

LA CITOMETRIA DE FLUJO COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO TOXICO DE DIFERENTES CONTAMINANTES SOBRE MICROALGAS

Angeles Cid, Dolores Franqueira, Miguel Orosa y Enrique Torres
Area de Microbiología. Departamento de Biología Celular e Molecular.
Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña.

Citometría de flujo es un término general que hace referencia a una medida rápida de partículas que se mueven en un flujo. Esta técnica fue diseñada para la valoración de una o más propiedades de células individuales en suspensión, de forma secuencial en el tiempo. La información se obtiene a través del uso de varias propiedades ópticas de las partículas, de un rango de tamaño entre 1 y 150 μm . Los aparatos diseñados para estas mediciones provocan el paso consecutivo de células individuales suspendidas en un fluido apropiado a través de una zona delimitada de análisis, donde se lleva a cabo este análisis a medida que la célula atraviesa dicha zona (Shapiro, 1995).

Los sistemas básicos de citometría de flujo son, por una parte, aquellos que determinan el volumen de las células en suspensión por medición de pulsos de resistividad (ej. contadores de partículas tipo Coulter Counter) y, por otra, los que llevan a cabo un análisis óptico (dispersión de la luz, absorción, fluorescencia, polarización,...) de las células; en éstos, y en instrumentos posteriores, las partículas van en un flujo y son iluminadas por una intensa fuente de luz (lámpara de mercurio, láser,...). La fluorescencia y/o la luz dispersada 90° son detectadas por fotomultiplicadores, mientras que la luz dispersada en el ángulo anterior (“forward angle light scatter”, FALS, o también “forward scatter”, FSC),

que es función del tamaño celular, es detectada por un fotodiodo. El uso de láseres permite la selección de una longitud de onda específica a elevadas intensidades, lo que maximiza la emisión fluorescente.

La citometría de flujo por activación mediante láser, desarrollada en un principio para fines biomédicos, comenzó a utilizarse en la investigación de los sistemas acuáticos en la década de los 80. Hasta el momento se ha aplicado con resultados satisfactorios en estudios citoquímicos, dinámica del ciclo celular y ecología del fitoplancton (Yentsch & Pomponi, 1986; Yentsch & Horan, 1989).

Además de los cromóforos naturales (clorofilas, ficobiliproteínas, piridinas, luciferina, flavinas, NADP y NADPH), una amplia gama de tinciones, la mayoría de ellas vitales, se han convertido en instrumentos habituales para el estudio de cualquier organismo, y en particular de los microorganismos (Haugland, 1996).

La citometría de flujo es una técnica que presenta indudables ventajas, como son la rapidez de análisis (entre 5.000 y 10.000 células por segundo), la capacidad de medidas multiparamétricas y el gran tamaño de la población analizada. Aunque también presenta inconvenientes, tales como el requerimiento de equipos especiales y la necesidad de tener las células individualizadas y en suspensión.

La medida simultánea de múltiples parámetros de células individuales proporciona información sobre la correlación entre ellos. La determinación por citometría de flujo de los constituyentes celulares, como las distribuciones de ADN, el contenido de antígenos celulares o el análisis de pigmentos naturales como clorofilas o ficobiliproteínas, se lleva a cabo rutinariamente desde hace algunos años, además de medidas biofísicas de volumen celular eléctrico u óptico (FSC) y la granularidad óptica (SSC), utilizados adicionalmente para la caracterización celular.

Estas medidas son útiles en muchos casos, pero no permiten seguir los cambios funcionales de las células, como pueden ser los cambios en el pH intracelular, en la excitación celular o en la producción de energía. Debemos tener en cuenta que las células en general, y las microalgas en particular, reaccionan ante determinadas condiciones ambientales

mediante cambios en sus propias funciones y no necesariamente mediante cambios en sus constituyentes. Así pues, el conocimiento de los constituyentes no describe con demasiada precisión el estado de las células.

La determinación de las funciones celulares o fisiológicas ha sido difícil y limitada hasta hace poco tiempo ya que en este tipo de estudios se utilizaban microelectrodos que habían de ser introducidos en las células individuales, por ejemplo en el estudio del potencial de membrana o las medidas de pH intracelular. Las técnicas de citometría de flujo presentan importantes ventajas con respecto a los ensayos bioquímicos convencionales de actividades enzimáticas, particularmente porque las células pueden ser analizadas bajo condiciones cercanas a las condiciones *in vivo*.

Las microalgas fitoplanctónicas, tanto marinas como dulceacuícolas, son en su mayoría unicelulares y rara vez miden más de unas pocas decenas de micrómetros de diámetro, lo que las hace unas candidatas perfectas para ser fácilmente analizadas en los equipos comerciales de citometría de flujo. Estos microorganismos presentan una fuerte fluorescencia natural procedente de la clorofila y de otros pigmentos, como las ficobiliproteínas y carotenoides, de manera que pueden ser fácilmente discriminadas de otras partículas presentes (bacterias, detritus).

El concepto básico para la determinación por citometría de flujo de parámetros funcionales de microalgas es determinar la fluorescencia de la clorofila por encima de los 600 nm, simultáneamente a la fluorescencia de las tinciones funcionales por debajo de 600 nm. En el caso de la excitación UV entre 350 y 370 nm, la emisión fluorescente será recogida entre 390 y 500 nm. Cuando la fluorescencia natural se produce en el mismo canal que el fluorocromo funcional, este colorante, dada su brillantez, todavía puede darnos información: la fluorescencia natural de cada grupo celular de la muestra control sin teñir debe ser sustraída de la fluorescencia observada en el mismo grupo celular pero en la muestra teñida.

Los ensayos funcionales o fisiológicos celulares se llevan a cabo fácilmente mediante esta técnica. Después de la adición de un fluorocromo o un cóctel de fluorocromos existe un tiempo de incubación, que oscila entre 1 y varios minutos. En la mayoría de los casos, las células pueden ser analizadas inmediatamente después de la incubación, pero en algunos casos es necesaria una centrifugación seguida de una resuspensión en tampón o medio de cultivo sin teñir, con el fin de disminuir la concentración extracelular de fluorocromo y, por tanto, el ruido de fondo que dificultaría el análisis.

Los efectos citotóxicos de los contaminantes acuáticos sobre las microalgas son muy variados y dependen en gran medida de las condiciones ambientales y de la especie ensayada. Diferentes análisis por citometría de flujo se han aplicado en nuestro laboratorio al estudio de diferentes microalgas, tanto marinas como dulceacuícolas. Hablaremos aquí del estudio del efecto tóxico de un metal pesado esencial, el cobre, sobre una diatomea marina, *Phaeodactylum tricorutum*, y también del estudio del efecto citotóxico de un herbicida ampliamente utilizado como es el paraquat, sobre una clorofita dulceacuícola, *Chlamydomonas eugametos*. En estos estudios se ha utilizado un citómetro analizador comercial FACScan (Becton Dickinson) equipado con un láser de excitación de ion argón (488 nm). Los parámetros analizados por citometría de flujo han sido: volumen celular, fluorescencia de la clorofila *a*, viabilidad celular, pH intracelular, actividad peroxidasa y potenciales de membrana plasmática y mitocondrial. El estudio de algunos de estos parámetros requiere la utilización de diferentes fluorocromos específicos, con una emisión fluorescente estable tanto en agua dulce como en el agua de mar.

VOLUMEN CELULAR

Existen abundantes referencias en la literatura que confirman la correlación entre el volumen celular y la señal del FSC, de manera que en la actualidad esta relación no se discute y se está utilizando por ejemplo

para diferenciación de tamaños celulares en muestras naturales (Veldhuis *et al.*, 1997).

Nuestros estudios demostraron que elevadas concentraciones de cobre y de paraquat provocan variaciones del volumen celular de las dos microalgas estudiadas después de 96 horas de exposición (Figs. 1 y 2). El desplazamiento de los histogramas a lo largo del eje de las X indica estas variaciones del volumen celular. En el caso de *P. tricornutum*, se observa que una concentración de cobre en el medio de 1 mg l^{-1} provoca un aumento del volumen celular después de 96 horas de cultivo en presencia de este metal (Fig. 1). Algunos metales pesados provocan un aumento de volumen de aquellas células afectadas, detectado en la mayoría de los casos mediante microscopía, tanto electrónica como óptica (Stauber & Florence, 1987; Bolaños *et al.*, 1992), si bien ya se había detectado por citometría de flujo para otra microalga marina, *Dunaliella tertiolecta* (Abalde *et al.*, 1995).

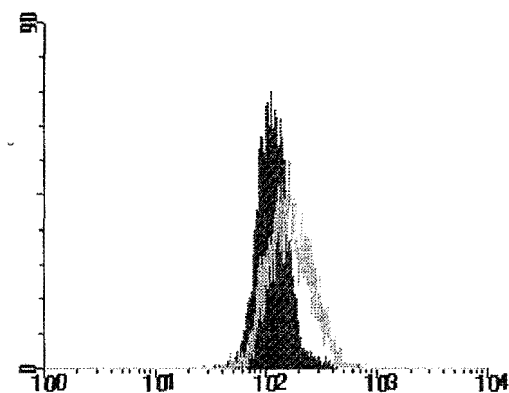


Figura 1. Histogramas de la señal de FSC (relacionada con el volumen celular) de cultivos control (histograma sólido) y cultivos con 1 mg l^{-1} de cobre de *Phaeodactylum tricornutum* después de 96 horas de tratamiento.

En cuanto al efecto de una concentración de paraquat 0.60 μM sobre el volumen de *C. eugametos*, se produce una respuesta más variable que en el caso anterior (Fig. 2): gran parte de las células presentan un incremento de volumen con respecto a las células control, pero también existe una proporción de células que presentan un volumen menor. Esta proporción de células más pequeñas podría explicarse por la inhibición del crecimiento que presentan estos cultivos con 0.60 μM de paraquat (Franqueira *et al.*, 1999). Anteriormente se había descrito un incremento del volumen celular de microalgas dulceacuícolas como *Chlamydomonas*, debido a la formación de células palmeloides (Bray *et al.*, 1993).

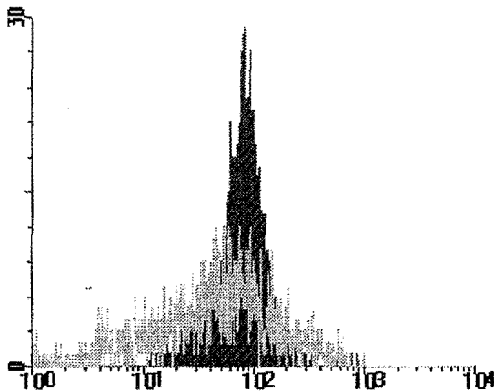


Figura 2. Histogramas de la señal de FSC (relacionada con el volumen celular) de cultivos control (histograma sólido) y cultivos con paraquat 0.60 μM de *Chlamydomonas eugametos* después de 96 horas de tratamiento.

Se ha observado que la diatomea marina *P. tricornutum* incrementa su volumen de forma inmediata (tan solo unos segundos después) como respuesta a la adición de concentraciones de cobre muy elevadas (10 y 20 mg l^{-1}) (Cid *et al.*, 1995b).

FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA A

La fluorescencia de la clorofila *a* es particularmente sensible al funcionamiento del fotosistema II (PS II) y es un buen indicador del estado fisiológico de este tipo de células fotoautotróficas (Cid *et al.*, 1995a, b). La fluorescencia de la clorofila *a* analizada en estos citómetros es la fluorescencia máxima cuando los centros de reacción del PS II están cerrados en el estado Q_A^- (Xu *et al.*, 1990). La inhibición del flujo de electrones en el centro de reacción del PS II del lado del donador provoca un descenso en la fluorescencia de la clorofila *a* (Overnell, 1975; Butler, 1977; Samson *et al.*, 1988), como sucede en las células de *C. eugametos* después de 96 horas de exposición a 0.60 μM de paraquat (Fig. 3). Sin embargo, cuando la inhibición se produce del lado del receptor, la fluorescencia aumenta (Overnell, 1975; Butler, 1977; Samson & Papovic, 1988). Los resultados obtenidos mediante el análisis por citometría de flujo de células de *P. tricornutum* expuestas durante 96 horas a 1 mg Cu l^{-1} (Fig. 4) mostraron que el efecto inhibitorio del cobre sobre el PS II está localizado en su lado oxidante, debido probablemente a que el cobre inactiva algunos centros de reacción del PS II como ya habían postulado otros autores (Samson & Papovic, 1988).

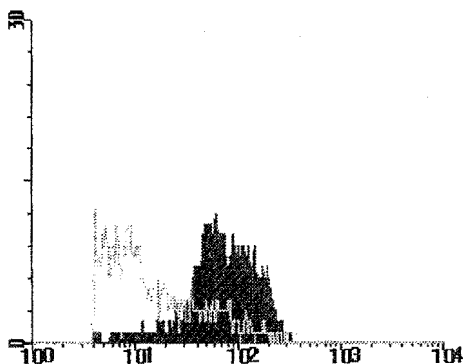


Figura 3. Histogramas de la fluorescencia de la clorofila *a* de cultivos de *Chlamydomonas eugametos* sin paraquat (cultivo control, histograma sólido) y con paraquat 0.60 μM , después de 96 horas de tratamiento.

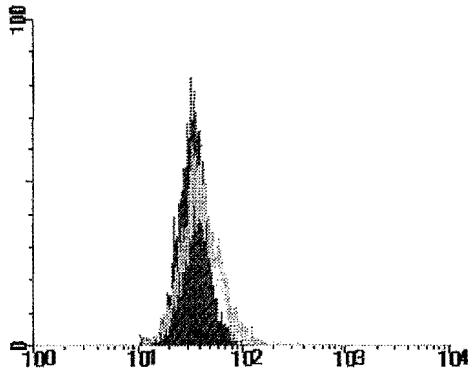


Figura 4. Histogramas de la fluorescencia de la clorofila *a* de cultivos de *Phaeodactylum tricornerum* sin cobre (cultivo control, histograma sólido) y con 1 mg l⁻¹ de cobre, después de 96 horas de tratamiento.

VIABILIDAD CELULAR

Se utilizó yoduro de propidio (IP), a una concentración final en la muestra de 60 μ M, para teñir los ácidos nucleicos de doble cadena de las células muertas: la fluorescencia de las células teñidas con yoduro de propidio se utilizó para estudiar la viabilidad celular. El IP es un fluorocromo que se intercala entre las dobles cadenas de ácidos nucleicos, dando una fluorescencia roja cuando se excita con luz azul. La molécula de yoduro de propidio es incapaz de atravesar la membrana celular intacta; sin embargo, cuando las células se mueren, la integridad de la membrana falla y dicha molécula puede entrar y teñir los ácidos nucleicos (Ormerod, 1990), formando un complejo fluorescente. En la figura 5 se presenta la evolución de la viabilidad celular de *P. tricornerum* expuesta a 1 mg l⁻¹ de cobre a distintos intervalos de tiempo. Después de 96 horas de exposición a 1 mg l⁻¹ de cobre, sólo el 8% de las células analizadas permanecen viables.

Esta medida de la viabilidad celular se utilizó en el estudio de todos los parámetros determinados por citometría de flujo, de modo que sólo se analizaban aquellas células que no presentaban fluorescencia del yoduro de propidio, es decir, sólo se analizan aquellas células que permanecen viables, a pesar de estar expuestas al cobre o al paraquat. Son células alteradas pero viables, al menos en el momento del análisis.

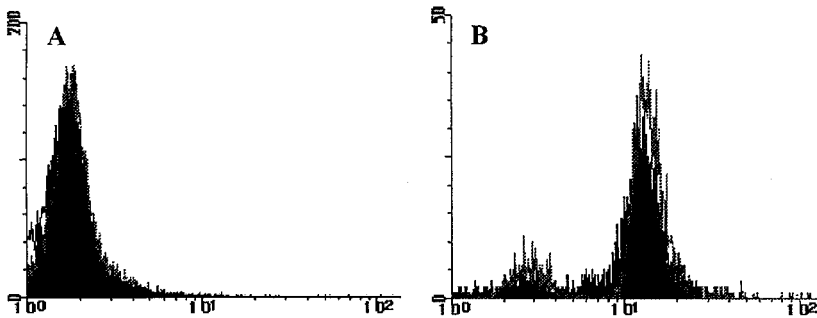


Figura 5 . Histogramas de fluorescencia de células de *Phaeodactylum tricorutum* teñidas con yoduro de propidio expuestas a 1 mg l⁻¹ de cobre, después de 8 y 96 horas de tratamiento (A y B respectivamente).

En el estudio del efecto del paraquat sobre la microalga *C. eugametos* también se utilizó esta técnica de citometría para medir la viabilidad celular después de 96 horas de exposición al herbicida paraquat. Después de 96 horas de exposición a una concentración de 0.60 μ M de paraquat, el porcentaje de células viables es del 38%.

ACTIVIDAD PEROXIDASA

Los sustratos fluorogénicos de la peroxidasa, como la hidroetidina, se convierten enzimáticamente en productos altamente fluorescentes en presencia de peróxido de hidrógeno (Watson *et al.*, 1990). El dihidroetidio o hidroetidina (HE) es un fluoróforo químicamente reducido. La HE en el citoplasma tiene fluorescencia azul, pero combinada con radicales

oxidantes (peróxido o superóxido), la peroxidasa la oxida dando etidio que es un producto fluorescente rojo (Haugland, 1996). La concentración final de HE en la alícuota de cultivo era de 10.3 μM . Después de 72 horas de exposición al cobre, las células de *P. tricorutum* mostraron un aumento en su actividad peroxidasa comparado con las células control (Fig. 6).

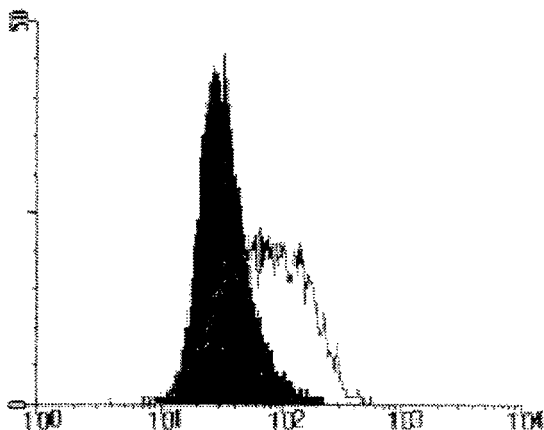


Figura 6 . Histogramas de fluorescencia de células de *Phaeodactylum tricorutum* teñidas con hidroetidina (relacionado con la actividad peroxidasa) en cultivos control (histograma sólido) y cultivos expuestos a 1 mg l⁻¹ de cobre, después de 96 horas de tratamiento.

Cuando la actividad peroxidasa aumenta, disminuye la viabilidad celular, lo que indica que la actividad peroxidasa detectada por citometría de flujo está relacionada con la pérdida de la integridad de la membrana celular, lo que conduce a la muerte de la célula (Cid *et al.*, 1996).

pH INTRACELULAR

El protocolo elegido para la determinación de la variación del pH intracelular se basa en la intensidad de la fluorescencia emitida por un derivado de la fluoresceína, el 2'-7'-diclorofluorescina (DCF), ya que esta

intensidad de emisión es pH-dependiente, es decir, a mayor pH mayor intensidad y viceversa. La concentración final de DCF en la muestra fue 20 μM y su emisión fluorescente está dentro de la banda del verde.

Inmediatamente después de la adición de elevadas concentraciones de cobre en el medio se produce un aumento del pH intracelular como se aprecia en los histogramas, en el caso de *P. triornutum* (Fig. 7).

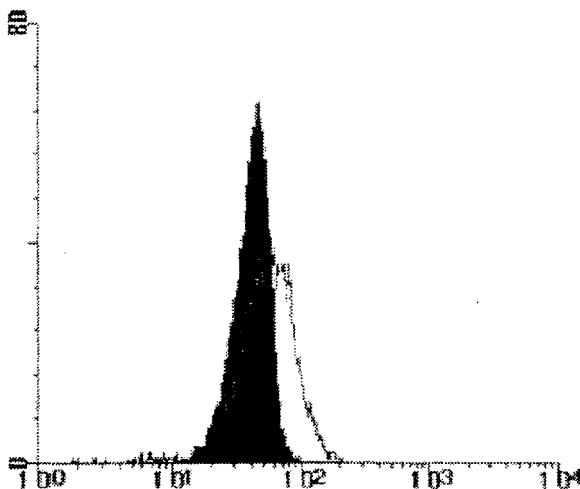


Figura 7 . Histogramas de fluorescencia de células de *Phaeodactylum triornutum* teñidas con diclorofluoresceína (relacionado con el pH intracelular) en cultivos control (histograma sólido) y cultivos expuestos a 1 mg l^{-1} de cobre, después de 96 horas de tratamiento.

Este aumento del pH_i provocó importantes cambios en el patrón de pigmentos fotosintéticos de esta microalga (Cid *et al.*, 1995a): una elevada proporción de clorofila *a* se oxida, transformándose en su alómero, a causa de este aumento del pH_i.

POTENCIAL DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICA Y MITOCONDRIAL

Los fluorocromos utilizados en el análisis del potencial de membrana son lipofílicos para poder atravesar las bicapas lipídicas, y presentan carga positiva mientras que la cara interna de la membrana celular y mitocondrial presenta carga negativa. Después de alcanzar el equilibrio en la distribución de una sonda:

- si se produce una despolarización (descenso de la diferencia de potencial), el fluorocromo es enviado hacia el medio, mientras que
- si se produce una hiperpolarización (aumento de la diferencia de potencial) se produce una entrada masiva de fluorocromo hacia el interior de la célula o la mitocondria.

Los fluorocromos utilizados fueron la 3,3'-dihexiloxocarbocianina (DiOC₆(3)) para los cambios en el potencial de membrana citoplasmática, y la rodamina 123 (R123) para la membrana mitocondrial.

La adición al medio de elevadas concentraciones de cobre provoca un incremento inmediato del potencial de membrana citoplasmático, tal y como se aprecia en la figura (Fig. 8).

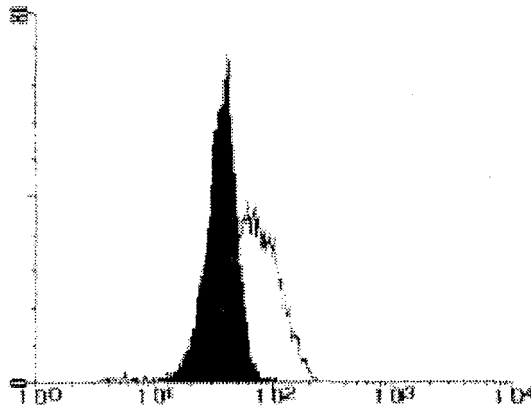


Figura 8. Histogramas de fluorescencia de células de *Phaeodactylum tricorutum* teñidas con DiOC₆(3) (relacionado con el potencial de membrana citoplasmática) en cultivos control (histograma sólido) y cultivos expuestos a 1 mg l⁻¹ de cobre, después de 96 horas de tratamiento.

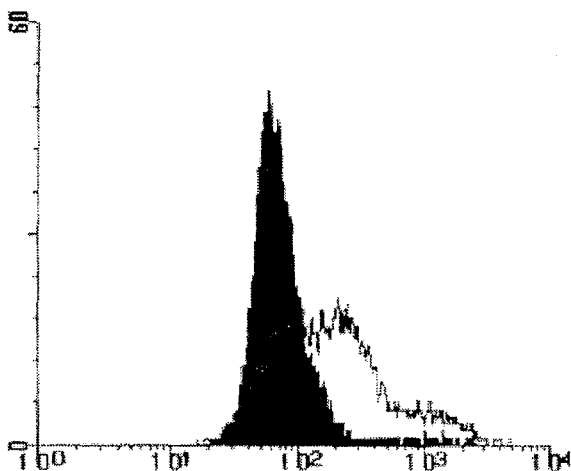


Figura 9. Histogramas de fluorescencia de células de *Phaeodactylum tricornerum* teñidas con rodamina 123 (relacionado con el potencial de membrana mitocondrial) en cultivos control (histograma sólido) y cultivos expuestos a 1 mg l^{-1} de cobre, después de 96 horas de tratamiento.

La acumulación de R123 en las mitocondrias también demostró un aumento del potencial de membrana mitocondrial en células de *P. tricornerum* expuestas a 1 ppm de cobre durante 48 horas (Fig. 9).

Los resultados aquí mostrados, así como la constante aparición de fluorocromos en el mercado con un increíble potencial de utilización en todo tipo de microorganismos, demuestran que la citometría de flujo es una herramienta eficaz en los estudios ecotoxicológicos con microalgas, permitiendo el estudio rápido y fácil de diferentes aspectos del comportamiento celular que serían difíciles de determinar mediante otras técnicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., A. Cid, S. Reiriz, E. Torres & C. Herrero (1995) Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to copper toxicity in short time experiments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 317-324.
- Bolaños, L., M. García-González, P. Mateo & I. Bonilla (1992) Differential toxicological response to cadmium in *Anabaena* strain PCC 7119 grown with NO₃⁻ or NH₄⁺ as nitrogen source. *J. Plant Physiol.* 140: 345-349.
- Bray, D.F., J.R. Bagu & K. Nakamura (1993) Ultrastructure of *Chlamydomonas reinhardtii* following exposure to paraquat: comparison of wild type and a paraquat-resistant mutant. *Can. J. Bot.* 71: 174-182.
- Butler, W.L. (1977) Chlorophyll fluorescence as a probe for electron transfer and energy transfer. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series, editado por Trebst, A. & M. Avron. Berlin, Springer Verlag. 5: pp. 149-167.
- Cid, A., P. Fidalgo, C. Herrero & J. Abalde (1995a) Flow cytometry determination of acute physiological changes in a marine diatom stressed by copper. *Microbiología SEM* 11: 455-460.
- Franqueira, D., A. Cid, E. Torres, M. Orosa & C. Herrero. 1999. A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular responses in the alga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to herbicide paraquat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (en prensa).
- Cid, A., C. Herrero, E. Torres & J. Abalde (1995b) Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicol.* 31: 165-174.
- Haugland, R.P. (1996) *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon,.

- Ormerod, M.G. (1990) Analysis of DNA. General methods. En: Flow Cytometry. A Practical Approach., editado por Ormerod, M.G. Oxford, Oxford University Press: pp. 69-87.
- Overnell, J. (1975) The effects of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. Mar. Biol. 29: 99-103.
- Samson, G. & R. Papovic (1988) Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 16: 272-278.
- Stauber, J.L. & T.M. Florence (1987) Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. Mar. Biol. 511: 511-519.
- Shapiro, H.M. (1995) Practical Flow Cytometry. 3ª edición. Willey-Lyss Inc., New York,.
- Veldhuis, M.J.W., T.L. Cucci & M.E. Sieracki (1997) Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications. J. Phycol. 33: 527-541.
- Watson, J.V., C. Dive & P. Workman (1990) Measurement of dynamic cellular events. En: Flow Cytometry. A Practical Approach., editado por Ormerod, M.G. Oxford, Oxford University Press: pp. 241-264.
- Xu, C., J. Auger & Govindjee (1990) Chlorophyll a fluorescence measurements of isolated spinach thylakoids obtained by using single-laser-based flow cytometry. Cytometry 11: 349-358.
- Yentsch, C.M. & P.K. Horan (1989) Cytometry in the Aquatic Sciences. Cytometry 10: 497-499.
- Yentsch, C.M. & S.A. Pomponi (1986) Automated individual cell analysis in aquatic research. Int. Rev. Cytol. 105: 183-243.