi MZ, Kumar V, Varma A, editores. *Xenobiotics in the Soil Environment: Monitoring, Toxicity and Management*. Cham: Springer International Publishing; 2017: p. 347-71.
2. Allen S, Allen D, Phoenix VR, Le Roux G, Durántez Jiménez P, Simonneau A, et al. Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nat Geosci*; 2019; 12(5):339-44.
3. Banerjee A, Shelver WL. Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. *Sci Total Environ*; 2021; 755:142518.
4. Naveira C, Rodrigues N, Santos FS, Santos LN, Neves RAF. Acute toxicity of Bisphenol A (BPA) to tropical marine and estuarine species from different trophic groups. *Environ Pollut*; 2020; 268:115911.
5. Abraham A, Chakraborty P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health*; 2020; 35(2):201-10.
6. Prata JC, Da Costa JP, Lopes I, Duarte AC, Rocha-Santos T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Sci Total Environ*; 2020; 702:134455.
7. Yang X, Man YB, Wong MH, Owen RB, Chow KL. Environmental health impacts of microplastics exposure on structural organization levels in the human body. *Sci Total Environ*; 2022;825:154025.
8. Almeida S, Raposo A, Almeida-González M, Carrascosa C. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Compr Rev Food Sci Food Saf*; 2018;17(6):1503-17.
9. Zhao B, Rehati P, Yang Z, Cai Z, Guo C, Li Y. The potential toxicity of microplastics on human health. *Sci Total Environ*; 2024; 912:168946.
10. Ma Y, Liu H, Wu J, Yuan L, Wang Y, Du X, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ Res*; 2019;176:108575.
11. Barone GD, Rodríguez-Seijo A, Parati M, Johnston B, Erdem E, Cernava T, et al. Harnessing photosynthetic microorganisms for enhanced bioremediation of microplastics: A comprehensive review. *Environ Sci Ecotechnology*; 2024;20:100407.
12. Manzi HP, Abou-Shanab RAI, Jeon BH, Wang J, Salama ES. Algae: a frontline photosynthetic organism in the microplastic catastrophe. *Trends Plant Sci*; 2022;27(11):1159-72.
13. Carbó M, Chaturvedi P, Álvarez A, Pineda-Cevallos D, Ghatak A, González PR, et al. Ferroptosis is the key cellular process mediating Bisphenol A responses in

- Chlamydomonas and a promising target for enhancing microalgae-based bioremediation. *J Hazard Mater*; 2023;448:130997.
14. Doron L, Segal N, Shapira M. Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications. *Front Plant Sci*; 2016 ;7.
 15. Craig RJ, Gallaher SD, Shu S, Salomé PA, Jenkins JW, Blaby-Haas CE, et al. The Chlamydomonas Genome Project, version 6: Reference assemblies for mating-type *plus* and *minus* strains reveal extensive structural mutation in the laboratory. *Plant Cell*; 2023; 35(2):644-72.
 16. Esperanza M, Seoane M, Servia MJ, Cid Á. Effects of Bisphenol A on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol Environ Saf*; 2020; 197:110609.
 17. Ugya AY, Meguellati K, Aliyu AD, Abba A, Musa MA. Microplastic stress induce bioresource production and response in microalgae: a concise review. *Environ Pollut Bioavailab*; 2022; 34(1):51-60.
 18. Singh A, Choudhary K. Role of Bryophytes in Phytoremediation: A Review: Review Article. *PhytoTalks.*; 2025;1(4):215-30.
 19. Torres TT, Rocha CMD, Rodrigues LHR. Bryophytes in removal of environmental contaminants: Review and bibliometric analysis. 1.^a ed. Seven Editora; 2023.
 20. Bowman JL, Arteaga-Vazquez M, Berger F, Briginshaw LN, Carella P, Aguilar-Cruz A, et al. The renaissance and enlightenment of *Marchantia* as a model system. *Plant Cell*. 27 de septiembre de 2022;34(10):3512-42.
 21. Ishizaki K, Nishihama R, Yamato KT, Kohchi T. Molecular Genetic Tools and Techniques for *Marchantia polymorpha* Research. *Plant Cell Physiol*; 2016; 57(2):262-70.
 22. Kohchi T, Yamato KT, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R. Development and Molecular Genetics of *Marchantia polymorpha*. *Annu Rev Plant Biol*; 2021; 72(1):677-702.
 23. Frohn S, Haas FB, Chavez BG, Dreyer BH, Reiss EV, Ziplys A, et al. Evolutionary Conserved and Divergent Responses to Copper Zinc Superoxide Dismutase Inhibition in Plants. *Plant Cell Environ*; 2024;1-16.
 24. Tjandrawaskitasari L, Hata R, Chiba H, Hashimoto M, Takahashi K, Nabeta K. Oxidation of Polyphenols by Extracellular Peroxidase in Suspension Cell Culture of Liverwort *Heteroscyphus planus*. *Nat Prod Commun*; 2007;2(6):1934578X0700200609.
 25. Madera-Parra CA, Peña-Salamanc EJ, Solarte-Sot JA. Efecto de la concentración de metales pesados en la respuesta fisiológica y capacidad de acumulación de metales de tres especies vegetales tropicales empleadas en la fitorremediación de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios. *Ing Compet*. 2014;16(2):179-88.

- 26.Reid NM, Proestou DA, Clark BW, Warren WC, Colbourne JK, Shaw JR, et al. The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *Science*. 2016; 354(6317):1305-8.
- 27.Harris EH. *The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use*. San Diego; 1989. 780 p.
- 28.Valledor L, Escandón M, Meijón M, Nukarinen E, Cañal MJ, Weckwerth W. A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNA s, small RNA s, and proteins from plants and microorganisms. *Plant J*; 2014; 79(1):173-80.
- 29.Dutta P, Prasad P, Indoilya Y, Gautam N, Kumar A, Sahu V, et al. Unveiling the molecular mechanisms of arsenic tolerance and resilience in the primitive bryophyte *Marchantia polymorpha* L. *Environ Pollut*; 2024;346:123506.
- 30.Ji MK, Kabra AN, Choi J, Hwang JH, Kim JR, Abou-Shanab RAI, et al. Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*. *Ecol Eng*; 2014;73:260-9.
- 31.Li C, Li P, Fu H, Chen J, Ye M, Zhai S, et al. A comparative study of the accumulation and detoxification of copper and zinc in *Chlamydomonas reinhardtii*: The role of extracellular polymeric substances. *Sci Total Environ*; 2023;871:161995.
- 32.Zhou Y, Cui X, Wu B, Wang Z, Liu Y, Ren T, et al. Microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their roles in cultivation, biomass harvesting, and bioproducts extraction. *Bioresour Technol*; 2024;406:131054.
- 33.Fabrello J, Ciscato M, Moschin E, Vecchia FD, Moro I, Matozzo V. Can BPA Analogs Affect Cellular and Biochemical Responses in the Microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin? *J Xenobiotics*; 2023;13(3):479-91.
- 34.Fabrello J, Dalla Fontana M, Gaiani N, Ciscato M, Roverso M, Bogialli S, et al. Assessing the Effects of a Diet of BPA Analogue-Exposed Microalgae in the Clam *Ruditapes philippinarum*. *J Xenobiotics*; 2024;14(3):1221-37.
- 35.Bellini E, Bandoni E, Giardini S, Sorce C, Spanò C, Bottega S, et al. Glutathione and phytochelatin jointly allow intracellular and extracellular detoxification of cadmium in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Environ Exp Bot*; 2023;209:105303.
- 36.Fang J, Uchiumi T, Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Takazaki S, et al. Dihydro-orotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction. *Biosci Rep*; 2013;33(2):e00021.
- 37.Khutornenko AA, Dalina AA, Chernyak BV, Chumakov PM, Evstafieva AG. The Role of Dihydroorotate Dehydrogenase in Apoptosis Induction in Response to Inhibition of the Mitochondrial Respiratory Chain Complex III. *Acta Naturae*; 2014;6(1):69-75.
- 38.Shi ZZ, Jin X, Li WT, Tao H, Song SJ, Fan ZW, et al. Dihydroorotate dehydrogenase promotes cell proliferation and suppresses cell death in esophageal squamous cell carcinoma and colorectal carcinoma. *Transl Cancer Res*; 2023;12(9):2294-307.

39. Lemasters JJ. Evolution of Voltage-Dependent Anion Channel Function: From Molecular Sieve to Governor to Actuator of Ferroptosis. *Front Oncol*; 2017;7:303.
40. Varughese JT, Buchanan SK, Pitt AS. The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease. *Cells*; 2021;10(7):1737.