




UNIVERSIDAD DE A CORUÑA
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Microbiología



Alteraciones en la fisiología
celular de *Chlamydomonas*
reinhardtii expuesta a estrés
por calor



Iria López Amenedo
A Coruña, 2014



UNIVERSIDAD DE A CORUÑA
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Microbiología

Dña. **Carmen Rioboo Blanco**, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña,

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Máster, titulado “Alteraciones en la fisiología celular de *Chlamydomonas reinhardtii* expuesta a estrés por calor” y presentado por la licenciada **Iria López Amenedo**, ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas para obtener el Máster de Biología Molecular, Celular y Genética, por lo que autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firma la presente certificación en A Coruña a 18 de Julio de 2014.

Carmen Rioboo Blanco

Agradecimientos

Me gustaría expresar mis agradecimientos a todos los que, de una forma u otra, han colaborado en la realización de este trabajo.

A todos los doctores del área de microbiología de la facultad, en especial a mi tutora Carmen Rioboo por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y por su ayuda fundamental e incondicional.

A todos los compañeros del laboratorio por su ayuda, su ánimo y sus consejos.

A mis amigos, por todos los momentos de desconexión y por poder contar con ellos en cualquier ocasión.

Y por supuesto, a mi familia, por apoyarme y por creer en mí en todo momento, en especial a mi madre porque sin ella probablemente me habría rendido en el primer tropiezo.

1. Introducción.....	2
2. Objetivos.....	6
3. Materiales y métodos.....	7
3.1. Descripción de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard.....	7
3.2. Cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
3.3. Análisis mediante citometría de flujo.....	8
3.3.1. Determinación de la densidad celular.....	9
3.3.2. Análisis del tamaño y autofluorescencia de la clorofila a.....	9
3.3.3. Análisis de viabilidad celular.....	10
3.3.4. Análisis de la actividad celular.....	10
3.3.5. Análisis del estrés oxidativo.....	12
3.3.6. Determinación del potencial de membrana citoplasmática.....	12
3.3.7. Análisis de la concentración de Ca ⁺² libre intracelular.....	13
3.3.8. Análisis de la actividad caspasa.....	14
3.3.9. Análisis del ciclo celular.....	15
3.4. Análisis de la condensación de cromatina.....	16
3.5. Diseño experimental.....	16
3.6. Preparación de la solución concentrada de ABA.....	18
3.7. Análisis estadísticos.....	18
4. Resultados y discusión.....	19
4.1. Crecimiento y viabilidad celular.....	19
4.2. Tamaño y autofluorescencia de la clorofila a.....	22
4.3. Potencial de membrana citoplasmática, niveles de Ca ⁺² intracelular, estrés oxidativo y actividad celular.....	24
4.4. Ciclo celular, condensación de cromatina y actividad caspasa.....	31
5. Conclusiones.....	40
6. Bibliografía.....	41
Abreviaturas.....	49

1. Introducción

Las potenciales consecuencias del calentamiento global y del cambio climático son en la actualidad una de las principales preocupaciones del mundo científico, y han convertido en los últimos años al estrés por calor en el objetivo de numerosas investigaciones. Debido a las importantes repercusiones económicas que este estrés abiótico puede tener sobre la productividad agrícola y forestal, casi todos los estudios se han llevado a cabo en plantas superiores de interés agronómico o en especies modelo, como *Arabidopsis thaliana*. En la naturaleza, las plantas, al ser organismos sésiles, están sujetas a importantes variaciones de temperatura, tanto durante el transcurso de los días como durante los cambios estacionales. Con el fin de prevenir y reparar los daños celulares causados por los cambios súbitos de temperatura, las plantas, al igual que otros organismos, han desarrollado una serie de estrategias para percibir dichos cambios, activando respuestas defensivas apropiadas. Entre ellas ocupa un lugar preeminente la síntesis de proteínas con actividad chaperona molecular, las denominadas proteínas de estrés por calor o choque térmico (HSP; *heat-shock proteins*). Estas proteínas han sido descritas en todos los organismos estudiados hasta la fecha y se clasifican en varias familias de acuerdo a su peso molecular (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40). Además, cabe destacar la familia de proteínas de estrés térmico pequeñas (sHSP; *small heat-shock proteins*), chaperonas moleculares que se sintetizan de forma predominante en plantas, pero no en otros eucariotas (Howarth y Ougham, 1993). Si bien su mecanismo de acción se conoce de forma incompleta, estas proteínas están implicadas en la protección frente a estrés térmico mediante la estabilización de proteínas y membranas, interaccionando con proteínas desnaturalizadas total o parcialmente y promoviendo su correcto plegamiento y ensamblaje.

Sin embargo, a pesar de la ubicuidad de esta respuesta, los mecanismos implicados en la detección y señalización celular de un aumento de la temperatura por parte de la planta, así como los compartimentos celulares donde se produce dicha percepción, han sido todavía muy poco estudiados (Mittler *et al.*, 2012). A este respecto, investigaciones recientes en plantas superiores atribuyen a la membrana citoplasmática un papel importante en la percepción del estrés por calor (Saidi *et al.*, 2009). Según el modelo propuesto, la exposición a altas temperaturas modificaría la fluidez de la membrana plasmática, activando los canales de entrada de Ca^{+2} y, con ello, la liberación de este ión en el citosol donde es conocido su papel como mensajero secundario en la transducción de señales (Liu *et al.*, 2008; Saidi *et al.*, 2010). Por otro lado, otros autores también apuntan a que esta respuesta puede estar mediada por la

acumulación activa de especies reactivas de oxígeno (ROS), tal y como ya se ha apuntado frente a otros tipos de estrés ambiental, como el estrés salino (Zuppini *et al.*, 2009). De hecho, se ha comprobado que el estrés oxidativo induce la síntesis de HSPs en plantas (Desikan *et al.*, 2001; Hihara *et al.*, 2001), lo que sugiere una interrelación entre ambas respuestas de las células, frente al estrés por calor y por ROS.

Por último, está bien documentado que ciertas hormonas pueden tener un papel activo en la respuesta de la planta frente a diferentes factores de estrés. Una de las más estudiadas es el ácido abscísico (ABA). Esta hormona vegetal está presente en todas las plantas vasculares, donde la exposición a un estrés abiótico o biótico induce su síntesis y acumulación (Annamalai y Yanaghiara, 1999). En concreto, se ha observado que el ABA ejerce un papel modulador en la respuesta frente al estrés térmico, mejorando la supervivencia en cereales como el maíz (*Zea mays*) o en plantas de *Arabidopsis* sometidas a este estrés abiótico, lo que sugiere que esta hormona podría estar implicada en la señalización del estrés térmico (Gong *et al.*, 1998; Larkindale y Knight, 2002).

Si bien la mayoría de los estudios de investigación sobre estrés térmico en las plantas se han centrado en la respuesta mediada por las proteínas de estrés térmico (Howarth y Ougham, 1993; Gurley, 2000), en los últimos años se ha demostrado que el estrés por calor es uno de los factores ambientales que puede desencadenar la inducción de procesos de muerte celular programada (PCD, *programmed cell death*) en plantas (Zupinni *et al.*, 2006). La muerte celular programada es un proceso celular regulado genéticamente y definido por una secuencia regulada de eventos que está altamente conservado en metazoos, plantas y levaduras (Kroemer *et al.*, 1995). En plantas superiores, este proceso es esencial para el desarrollo y diferenciación de los tejidos. Además de este papel en los procesos normales de crecimiento de la planta, la muerte celular programada también puede inducirse como mecanismo de respuesta frente a diferentes factores bióticos o abióticos de estrés o en la respuesta de hipersensibilidad desencadenada frente a infecciones causadas por patógenos (Mittler y Cheung, 2004; Nooden, 2004; van Doorn y Woltering, 2005). En base a las diferentes características morfológicas y fisiológicas observadas en las células animales, se han intentado describir distintos tipos de muerte celular programada en plantas, concluyéndose que animales y plantas parecen tener características diferenciales propias (van Doorn *et al.*, 2001). Sin embargo, algunas características que evidencian morfológica y fisiológicamente la existencia de fenómenos de muerte celular programada como la fragmentación del ADN, el aumento de los niveles de calcio citosólico, la acumulación de

ROS y la activación de enzimas como las caspasas han sido descritas tanto en animales como en plantas (Hoeberichts y Woltering, 2003).

A la vista de lo expuesto, en el presente trabajo se plantea el estudio de la respuesta al estrés térmico en las células vegetales utilizando como modelo biológico una microalga dulceacuícola, *Chlamydomonas reinhardtii*. Debido a que también están expuestas a fluctuaciones ambientales, las microalgas deben hacer frente a situaciones de estrés en el medio mediante adaptaciones a nivel fisiológico y molecular, cuyo conocimiento ayudaría a profundizar en los mecanismos celulares de respuesta al estrés en los organismos eucariotas fotosintéticos (Zuppini *et al.*, 2010). La microalga seleccionada, *C. reinhardtii* (Chlorophyta), ha sido intensamente utilizada como modelo biológico en investigaciones sobre fotosíntesis, respiración, división celular, genotoxicidad frente a radiaciones y mutágenos, fitoremediación de metales, etc. y, más recientemente, como modelo de estudio de la respuesta frente a diferentes factores de estrés como el estrés osmótico o el oxidativo (Harris, 2001; Hanikenne, 2003; Hema *et al.*, 2007; Dimova *et al.*, 2008).

Dado que muchos de los parámetros analizados en este estudio han de estudiarse en condiciones fisiológicas *in vivo* en la célula (actividad celular, potenciales de membrana, niveles de Ca^{+2} y de ROS, ...), la citometría de flujo (CMF) se propone como la técnica ideal para este estudio, ya que es una técnica muy sensible que permite determinar un elevado número de propiedades y/o funciones de células individuales a gran velocidad, pudiendo utilizar una gran variedad de moléculas bioquímicamente específicas, no tóxicas y fluorescentes, en condiciones muy cercanas al estado *in vivo* (Carter & Meyer, 1990).

Estudios recientes han demostrado la existencia de PCD en los organismos unicelulares (Vardi *et al.*, 1999, Segovia *et al.*, 2003, Darehshourhi *et al.*, 2008) y, concretamente, en *C. reinhardtii* (Yordanova *et al.*, 2010; Zuo *et al.*, 2012). Por ello, este estudio se completa con varios marcadores morfológicos y fisiológicos de PCD como potencial mecanismo de respuesta frente al estrés por calor en esta especie.

Por último, también se estudia el posible papel del ABA exógeno en las alteraciones registradas en las células sometidas a estrés térmico mediante el tratamiento de los cultivos de *C. reinhardtii* con esta hormona vegetal. Esta hormona se ha encontrado en microalgas como *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella minutissima* y *Chlorella vulgaris*, donde la síntesis de ABA se induce bajo diferentes condiciones de estrés: por deficiencia de nitrógeno (Tominaga *et al.*, 1993), por estrés oxidativo (Kobayashi *et al.*, 1998), por estrés

lumínico (Stirk *et al.*, 2005) y por estrés por calor (Bajguz, 2009), respectivamente. Sin embargo, los datos sobre el papel fisiológico del ABA en la respuesta al estrés en microalgas son muy limitados.

2. Objetivos

El objetivo general del trabajo es evaluar las potenciales alteraciones en la fisiología celular de la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* como respuesta a un estrés por calor. Este objetivo se aborda desde dos estrategias:

1.- El estudio comparativo del efecto de la exposición de *C. reinhardtii* a dos temperaturas, 20°C y 41°C, mediante el análisis de distintos parámetros celulares mediante CMF como el crecimiento, viabilidad celular, tamaño y autofluorescencia de la clorofila *a*, actividad celular, estrés oxidativo, calcio intracelular, potencial de membrana citoplasmática y actividad caspasa. Por último, se analiza la población subG0 por CMF y la morfología de núcleos (condensación de cromatina) como parámetros indicadores de daño a nivel del ADN.

2.- El estudio del potencial papel de la hormona vegetal ABA en la respuesta de *C. reinhardtii* ante este estrés ambiental mediante el previo tratamiento con ABA de los cultivos microalgales antes de su exposición a las dos temperaturas ensayadas, analizando potenciales cambios en las alteraciones fisiológicas producidas por la exposición a estrés por calor en *C. reinhardtii* cuando la microalga ha sido cultivada en presencia de esta hormona.

3.1. Descripción de *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard)

La especie utilizada en el presente estudio es la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard). La cepa utilizada (CCAP 11/32A mt+) se ha obtenido de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP; *Culture Collection of Algae and Protozoa*) del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido). El género *Chlamydomonas* se incluye en la división *Chlorophyta*, y dentro de ésta se encuadra en la clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales* y familia *Chlamydomonadaceae* (Bold y Wynne, 1985).

Las células de *Chlamydomonas* tienen forma ovoide, elipsoidal o esférica, con un tamaño comprendido entre los 9 y 12 μm de longitud y entre 4 y 8 μm de diámetro (Fig. 3.1.1). La estructura corporal es claramente polar, con dos flagelos situados en el polo anterior de la célula y un único cloroplasto en forma de copa que ocupa la mayor parte del espacio intracelular y que contiene uno o más pirenoides. El cloroplasto suele rodear al núcleo que está situado en el centro y tiene un nucleólo prominente (García y Roselló, 1998).

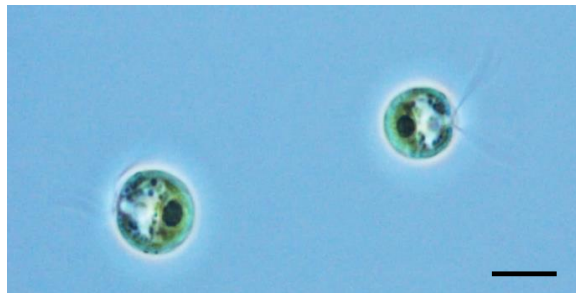


Figura 3.1.1. Células de *Chlamydomonas reinhardtii*. La barra indica 5 μm . La imagen fue tomada con un microscopio Nikon Eclipse E400.

Alrededor del núcleo suele estar el aparato de Golgi y alrededor de este último suele estar un sáculo de retículo endoplasmático que conecta con la membrana plasmática. También es frecuente encontrar vacuolas contráctiles en el polo anterior de la célula y mitocondrias entre el cloroplasto y el plasmalema. Las células están rodeadas por una pared, excepto en la zona donde emergen los flagelos, compuesta sólo de glicoproteínas fibrosas.

Chlamydomonas se reproduce tanto asexual como sexualmente. Para evitar la reproducción sexual en este trabajo solo se utilizaron células de mating +. El género *Chlamydomonas* es muy amplio y tiene una amplia distribución (aguas dulces, hábitats

marinos, suelos, etc.). Su similitud fisiológica y metabólica con las células vegetales de las plantas superiores ha hecho de *Chlamydomonas* un importante modelo para la investigación biológica.

3.2. Cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Los cultivos de *C. reinhardtii* se realizan en medio Tris-acetato-fosfato (TAP; *Tris-acetate-phosphate*) (Gorman y Levine, 1965; Harris, 2009) con algunas modificaciones, como la ausencia de una fuente orgánica de carbono en el medio y la utilización de nitrato como fuente de nitrógeno. A esta solución de macronutrientes se le añaden una solución de oligoelementos (Algal-1, Nutrición Avanzada S.A.) en condiciones de esterilidad. El medio de cultivo se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 min, así como todo el material utilizado en el estudio.

Los cultivos de mantenimiento se llevan a cabo en matraces *Pyrex* de 1 l, a partir de los cuales se tomarán los inóculos para cada experiencia, y se mantienen en una cámara de temperatura controlada y constante a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y con una iluminación de $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W, aplicada con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los cultivos se mantienen en condiciones axénicas, sin aireación y en agitación constante a 150 r.p.m. mediante agitadores orbitales para evitar que las células sedimenten y que se formen gradientes de luz y/o nutrientes.

3.3 Análisis mediante citometría de flujo

Los análisis mediante citometría de flujo de las células de *C. reinhardtii* se realizan en un citómetro Gallios (Beckman Coulter Inc.) equipado con dos láseres de excitación como fuente de luz, uno que emite a 488 nm y otro a 633 nm. Este citómetro presenta detectores de la luz refractada en el ángulo anterior (forward light scatter, FS), parámetro proporcional al tamaño de la célula, y de la luz refractada en el ángulo lateral (side light scatter, SS), parámetro proporcional a la complejidad intracelular. Además presenta cuatro detectores de fluorescencia en función de la longitud de onda: FL1 (fluorescencia verde, 505-545 nm), FL2 (fluorescencia amarilla, 560-590 nm), FL3 (fluorescencia anaranjada, 605-635 nm) y FL4 (fluorescencia roja, 660-700 nm). Los datos se recogen en forma de un listado numérico (archivo *listmode*) y se analizan utilizando el programa Gallios (versión 1.1; Beckman Coulter Inc.) que proporciona los parámetros estadísticos de las distribuciones de los valores obtenidos. Por lo menos se analizan 10.000 células por muestra. Todos los experimentos de citometría de flujo se realizaron dos veces y sendos duplicados de las muestras se analizaron

en el citómetro de flujo, con células incubadas con el fluorocromo de interés así como con células sin teñir. El láser de excitación a 488 nm (luz azul) se utilizó como fuente de iluminación para todos los parámetros ensayados.

Antes de los ensayos, se optimizaron las concentraciones y las condiciones de incubación para cada fluorocromo con el fin de obtener la tinción significativa del 100% de las células analizadas sin afectar a su viabilidad ni a su autofluorescencia basal.

3.3.1. Determinación de la densidad celular

La densidad celular (células ml⁻¹) de los cultivos se determina mediante recuento en el citómetro de flujo del número de células microalgales presentes en cada uno de los cultivos. Para ello, se utiliza una suspensión de concentración conocida de fluoroesferas de calibrado, *Flow-Count Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc.). Estas fluoroesferas presentan un rango de emisión de fluorescencia entre 525 nm y 700 nm cuando se excitan a 488 nm.

Las tasas de crecimiento para cada tiempo y tratamiento ensayado (T.C.), expresadas en día⁻¹, se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$T.C. = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t-t_0)$$

dónde (t₀) y (t) son el tiempo inicial y final del periodo estudiado, ambos expresados en días, y (N_t) y (N₀) el número de células ml⁻¹ en esos tiempos.

3.3.2. Análisis del tamaño y autofluorescencia de la clorofila *a*

Para el análisis del tamaño celular y la autofluorescencia de la clorofila *a* de *C. reinhardtii* mediante CMF, se preparan suspensiones celulares de cada cultivo en tubos de citometría de poliestireno de 12 x 75 mm a una densidad final de 2 x 10⁵ células ml⁻¹ en tampón fosfato salino (PBS; *phosphate buffered saline*) estéril. Los dos parámetros se analizan en modo logarítmico, calculándose la media de intensidad de fluorescencia (u. a., unidad arbitraria) para la población celular identificada en el histograma mediante el programa del equipo utilizado.

Tamaño celular

Las medidas se recogen en el detector que recoge la luz dispersada del láser entre 1 y 20° respecto al haz, así obtenemos la luz refractada en el ángulo anterior (*forward scatter light*, FS), que es proporcional al tamaño o volumen celular (Mullaney *et al.*, 1969).

Autofluorescencia de la clorofila *a*

C. reinhardtii emite *in vivo* fluorescencia natural debido a la presencia de clorofila *a* y de otros pigmentos accesorios. La fluorescencia de la clorofila *a* se excita con luz a 488 nm y emite en el rango de 680-720 nm, por lo que la autofluorescencia microalgal es recogida en el detector FL4.

3.3.3. Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad de las células de *C. reinhardtii* expuestas a los distintos tratamientos se analiza mediante CMF empleando un fluorocromo ampliamente utilizado, el yoduro de propidio (IP) (PI; *propidium iodide*). Este fluorocromo se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos de doble cadena emitiendo fluorescencia en el espectro del rojo cuando se excita con luz azul (488 nm). El IP no es capaz de penetrar en las células viables de modo que sólo penetra en aquellas células dañadas que tienen alterada la integridad de la membrana citoplasmática, anclándose en los ácidos nucleicos (Carter y Meyer, 1990). De este modo, el IP puede ser usado para discriminar entre células viables no fluorescentes (IP-) y células no viables fluorescentes (IP+) mediante el análisis por CMF.

La emisión de fluorescencia del IP se analiza en el detector FL3 (605-635 nm) en escala logarítmica. Se preparan suspensiones celulares a una densidad final de 2×10^5 células ml^{-1} en tampón PBS estéril y se incuban con una concentración final de IP de $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (a partir de una solución concentrada de 1 mg ml^{-1} en PBS, guardada a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Después de 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizan en el citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células viables no fluorescentes (IP-) con respecto al total de células analizadas.

3.3.4. Análisis de la actividad celular

Para el estudio de la actividad esterasa inespecífica como medida de la actividad celular *in vivo* de las células de *C. reinhardtii*, se han llevado a cabo ensayos cinéticos, *in*

fluxo, basados en la generación de fluorescencia derivada de la hidrólisis enzimática del compuesto fluorogénico diacetato de fluoresceína (Lage *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2009).

El diacetato de fluoresceína (DAF) (FDA; *fluorescein diacetate*) es un éster no polar, no fluorescente y lipofílico que penetra libremente en las células vivas, atravesando las membranas celulares. Tras entrar en las células, esterasas no específicas citoplasmáticas hidrolizan los enlaces éster, perdiendo así los residuos acetato. La fluoresceína libre resultante es una molécula polar, hidrofílica, altamente fluorescente (excitable a 488 nm y con una emisión de fluorescencia máxima en torno a los 518 nm) y es retenida por las células anclada en el citoplasma cuando la membrana plasmática está intacta. En este caso, la ausencia de fluorescencia verde de la fluoresceína, en células viables con la membrana celular intacta, indicaría efectos tóxicos sobre la actividad de las esterasas, que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula. De este modo, analizando si existen diferencias en la fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas (DAF+), se pueden detectar posibles alteraciones de la actividad celular y observar si los tratamientos afectan a la vitalidad de las células.

La fluorescencia del DAF se analiza en el citómetro de flujo en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Mediante citogramas biparamétricos, se analiza el incremento de la fluorescencia verde de la fluoresceína (FL1 log; eje y), a lo largo del tiempo de incubación (eje x). Se preparan suspensiones celulares con un volumen final de 2 ml y una densidad de 2×10^5 células ml^{-1} y se analizan en el citómetro sin tinción durante 15 s para ajustar la línea base de autofluorescencia verde de las células. Tras este periodo de tiempo se detiene la adquisición y, rápidamente, se añade el volumen necesario de DAF para obtener una concentración final de $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ (a partir de una solución concentrada de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ en DMSO, guardada a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A continuación se reanuda la adquisición y se estudian los cambios en el detector FL1 frente al tiempo hasta que la fluorescencia se estabiliza.

Por último, para calcular la actividad metabólica de las células de *C. reinhardtii*, se obtienen las medias de fluorescencia (u. a.) de la fluoresceína para diferentes tiempos de incubación, definiendo en cada citograma regiones rectangulares sobre el eje tiempo de base un número canal y de altura todo el eje y. Las tasas máximas de generación de fluorescencia verde intracelular de *C. reinhardtii* tras la adición de DAF se calculan representando para cada citograma los valores medios de fluorescencia verde recogida en el detector FL1 obtenidos frente al tiempo, desde que se añade el fluorocromo hasta que la señal de fluorescencia empieza a estabilizarse; luego se ajusta la curva obtenida a una función

polinomial lineal con un coeficiente de R^2 superior a 0,99; así obtenemos la ecuación de la recta y podemos calcular la pendiente, que es asimilable a la tasa máxima de generación de fluorescencia verde y, por lo tanto, a la actividad esterasa inespecífica de las células microalgales. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia por unidad de tiempo (u. a. min^{-1}). La fluorescencia del FDA puede verse afectada por cambios en el volumen celular (Agustí *et al.*, 1998), de modo que, para evitar esta variabilidad debida a posibles diferencias en el tamaño celular y la concentración intracelular del fluorocromo, se utiliza la relación entre la fluorescencia recogida en FL1 y el tamaño celular (FS).

3.3.5. Análisis del estrés oxidativo

En el presente trabajo se estudia el nivel intracelular del ión superóxido (O_2^-) como medida del estrés oxidativo en las células de *C. reinhardtii* utilizando el fluorocromo hidroetidina (HE; *hydroethidine*). El HE difunde a través de las membranas celulares y sufre oxidación por iones superóxido formando etidio, que se intercala en el ADN y queda retenido en el interior celular (Benov *et al.*, 1998).

La fluorescencia del HE se analiza en el CMF en el detector FL3 (605-635 nm) en escala logarítmica, ya que cuando el etidio se excita a 488 nm, tiene una emisión de fluorescencia máxima en torno a 605 nm. Las suspensiones celulares (2×10^5 células ml^{-1}) se incuban durante 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente en presencia de una concentración final de HE de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (a partir de una solución concentrada de 1 mg ml^{-1} en DMSO, guardada a -20°C) antes de su análisis en el citómetro de flujo.

Los resultados se obtienen como la media de la fluorescencia (u. a.) de la o las poblaciones analizadas. Finalmente, para calcular los niveles de ión superóxido independientemente del tamaño de las células y de la variabilidad en la concentración intracelular del fluorocromo, los resultados se expresan como la relación entre la fluorescencia naranja (FL3) emitida por el fluorocromo y el tamaño celular (FS).

3.3.6. Determinación del potencial de membrana citoplasmática

El desarrollo de pruebas indicadoras sensibles al potencial de membrana citoplasmático es esencial para estudiar este parámetro fisiológico en células de pequeño tamaño, como las células de *C. reinhardtii*, donde es difícil el uso de microelectrodos. Una molécula lipofílica cargada puede servir como un indicador del potencial de membrana ya que se espera que el reparto entre el interior celular y el medio cumpla la ecuación de Nernst

(Rabinovitch y June, 1990). El indicador utilizado en este trabajo, bis-(1,3-ácido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol (*bis-(1,3-dibutylbarbituric acid trimethine oxanol*; DiBAC₄(3)), pertenece a la familia de los fluorocromos derivados del oxonol. Se trata de un indicador de respuesta lenta aniónico, cuya concentración celular aumenta a medida que el potencial de membrana baja hacia cero y disminuye si la célula se hiperpolariza, i.e., el citosol se vuelve más electronegativo con respecto al medio.

El DiBAC₄(3) es una molécula aniónica que penetra en la célula con mayor facilidad a través de membranas celulares relativamente despolarizadas donde es retenida por unión a lípidos y proteínas intracelulares. La carga negativa del fluorocromo provoca su exclusión de la mitocondria, cuyo potencial de membrana es altamente negativo, lo que reduce este componente de la fluorescencia total y simplifica la medida del potencial de membrana en eucariotas (Klapperstuck *et al.*, 2009).

La fluorescencia del DiBAC₄(3) se analiza en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Suspensiones de *C. reinhardtii* (2×10^5 células ml⁻¹) se incuban con una concentración final fluorocromo de 0,5 µg ml⁻¹ (a partir de una solución concentrada de 1 mg ml⁻¹ en DMSO, guardada a -20 °C) durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se procede al análisis de las muestras en el citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células despolarizadas (DiBAC₄(3)+) con respecto al total de células analizadas.

3.3.7. Análisis de la concentración de Ca⁺² libre intracelular

El desarrollo de quelantes de calcio fluorescentes ha permitido una medida fiable de este ión en células de pequeño tamaño (Tsien *et al.*, 1982), y el descubrimiento de moléculas de este tipo cada vez más selectivas y altamente fluorescentes ha abierto las puertas a la aplicación de la CMF para el estudio del calcio intracelular (Gryniewicz *et al.*, 1985). El fluorocromo seleccionado para este estudio ha sido el Calcium Green-1 acetoximetil éster (Calcium Green-1 AM). Se trata de un indicador muy sensible a los cambios en la concentración de Ca⁺². El Calcium Green-1 AM atraviesa la membrana citoplasmática y, una vez dentro de la célula, esterasas inespecíficas rompen la molécula dando lugar a Calcium Green, una molécula fluorescente que, al ser excitada a 488 nm, emite fluorescencia con un máximo a 530 nm, fluorescencia que se multiplica tras su unión a iones Ca⁺².

La fluorescencia del Calcium Green se recoge en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Para el proceso de tinción, se preparan suspensiones celulares de *C. reinhardtii* (2×10^5 células ml^{-1}), utilizándose una concentración final de fluorocromo de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (a partir de una solución concentrada de 2 mg ml^{-1} en DMSO, guardada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$) con un tiempo de incubación de 2 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y en oscuridad, para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) de la población analizada. Finalmente, para calcular los niveles de Ca^{+2} intracelular independientemente del tamaño de las células y de la variabilidad en la concentración intracelular del fluorocromo, los resultados se expresan como la relación entre la fluorescencia verde (FL1) emitida por el fluorocromo y el tamaño celular (FS).

3.3.8. Análisis de la actividad caspasa

Para detectar la potencial presencia de actividad caspasa en las células de *C. reinhardtii* sometidas a los diferentes tratamientos, se ha utilizado el *CellEvent Caspase -3/7 Green kit* (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo consta de un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD), denominado *Caspase-3/7 Green*, conjugado con una molécula fluorescente con capacidad de unión a ácidos nucleicos. La presencia del péptido bloquea la unión del marcador fluorescente al ADN celular, pero la activación de las caspasas 3 y 7 provoca la escisión del péptido y la consiguiente liberación de la molécula fluorescente. Esto permite al fluorocromo unirse al ADN y producir una señal fluorescente dependiente de la actividad de estas enzimas que puede ser analizada en el citómetro de flujo con un máximo de absorción /emisión de 502/530nm.

La fluorescencia de dicho marcador fluorescente se recoge en el citómetro de flujo en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Para proceder al marcaje de las suspensiones celulares (2×10^5 células ml^{-1}), éstas se incuban con el reactivo *Caspase -3/7 Green* siguiendo el protocolo del fabricante. Después de 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizan en el citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células con actividad caspasa (caspasa+) con respecto al total de células analizadas.

3.3.9. Análisis del ciclo celular

El análisis de ADN fue una de las primeras aplicaciones de la CMF y, todavía hoy en día es una de las más utilizadas para el estudio del ciclo celular (Ormerod, 1990). Todos los métodos desarrollados utilizan fluorocromos que se unen específica y estequiométricamente a los ácidos nucleicos y cuya fluorescencia se acentúa tras la unión. El utilizado en este estudio es el IP, cuyas propiedades espectrales ya citamos. Debido a que este fluorocromo se une a ácidos nucleicos de doble cadena, tanto al ADN como al ARN de doble cadena, simultáneamente a la tinción, las células se incuban con enzima ribonucleasa con el fin de digerir las moléculas de ARN.

Este análisis del contenido de ADN nuclear nos da información sobre el porcentaje de células de un tejido o cultivo en las diferentes fases del ciclo celular (subG0, G1, S, G2 o M) (Olson *et al.*, 1986; Lemaire *et al.*, 1999). En el presente estudio se ha analizado el porcentaje de células cuyos núcleos presentan un contenido en ADN 1n (en fase G1), y 2n y 4n (en fase G2). También se ha analizado el porcentaje de células cuyos núcleos presentan un contenido en ADN inferior al observado en células 1n (subG0), lo que indica la pérdida de contenido nuclear (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

Se retiran 10^6 células por centrifugación a 8.000 r.p.m. durante 10 min y a 4 °C. Las células se resuspenden en 300 μ l de tampón PBS (pH 7,2), y se fijan con etanol frío al 70% (v/v), durante 2 h, a 4 °C y en oscuridad. Esta fijación alcohólica desnaturaliza las proteínas y solubiliza los fosfolípidos permeabilizando la membrana celular.

Para su análisis en el citómetro de flujo, las células se someten a dos ciclos de lavado con tampón PBS. Finalmente, las células se resuspenden en 1 ml de la solución de tinción preparada en PBS. Dicha solución contiene: 10 μ g ml^{-1} IP, 100 μ g ml^{-1} RNasa A y 0,1% triton X-100. Se incuban las muestras durante 30 min, a 37 °C y oscuridad. Durante este proceso las muestras se agitan varias veces para mantener las células en suspensión y facilitar la actuación de la enzima. A continuación, se procede al análisis de las muestras en el citómetro de flujo, donde la fluorescencia del IP se registra en el detector FL3 (605-635 nm) en escala lineal.

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células con núcleos con contenido de ADN subG0, 1n, 2n y 4n, con respecto al total de células analizadas.

3.4. Análisis de la condensación de cromatina mediante microscopía de fluorescencia

Con el fin de detectar cambios en la morfología del núcleo de las células de *C. reinhardtii* se llevó a cabo la tinción de las células con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 4',6-Diamidino-2-Phenylindole).

El DAPI se une a regiones ricas en AT de la doble hélice de ADN. Se retiran 5×10^6 células por centrifugación y se resuspenden en 1 ml de tampón PBS pH 7,2 estéril. A continuación, se incuban a una concentración final de DAPI de $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ (a partir de una solución concentrada de 5 mg ml^{-1} en DMSO) durante 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, estas suspensiones celulares se embeben en agarosa con bajo punto de fusión (LMA) al 0,7% (p/v) para observación al microscopio. Los portaobjetos preparados se examinaron con una ampliación 400 x en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 (Nikon Instruments Europe BV) equipado con una lámpara de mercurio y utilizando un filtro de excitación UV-2A (330-380 nm) y un filtro de paso de banda (BP-420 nm) para detectar la emisión de fluorescencia del DAPI. Se analizaron cien células por cultivo al azar (50 células por portaobjetos), contando el número de células que mostró condensación de la cromatina (DAPI+). Las fotografías fueron tomadas con una cámara refrigerada de alta resolución Nikon DS-5MC y las imágenes fueron tratadas con el software de imágenes Nis-Elements (versión 2.2; Nikon Instruments Europe BV).

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células con núcleos que presentan condensación de cromatina (DAPI+) con respecto al total de células analizadas.

3.5. Diseño experimental

Para evaluar los potenciales efectos del estrés por calor en las células de *C. reinhardtii*, cultivos de esta microalga se sometieron a una temperatura de 41°C durante 90 minutos. Para todas las experiencias, los cultivos se establecieron a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial y se preparan en matraces de 100 ml conteniendo 20 ml de cultivo a una densidad inicial de 2×10^5 células ml^{-1} . Tras 24 h en la cámara de cultivo, estos cultivos se someten a dos temperaturas diferentes en baños termostatzados: cultivos sometidos a 20°C , realizados como controles negativos, y cultivos sometidos a 41°C , como controles positivos con el fin de provocar un estrés por calor en las células de *C. reinhardtii*. Esta temperatura representa el óptimo para inducir la respuesta a estrés por calor en *C. reinhardtii* (Gerloff-Elias *et al.*, 2006). Ambos tratamientos se mantienen durante 90 min. Finalmente, los cultivos se mantienen durante 24 h en la cámara de cultivo, tiempo suficiente para que se

produzca un ciclo completo de luz-oscuridad, bajo las mismas condiciones controladas de medio de cultivo, luz y temperatura ya descritas (Fig. 3.5.1).

Con el fin de estudiar el potencial efecto de la hormona vegetal ABA sobre las células de *C. reinhardtii*, se llevaron a cabo cultivos en paralelo a los anteriormente descritos con la única diferencia de la presencia de esta hormona en el medio de cultivo. Para ello, a partir del mismo inóculo en fase de crecimiento exponencial se prepararon cultivos expuestos a una concentración final de 200 μM de ABA. Dichos cultivos se manipularon del mismo modo que los arriba citados siguiendo el desarrollo experimental descrito para su exposición a calor. Previamente, se llevaron a cabo ensayos para descartar el potencial efecto del DMSO adicionado a los cultivos como solvente del ABA sobre los tratamientos y parámetros analizados en *C. reinhardtii*. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración final de 0,01% (v/v) de DMSO utilizada no presenta ningún efecto significativo sobre los efectos del estrés por calor en comparación con lo observado en las células no tratadas con DMSO. De este modo, cualquier potencial efecto de sinergia o de inhibición (estimulador o inhibidor) entre la temperatura y el ABA observado en el presente estudio se deberá únicamente a la presencia de dicha hormona en los cultivos.

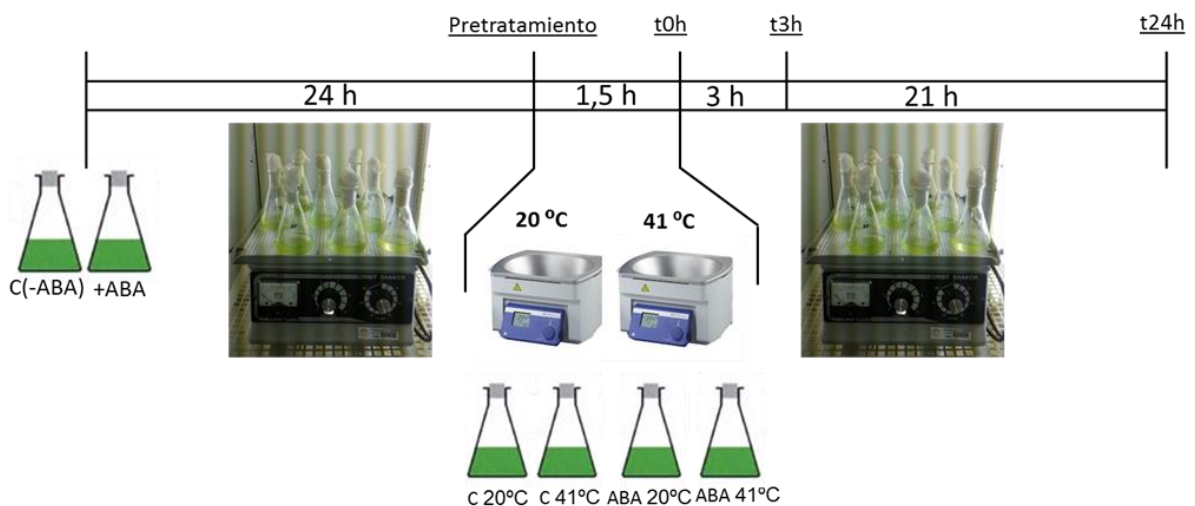


Figura 3.5.1. Diseño experimental desarrollado en el presente estudio. Los cultivo iniciales, tratados con y sin ABA, se mantienen 24 h en la cámara de cultivo. A continuación se someten en baños termostatzados a dos temperaturas (20⁰C y 41⁰C) durante 90 min. Finalmente, los cultivos se mantienen durante 24 h en la cámara de cultivo. Los análisis se realizan antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a estrés térmico.

Durante este trabajo, los cultivos expuestos a 20⁰C y no tratados con ABA se referencian como controles 20⁰C (C 20⁰C) y los cultivos expuestos a 41⁰C y no tratados con ABA se referencian como controles 41⁰C (C 41⁰C). Del mismo modo, los cultivos expuestos

a 20⁰C y tratados con ABA se referencian como ABA 20⁰C y los cultivos expuestos a 41⁰C y tratados con ABA se referencian como ABA41⁰C. En todos los casos se realizaron tres réplicas de cada tratamiento.

Para la realización de los diferentes análisis, se recogieron varias alícuotas de cada uno de los cultivos a diferentes tiempos: previamente a la exposición al estrés (pretratamiento), inmediatamente después de la exposición al calor (tiempo 0 h) y transcurridas 3 y 24 h desde la exposición (tiempo 3 h y 24 h, respectivamente).

3.6. Preparación de solución concentrada de ABA

Para evaluar el potencial papel del ABA en la respuesta de las células a estrés por calor, se utiliza un estándar de esta hormona comercializado en polvo por Sigma-Aldrich (referencia Sigma A1049). Antes de cada experiencia, se prepara *de novo* una solución concentrada de ABA (2 M) disolviendo la hormona en DMSO (dimetilsulfóxido). La concentración final ensayada de ABA en los cultivos de *C. reinhardtii* ha sido 200 µM (Yoshida *et al.*, 2003).

3.7. Análisis estadístico

Para todos los parámetros analizados, se han calculado las medias y desviaciones estándar de cada tratamiento. Para el tratamiento estadístico de los datos se ha utilizado el programa IBM SSPS Static versión 21.0.0. En cada experiencia y para cada tiempo ensayado, se ha realizado un ANOVA de dos vías (“calor x ABA”) para estudiar la interacción entre ambos tratamientos y posteriormente un ANOVA de una vía (“calor” y “ABA”) para estudiar cada uno de los tratamientos de manera individual. En todos los análisis se han considerado los resultados como significativos si $p < 0,05$.

Las gráficas se han realizado con el paquete estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot (versión 9.0.)

4. Resultados y discusión

4.1. Crecimiento y viabilidad celular

El crecimiento de *C. reinhardtii*, analizado en base a las tasas de crecimiento, se ve afectado por el estrés térmico. Después de 24 h de la exposición al estrés por calor, los cultivos sometidos a 41⁰C presentan una tasa de crecimiento significativamente inferior a la observada en los cultivos incubados a 20⁰C, tal y como se muestra en la Tabla 4.1.1 (p<0,05).

Tabla 4.1.1. Tasa de crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii*, expresada en día⁻¹, calculada 24 h después de la exposición a 20⁰C y a 41⁰C, con y sin tratamiento con ABA. Los valores representan las medias de las réplicas para cada tratamiento \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA multifactorial; p<0,05).

Tratamiento	T.C. (días ⁻¹)
	24 h
C 20 ⁰ C	1,37 \pm 0.02 ^a
C 41 ⁰ C	0,68 \pm 0.06 ^b
ABA 20 ⁰ C	1,39 \pm 0.07 ^a
ABA 41 ⁰ C	1,13 \pm 0.01 ^c

En el caso de los cultivos tratados con la hormona vegetal ABA, la exposición a 41⁰C provoca un descenso significativo del crecimiento con respecto a los cultivos expuestos a 20⁰C de temperatura (p<0,05). Sin embargo, las tasas de crecimiento de los cultivos tratados con ABA y expuestos a 41⁰C (ABA 41⁰C) son significativamente superiores a las observadas en las cultivos expuestos a 41⁰C en ausencia de ABA (C 41⁰C), con valores de 1,13 \pm 0,01 día⁻¹ y 0,68 \pm 0,06 día⁻¹, respectivamente (Tabla 4.1.1)

La viabilidad celular de *C. reinhardtii*, analizada mediante CMF utilizando la tinción con IP, se ve afectada por la exposición de los cultivos a un estrés térmico (Fig. 4.1.1; p<0,05). En los cultivos sometidos a 41⁰C (C 41⁰C) se observa un descenso significativo en el porcentaje de células viables (IP-) con respecto a los valores obtenidos en los cultivos mantenidos a 20⁰C (C 20⁰C) (p<0,05). Este descenso de la viabilidad se detecta inmediatamente después de la exposición al calor (0 h), donde las células viables en los cultivos expuestos 20⁰C representan el 99,11 \pm 0,21 % de la población analizada frente al 93,50 \pm 0,13% de células viables registradas en los cultivos expuestos a 41⁰C. Transcurridas 3 y 24 h desde el estrés térmico, el porcentaje de las células viables de los cultivos sometidos a 41⁰C disminuye, representando el 62,59 \pm 2,17% y 56,65 \pm 3,91% de la población,

respectivamente, mientras que la viabilidad celular de los cultivos sometidos a 20⁰C presenta valores siempre superiores al 97% de células viables tanto a las 3 como a las 24 h de la exposición al estrés térmico (Fig. 4.1.1).

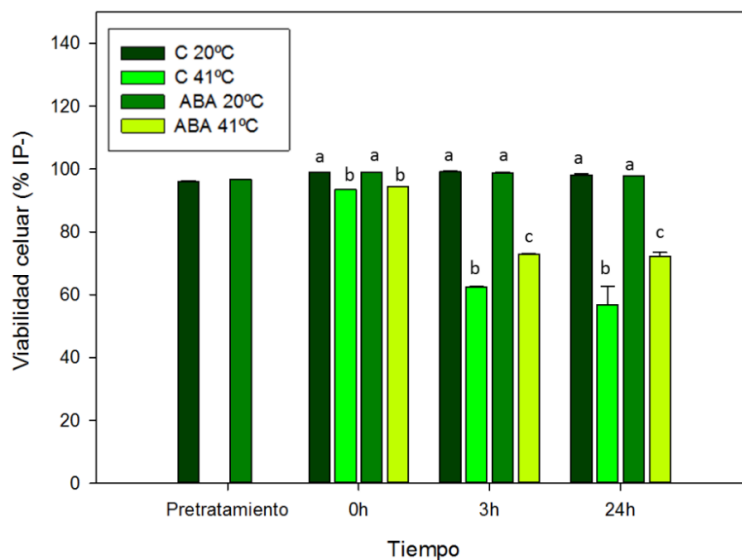


Figura 4.1.1. Viabilidad celular de *C. reinhardtii* a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a 20⁰C y a 41⁰C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan el porcentaje de células viables (IP-) con respecto al total de células analizadas. Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

En los cultivos tratados con ABA, también se observa un descenso significativo de la viabilidad celular de los cultivos expuestos a 41⁰C frente a los cultivos expuestos a 20⁰C para todos los tiempos ensayados (Fig. 4.1.1). Sin embargo, excepto a tiempo 0, los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en los cultivos tratados con ABA y expuestos a 41⁰C (ABA 41⁰C) son significativamente superiores a los observados en los cultivos sin ABA sometidos a la misma temperatura (C 41⁰C) ($p < 0,05$).

Los resultados muestran que la exposición a una temperatura elevada (41⁰C) durante un corto periodo de tiempo provoca un efecto negativo sobre el crecimiento y la viabilidad celular de la microalga *C. reinhardtii*. Otros estudios revelan que el estrés por calor inhibe el crecimiento en plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* y *Phragmites communis* (Vierling, 1991; Xue *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2010). Estos resultados concuerdan con lo observado en otra microalga del género *Chlamydomonas*. Gerloff-Elias *et al.* (2006) comprobaron que el crecimiento de *Chlamydomonas acidophila* disminuye a medida que la temperatura se incrementa a partir de 20⁰C, temperatura considerada la óptima para su

crecimiento. Sin embargo, la inhibición del crecimiento, en general, refleja un valor medio de la población estudiada sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular (Geoffroy *et al.*, 2007). Puesto que los cambios ambientales afectan directamente a las células, antes de que manifieste el efecto sobre la población, resulta conveniente la medida de parámetros a nivel de células individuales, lo que se consigue mediante CMF y la utilización de marcadores fluorescentes como el IP. Los resultados obtenidos en el presente trabajo reflejan que el estrés por calor provoca una rápida pérdida de viabilidad celular en *C. reinhardtii*, detectada inmediatamente después de la exposición de las células a 41°C de temperatura (Fig. 4.1.1).

Resultados similares se han descrito en estudios con otra microalga dulceacuícola, *Chlorella saccharophila*. Zuppini *et al.* (2007) observaron también que la exposición a temperaturas superiores a 40°C provoca una reducción de la viabilidad celular en los cultivos de esta microalga. Los datos obtenidos en el presente trabajo en base a la tinción con IP indican una severa pérdida de la funcionalidad e incluso de la integridad estructural de la membrana plasmática como consecuencia del estrés térmico y pueden explicar el descenso registrado en el crecimiento de *C. reinhardtii* después de 24 h del estrés por calor (Tabla 4.1.1), momento en que el porcentaje de células no viables representa cerca del 50% de la población.

En cuanto al potencial efecto de la hormona vegetal ABA sobre *C. reinhardtii*, cuando las células se mantienen a una temperatura óptima de crecimiento, 20°C, no se han observado diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados en el presente trabajo entre los cultivos de *C. reinhardtii* tratados con la hormona (ABA 20°C) y los no tratados con ABA (C 20°C). Este hecho sugiere que el ABA no ejerce ningún efecto detectable sobre la microalga en condiciones óptimas de temperatura. Por ello, desde ahora, la discusión del potencial efecto del ABA sobre *C. reinhardtii* sobre los diferentes parámetros analizados se centrará fundamentalmente en los resultados obtenidos bajo las condiciones inductoras de estrés térmico. En estas condiciones, el tratamiento con ABA (ABA 41°C) reduce el efecto negativo causado por el estrés térmico sobre la viabilidad celular de *C. reinhardtii* observándose también un mejor crecimiento en comparación con los cultivos sometidos al choque térmico en ausencia de ABA (C 41°C) (Fig. 4.1.1 y Tabla 4.1.1). Ding *et al.* (2010) también observaron que la viabilidad celular de *Phragmites communis* se ve afectada tras un estrés por calor. Además, comprobaron que al inhibir la síntesis del ABA en esta gramínea, las alteraciones causadas por el estrés por calor sobre la viabilidad eran más severas mientras

que la aplicación exógena de ABA en *P. communis* aliviaba los síntomas del estrés térmico en distintos ecotipos de la gramínea, en consonancia con lo observado en *C. reinhardtii* en este estudio. En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con ABA reduce el efecto negativo que provoca el estrés por calor sobre el crecimiento y la viabilidad celular de *C. reinhardtii*.

4.2. Tamaño celular y autofluorescencia de la clorofila *a*.

El tamaño celular y la autofluorescencia de la clorofila *a* de las células de *C. reinhardtii*, analizadas mediante CMF, se ven significativamente afectados por el estrés por calor, tal y como se refleja en la Figura 4.2.1.

En los cultivos de *C. reinhardtii* sometidos a 41⁰C de temperatura (C 41⁰C) se observa un descenso significativo en el tamaño celular con respecto a los valores obtenidos en los cultivos mantenidos a 20⁰C (C 20⁰C). Dicho descenso en el tamaño celular se detecta después de 3 h del choque térmico y se mantiene después de 24 h (Fig. 4.2.1; $p < 0,05$).

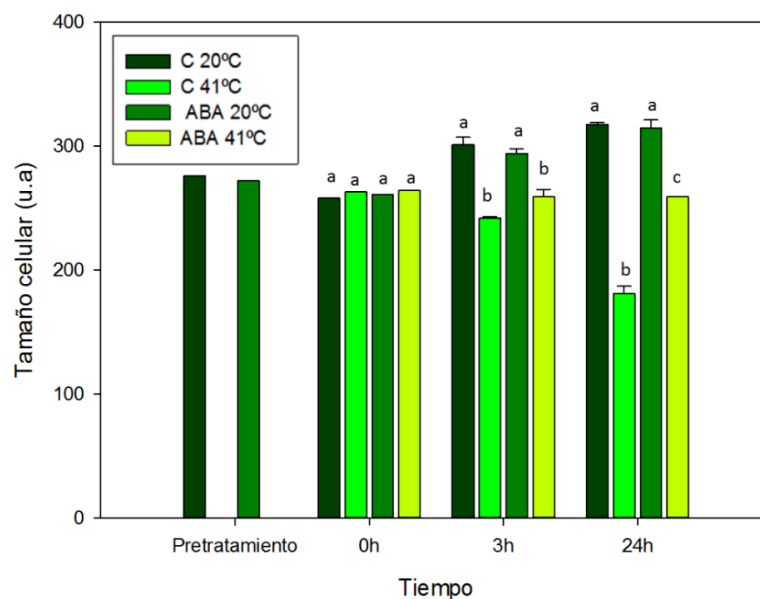


Figura 4.2.1. Tamaño celular de *C. reinhardtii* a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a 20⁰C y a 41⁰C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan la media obtenida por CMF expresada en unidades arbitrarias (u. a.). Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

En los cultivos tratados con ABA, también se observa un descenso significativo del tamaño celular de los cultivos expuestos a 41⁰C frente a los cultivos expuestos a 20⁰C de temperatura (Fig. 4.2.1; $p < 0,05$). Sin embargo, transcurridas 24 h de la exposición al estrés por calor, el tamaño de las células de *C. reinhardtii* es significativamente superior en los

cultivos tratados con ABA (ABA 41⁰C) que en los cultivos sin ABA sometidos a la misma temperatura (C 41⁰C) (Fig. 4.2.1; $p < 0,05$).

La autofluorescencia de la clorofila *a* en las células de *C. reinhardtii* también se ve significativamente afectada por la exposición a un estrés por calor, tal y como refleja la aparición de una población de células cloróticas en los cultivos sometidos a 41⁰C de temperatura (Fig. 4.2.2).

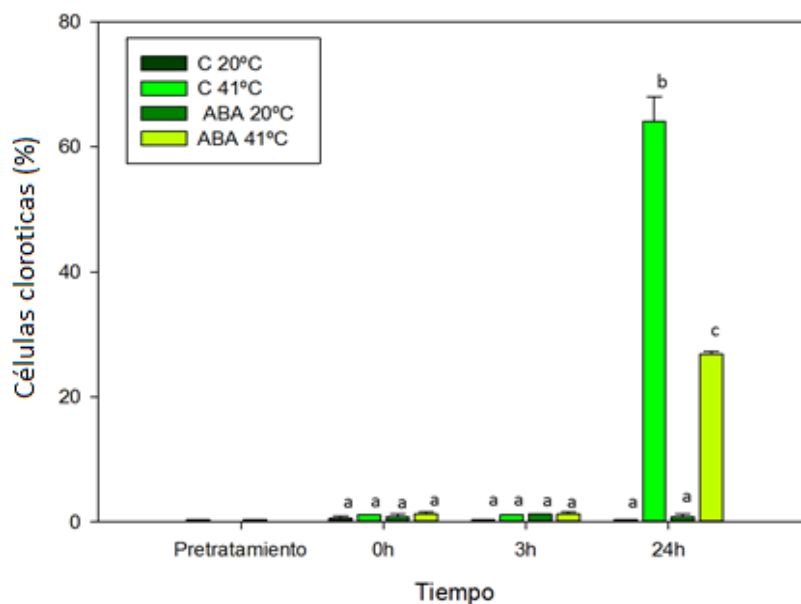


Figura 4.2.2. Población de células cloróticas en los cultivos de *C. reinhardtii* a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a 20⁰C y a 41⁰C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan el porcentaje de células cloróticas con respecto al total de células analizadas mediante CMF. Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

Dado que la técnica de la citometría de flujo permite el análisis por separado de diferentes poblaciones celulares, se ha llevado a cabo el análisis de los porcentajes de células pertenecientes a la población clorótica y a la no clorótica, caracterizándose la primera por una drástica pérdida de autofluorescencia de la clorofila *a*. Después de 24 h del estrés por calor, tal y como se observa en la Figura 4.2.2, el porcentaje de células cloróticas aumenta significativamente en los cultivos sometidos a 41⁰C, tanto en los tratados con ABA como en los no tratados (ABA 41⁰C y C 41⁰C, respectivamente) ($p < 0,05$). Sin embargo, en los cultivos tratados con ABA y expuestos a estrés por calor, el porcentaje de células cloróticas es significativamente menor que en los cultivos expuestos a 41⁰C y no tratado con esta hormona ($26,85 \pm 0,45$ % en los cultivos ABA 41⁰C frente a $64,05 \pm 2,45$ % en los cultivos C 41⁰C). (Fig. 4.2.2, $p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el estrés térmico provoca serias alteraciones en el tamaño celular y la autofluorescencia de la clorofila *a* en *C. reinhardtii*. El descenso registrado en el tamaño celular de *C. reinhardtii* como consecuencia de un estrés por calor podría deberse a la inhibición del crecimiento producida en estos cultivos (Tabla 4.1.1). Las células activas, antes de dividirse, aumentan su tamaño celular debido a la síntesis de orgánulos, proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas. Por ello, las células sometidas a estrés por calor, al tener inhibido su crecimiento, no experimentan un aumento en su tamaño, tal y como se ha observado en microalgas expuestas a otras condiciones citotóxicas (Rioboo *et al.*, 2009). Los cambios en la fluorescencia de la clorofila *a* se han utilizado para estudiar el estado fisiológico de células microalgales sometidas a diferentes factores de estrés ya que constituyen un buen indicador de la capacidad fotosintética de las células fotoautótrofas (Eullaffroy y Vernet, 2003; Sobrino *et al.*, 2004; González-Barreiro *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2009). En el presente trabajo, la exposición a estrés térmico induce fenómenos de clorosis en *C. reinhardtii* (Fig. 4.2.2). La aparición de células cloróticas en los cultivos sometidos a choque térmico puede ser debida a la pérdida de pigmentos fotosintéticos por la exposición a estrés por calor, tal y como se observa en estudios anteriores realizados con otra microalga, *Chlorella saccharophila*. Las células de esta microalga presentaron modificaciones en la estructura del cloroplasto y una reducción progresiva en el contenido de clorofila tras ser sometidas a estrés por calor (Zuppini *et al.*, 2007). La pérdida de clorofila *a* registrada en estos estudios con microalgas indicaría la existencia de graves alteraciones en el metabolismo fotosintético de las células vegetales como consecuencia de la exposición a un choque térmico.

De nuevo, los resultados obtenidos en los cultivos tratados con ABA sugieren la inducción de mecanismos de termotolerancia en las células microalgales cultivadas en presencia de esta hormona. En concreto, la menor incidencia de fenómenos de clorosis en las células de *C. reinhardtii* tratadas con ABA podría indicar la participación, directa o indirecta, de esta hormona en la estabilización de las membranas del cloroplasto cuando las células se someten a un estrés térmico.

4.3. Potencial de membrana citoplasmática, niveles de Ca^{+2} intracelular, estrés oxidativo (ROS) y actividad celular.

En el presente estudio se analizan las posibles alteraciones de la membrana citoplasmática de *C. reinhardtii* sometida a un estrés por calor utilizando la tinción con DIBAC₄(3). Los resultados obtenidos muestran que el estrés por calor afecta negativamente al potencial de

membrana citoplasmática en *C. reinhardtii*, provocando una despolarización de las células microalgales (Fig. 4.3.1). La exposición de *C. reinhardtii* a estrés térmico provoca un incremento significativo en el porcentaje de células despolarizadas en los cultivos expuestos a 41^oC de temperatura (C41^oC) con respecto a los cultivos expuestos a 20^oC (C 20^oC) (Fig. 4.3.1; p<0,05). Este aumento de la población de células despolarizadas se detecta inmediatamente después de la exposición al calor (0 h). Después de 24 h, en los cultivos expuestos 41^oC (C41^oC), el porcentaje de células despolarizadas representa el 69,51 ± 2,59 % de la población frente al 2,32 ± 0,83 % registrado en los cultivos mantenidos a 20^oC (C 20^oC) (Fig.4.3.1; p<0,05).

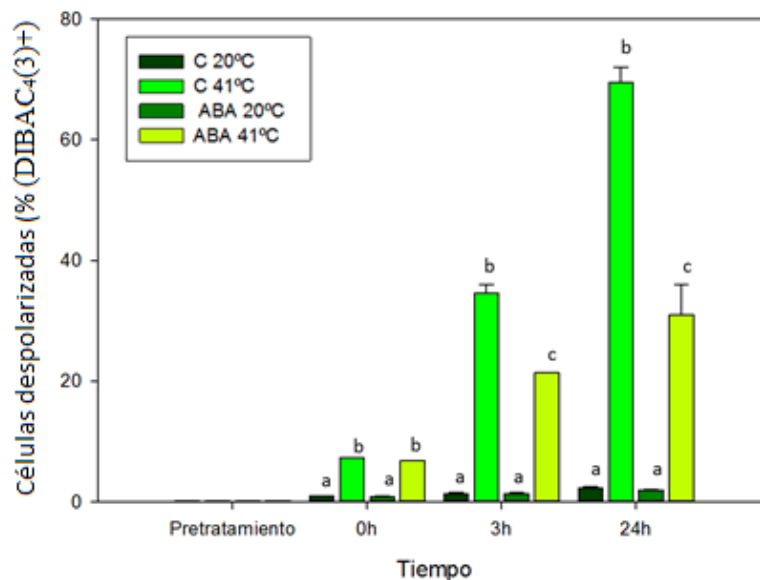


Figura 4.3.1. Población de células despolarizadas en los cultivos de *C. reinhardtii* a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a 20^oC y a 41^oC de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan el porcentaje de células despolarizadas (DIBAC₄(3)+) con respecto al total de células analizadas mediante CMF. Los valores expresan la media de las réplicas ± desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; p<0,05).

En los cultivos tratados con ABA, también se observa un incremento en el porcentaje de células despolarizadas en los cultivos expuestos a 41^oC (ABA 41^oC) con respecto a los cultivos mantenidos a 20^oC (ABA 20^oC) (Fig. 4.3.1). Sin embargo, excepto a tiempo 0, en los cultivos sometidos a estrés por calor, la población de células despolarizadas en los cultivos tratados con ABA (ABA 41^oC) presenta porcentajes significativamente inferiores a los observados en los cultivos no tratados con esta hormona (C 41^oC) (Fig. 4.3.1; p<0,05).

En cuanto al análisis de los niveles de Ca^{+2} intracelular, los datos obtenidos mediante CMF con el fluorocromo Calcium Green-1 AM muestran una respuesta homogénea de la población de *C. reinhardtii* sometida a estrés por calor, caracterizada por un aumento significativo de los niveles de Ca^{+2} en el interior celular en los cultivos expuestos a estrés por calor ($\text{C } 41^{\circ}\text{C}$) con respecto a los expuestos 20°C ($\text{C } 20^{\circ}\text{C}$). Dicho incremento se detecta únicamente después de la exposición de las células microalgales al estrés por calor (Fig. 4.3.2; $p < 0,05$). Después de 3 y 24 h desde el choque térmico, los datos no muestran diferencias significativas entre los niveles de calcio de los cultivos expuestos a 41°C ($\text{C } 41^{\circ}\text{C}$) y expuestos 20°C ($\text{C } 20^{\circ}\text{C}$) (Fig. 4.3.2; $p > 0,05$).

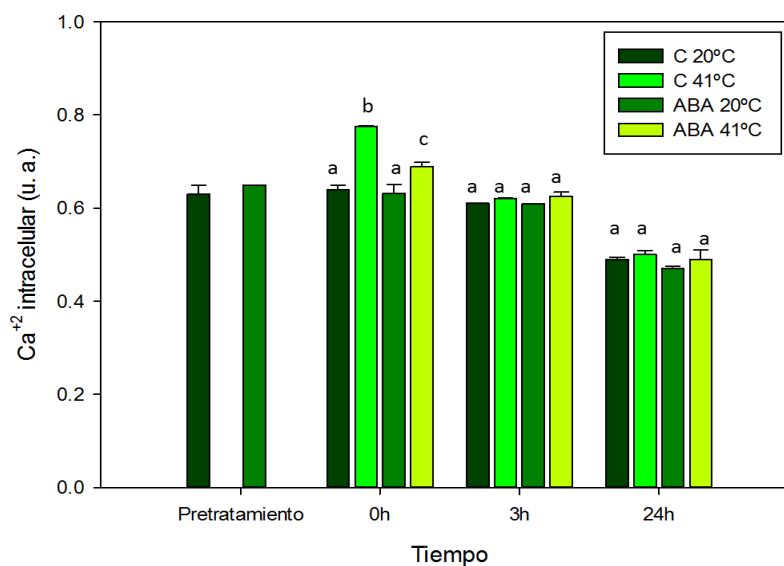


Figura 4.3.2. Niveles de Ca^{+2} intracelular de *C. reinhardtii* a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a 20°C y a 41°C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan la media de fluorescencia obtenida por CMF expresada en unidades arbitrarias (u. a.) y normalizada por el tamaño celular (FS). Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

En los cultivos tratados con ABA, también se observa un aumento significativo del nivel de Ca^{+2} intracelular en los cultivos expuestos a 41°C (ABA 41°C) frente a los cultivos expuestos a 20°C de temperatura (ABA 20°C) que se detecta inmediatamente después del estrés térmico (Fig. 4.3.2; $p < 0,05$). Sin embargo, en los cultivos sometidos a estrés por calor, el nivel de Ca^{+2} intracelular de las células de *C. reinhardtii* es significativamente inferior en los cultivos tratados con ABA (ABA 41°C) que en los cultivos sin ABA sometidos a la misma temperatura (C 41°C) (Fig. 4.3.2; $p > 0,05$).

En el presente estudio se han analizado los niveles intracelulares de ión superóxido (O_2^-) como medida de los niveles de ROS presentes en las células de *C. reinhardtii* con el fluorocromo HE mediante CMF. La exposición de los cultivos de *C. reinhardtii* a un estrés térmico afecta significativamente a los niveles de ión superóxido de las células de *C. reinhardtii* (Fig. 4.3.3; $p < 0,05$). Las células de los cultivos expuestos a $41^\circ C$ (C $41^\circ C$) presentan niveles de ROS significativamente superiores a los registrados en las células de los cultivos mantenidos a $20^\circ C$ (C $20^\circ C$). Este aumento significativo en los niveles del ión superóxido se detecta a todos los tiempos ensayados desde la exposición de *C. reinhardtii* al choque térmico (Fig. 4.3.3; $p < 0,05$).

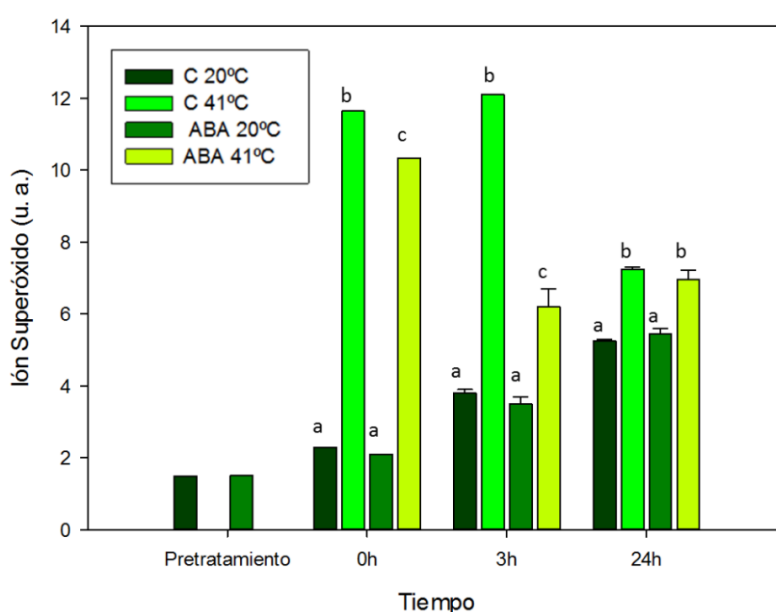


Figura 4.3.3. Niveles intracelulares de ión superóxido en *C. reinhardtii* a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a $20^\circ C$ y a $41^\circ C$ de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan la media de fluorescencia obtenida por CMF expresada en unidades arbitrarias (u. a.) y normalizada por el tamaño celular (FS). Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

En los cultivos tratados con ABA, también se observa un incremento significativo de los niveles de ROS en los cultivos expuestos a $41^\circ C$ (ABA $41^\circ C$) con respecto a los cultivos mantenidos a $20^\circ C$ (ABA $20^\circ C$). Por el contrario, en los cultivos tratados con ABA y sometidos a estrés térmico (ABA $41^\circ C$), el nivel intracelular de ROS es significativamente inferior al detectado en los cultivos sin ABA y sometidos a la misma temperatura (C $41^\circ C$), excepto después de 24 h del choque térmico (Fig. 4.3.3; $p > 0,05$).

Como ya se describió, los resultados del análisis de autofluorescencia de la clorofila *a* mediante CMF de *C. reinhardtii*, muestran la aparición, transcurridas 24 h de la exposición de

los cultivos a estrés térmico, de una población clorótica en los cultivos expuestos a 41°C (C 41°C) tanto en los cultivos tratados con ABA (ABA 41°C) como en los cultivados en ausencia de esta hormona (Fig. 4.2.2). El análisis de los niveles de ROS en dichas poblaciones cloróticas refleja que presentan niveles de ión superóxido significativamente superiores a los observados en las poblaciones no cloróticas. No se observan diferencias significativas en los niveles de ROS entre la población clorótica de los cultivos tratados con ABA y expuestos a estrés por calor (ABA 41°C) y la población clorótica de los cultivos sin tratar expuestos a la misma temperatura (C 41°C), con valores de valores $14,49 \pm 0,97$ u. a. y $15,17 \pm 0,76$ u. a., respectivamente ($p > 0,05$).

En el presente estudio también se ha analizado la actividad esterasa inespecífica de las células de *C. reinhardtii* como medida de la actividad celular mediante el análisis *in fluxo* de la generación de fluorescencia derivada de la hidrólisis enzimática del compuesto fluorogénico DAF, tal y como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

La exposición de los cultivos de *C. reinhardtii* a un estrés térmico afecta significativamente a la actividad metabólica de las células (Fig. 4.3.4; $p < 0,05$).

Inmediatamente después del choque térmico (0 h), en los cultivos sometidos a 41°C (C 41°C) se observa un incremento significativo en la actividad metabólica celular de *C. reinhardtii* con respecto a los valores obtenidos en los cultivos mantenidos a 20°C (C 20°C) (Fig. 4.3.4; $p < 0,05$). Sin embargo, los datos obtenidos después de 3 h y 24 h del estrés por calor muestran un descenso significativo de la actividad celular de *C. reinhardtii* en los cultivos expuestos a 41°C (C 41°C) con respecto a los expuestos a 20°C (Fig. 4.3.4; $p > 0,05$).

En los cultivos tratados con ABA, se observa el mismo patrón de respuesta frente al estrés por calor que el registrado en los cultivos no tratados con esta hormona. Dicha respuesta se caracteriza por un incremento de la actividad celular en los cultivos expuestos a 41°C inmediatamente después del estrés térmico y un descenso significativo de la actividad celular de *C. reinhardtii* después de 3 y 24 h del choque térmico, con respecto a los cultivos mantenidos a 20°C de temperatura. En los cultivos tratados con ABA, la actividad celular de *C. reinhardtii* sometida a estrés térmico (ABA 41°C) es significativamente superior que la registrada en los cultivos sin ABA y sometidos a la misma temperatura (C 41°C) después de 3 y 24 h de la exposición al estrés por calor (Fig. 4.3.4; $p < 0,05$).

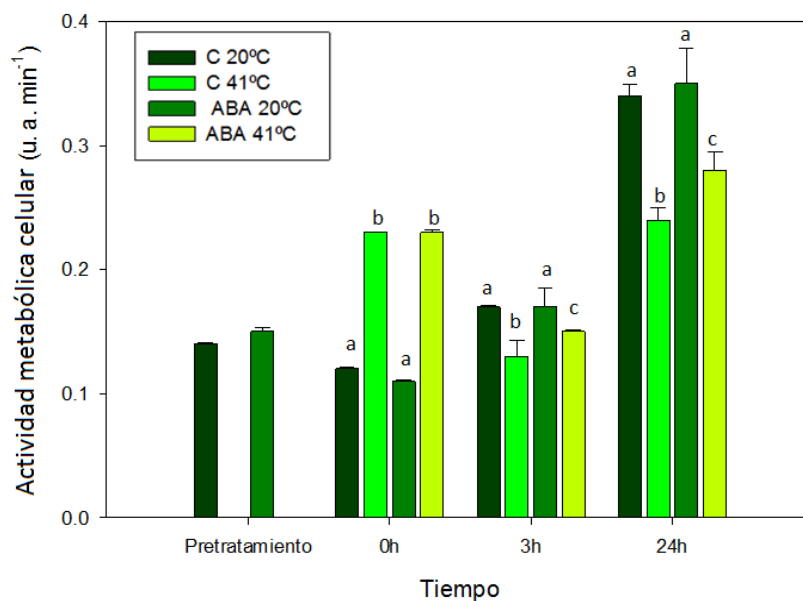


Figura 4.3.4. Actividad celular de *C. reinhardtii* a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a 20°C y a 41°C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan la media de fluorescencia obtenida por CMF expresada en unidades arbitrarias por unidad de tiempo (u. a. min⁻¹) y normalizada por tamaño (FS). Los valores expresan la media de las réplicas ± desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; p<0,05).

Los resultados obtenidos reflejan que el estrés térmico afecta severamente a las membranas celulares de *C. reinhardtii*, lo que se traduce en la pérdida del potencial de las membranas plasmática registrado en el presente trabajo (Fig. 4.3.1). En estudios anteriores con plantas se observa que los incrementos de temperatura pueden ser detectados a nivel de la membrana plasmática mediante cambios en la fluidez de la misma (Saidi *et al.*, 2010). Por otro lado, el análisis de los niveles de Ca⁺² y de ROS refleja que la exposición de los cultivos de *C. reinhardtii* a un estrés térmico (41°C) provoca una respuesta homogénea en la población para ambos parámetros, caracterizada por un rápido aumento tanto de los niveles de Ca⁺² citosólico (Fig. 4.3.2) como de los niveles de ROS (Fig. 4.3.3). En general, esta respuesta concuerda con el modelo descrito en plantas superiores, donde diversos autores proponen que el estrés por calor es detectado por un flujo de entrada de iones calcio al interior celular (Mittler *et al.*, 2012; Saidi *et al.*, 2009). Según esta hipótesis, alteraciones en la fluidez de la membrana plasmática inducidas por el calor serían el responsable del flujo específico de iones Ca⁺² al interior celular (Scott *et al.*, 1987; Lloyd *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2008) con la consiguiente producción de ROS (Wu *et al.*, 2012; Mittler *et al.*, 2012).

Por un lado, en el presente trabajo se comprueba que dicho incremento en los niveles de Ca⁺² citosólico es transitorio en *C. reinhardtii*, detectándose únicamente a tiempo 0 y

disminuyendo hasta niveles basales una vez cesa el estrés térmico. Este dato apoya la hipótesis sobre el papel del Ca^{+2} en la señalización de la respuesta a estrés por calor en células vegetales (Larkindale y Knight, 2002). Estos trabajos relacionan además esta señal de Ca^{+2} con la activación de enzimas productoras de ROS, como las NADPH oxidasas, adjudicándole a las ROS un papel activo como mensajeros secundarios en la respuesta a este estrés abiótico (Wu *et al.*, 2012; Mittler *et al.*, 2012). Según esta hipótesis, la acumulación activa de estos productos tóxicos puede dar lugar a desequilibrios en el metabolismo celular y desencadenar múltiples vías metabólicas, como la síntesis de HSPs, actuando como señales para activar la respuesta al estrés, no sólo frente a un choque térmico, si no frente a otros estrés ambientales (Agarwal *et al.*, 2005; Suzuki y Mittler, 2006; Mittler *et al.*, 2012). Esta respuesta activa frente al estrés mediada por ROS se caracteriza un rápido incremento en los niveles intracelulares de estas moléculas, lo que se conoce como explosión oxidativa (*oxidative burst*). El aumento de la actividad celular que se observa en los cultivos *C. reinhardtii* inmediatamente después del choque térmico podría apoyar esta hipótesis y dicho incremento reflejaría esta activación del metabolismo como respuesta al estrés al que están sometidas (Larkindale y Knight, 2002; Mittler *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente trabajo, el incremento en los niveles de ROS detectado en las células de *C. reinhardtii* sometidas a un choque térmico no responde a una explosión oxidativa, manteniéndose después de que las células se cultiven de nuevo a su temperatura óptima de crecimiento. Por ello, si bien inicialmente el incremento registrado en los niveles de ROS en *C. reinhardtii* puede ser debido a un mecanismo de señalización celular del estrés térmico, el hecho de que dichos niveles no regresen a los valores basales observados en las células no sometidas a estrés térmico sugiere la existencia de un estrés oxidativo como consecuencia del estrés por calor en esta microalga. Por lo tanto, la acumulación de ROS detectada en las células de *C. reinhardtii* expuestas a 41°C podría deberse a un desajuste en el delicado equilibrio redox de la célula al verse superadas los sistemas antioxidantes como consecuencia de las severas alteraciones producidas por la exposición al calor (Suzuki y Mittler, 2006; Zuppini *et al.*, 2007).

Por todo ello, este estrés oxidativo podría ser una de las causas de las alteraciones registradas en las membranas celulares de *C. reinhardtii* como consecuencia del estrés por calor, ya que las ROS inducen la peroxidación de lípidos y la lisis y desesterificación de ácidos grasos y los insaturados son el principal componente de la mayoría de las bicapas lipídicas (Liu *et al.*, 2007). Los elevados niveles de ROS estarían relacionados con los daños observados a nivel de la membrana plasmática, tal y como refleja la pérdida de viabilidad celular en los cultivos expuestos a 41°C (Fig. 4.1.1) y a nivel de las membranas del

cloroplasto, tal y como refleja la aparición de células cloróticas en dichos cultivos, cuyos niveles de ROS duplican los registrados en las células microalgales no cloróticas (Fig.4.2.2). Del mismo modo, los elevados niveles de ROS en el citoplasma celular también podrían producir alteraciones en el potencial eléctrico de la membrana citoplasmática, dando lugar a la despolarización de la membrana plasmática de *C. reinhardtii* observada en el presente estudio. La existencia de importantes daños oxidativos en las células de *C. reinhardtii* también podría relacionarse con el descenso en la actividad celular registrado después de 3 y 24 del choque térmico (Fig.4.3.4), particularmente, como reflejo de la inactivación de los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante de la célula como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, etc.

A este respecto, cabe destacar que en los cultivos de *C. reinhardtii* tratados con ABA, los niveles de ROS generados como consecuencia de la exposición al estrés térmico fueron significativamente inferiores a los registrados en las células no tratadas con ABA (Fig. 4.3.3). Estos datos pueden indicar que la presencia de esta hormona incrementa la tolerancia de *C. reinhardtii* frente al estrés térmico a través de un control más eficaz de la concentración intracelular de ROS. Estos resultados concuerdan con descrito en estudios sobre *Arabidopsis thaliana* donde se observa la participación de esta hormona en la protección contra el estrés oxidativo (Larkindale y Knigh, 2002). De hecho, otros autores han sugerido que el mecanismo a través del cual el ABA mejora la termotolerancia de las células vegetales se basa en el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes, tal y como se ha observado tras la aplicación exógena de ABA en plantas expuestas a este estrés abiótico (Agarwal *et al.*, 2005).

4.4 Ciclo celular, condensación de cromatina y actividad caspasa

Para evaluar el potencial efecto del estrés térmico sobre el ciclo celular de *C. reinhardtii*, se procede a la tinción de los núcleos con IP para su posterior análisis mediante CMF como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

C. reinhardtii es un organismo haploide (Harris, 2009). El análisis del ciclo celular en base al contenido de ADN de los núcleos de esta microalga en los cultivos mantenidos a 20°C, tanto en ausencia como en presencia de ABA, refleja la presencia de tres picos discretos de fluorescencia derivada del IP. Dichos picos se corresponden con la población de células con contenido nuclear de ADN 1n (en fase G1, representando en torno al 75% de la población), y con la población de células con contenido nuclear de ADN 2n y con contenido de ADN 4n (ambas poblaciones en fase G2, representando entre ambas el 25% aproximadamente de la

población). En estos cultivos, también se detecta una pequeña fracción de células cuyos núcleos presentan un contenido de ADN inferior a 1n, la población de células subG0, constituyendo menos del 3% de las poblaciones analizadas. Tal y como se observa en la Figura 4.4.1, la exposición de *C. reinhardtii* a estrés térmico provoca perturbaciones en el ciclo celular de esta microalga. Después de 24 h de cultivo desde el choque térmico, el porcentaje de células de *C. reinhardtii* con contenido 1n aumenta significativamente en los cultivos sometidos a 41°C (C 41°C) con respecto a los mantenidos a 20°C de temperatura (C 20°C) ($p < 0,05$). Dicho incremento en la población en fase G1 va acompañado de un descenso significativo en las poblaciones de células con contenido nuclear 2n y 4n ($p < 0,05$). De hecho, en los cultivos sometidos a estrés térmico el porcentaje de células 4n representa el $0,68 \pm 0,01\%$ de la población (Fig. 4.1.1).

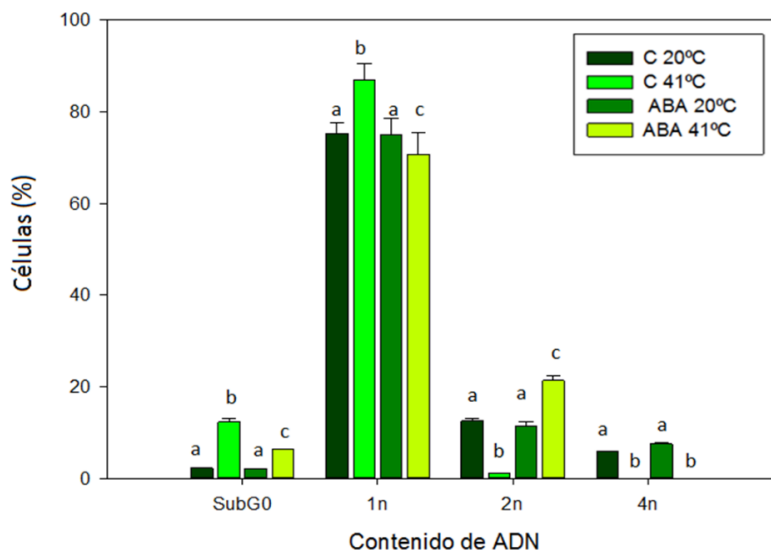


Figura 4.4.1. Ciclo celular de *C. reinhardtii* después de 24 h de la exposición a 20°C y a 41°C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular con respecto al total de células analizadas. Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

Por el contrario, en los cultivos tratados con ABA y sometidos a 41°C (ABA 41°C) de temperatura, el porcentaje de células 1n disminuye significativamente con respecto a los valores obtenidos en los cultivos con ABA y mantenidos 20°C (ABA 20°C). Sin embargo, el porcentaje de células con contenido nuclear 2n aumenta, también significativamente, después del estrés térmico ($p < 0,05$). En estos cultivos, la población 4n representa un $0,55 \pm 0,00\%$ de los cultivos tratados con ABA y sometidos a 41°C de temperatura (ABA 41°C).

En cuanto al análisis de la población celular con núcleos subG0, los resultados muestran que en los cultivos expuestos a 41°C (C 41°C) el porcentaje de células con núcleos subG0 es significativamente superior al porcentaje observado en los cultivos mantenidos a 20°C de temperatura; las células con núcleo subG0 representan el $12,36 \pm 0,70$ % de la población en los cultivos sometidos a choque térmico (C 41°C) frente al $2,39 \pm 0,32$ % de células con núcleo subG0 observadas en los cultivos mantenidos 20°C (C 20°C) (Fig.4.4.1; $p < 0,05$).

En los cultivos tratados con ABA expuestos a 41°C (ABA 41°C), el porcentaje de células con núcleos subG0 es también significativamente superior al porcentaje observado en los cultivos mantenidos a 20°C (ABA 20°C). Sin embargo, el porcentaje de células con núcleos subG0 de los cultivos tratados y expuestos a 41°C (ABA 41°C) es significativamente menor que el porcentaje de células con núcleos subG0 de los cultivos no tratados y expuestos a la misma temperatura (C 41°C) (Fig. 4.4.1; $p < 0,05$).

Con el fin de estudiar potenciales cambios asociados a fenómenos de condensación de cromatina en la morfología de los núcleos de *C. reinhardtii*, se ha procedido a la tinción de los mismos con el fluorocromo DAPI para su análisis mediante microscopía de epifluorescencia.

La exposición al estrés térmico induce fenómenos de condensación de cromatina en las células de *C. reinhardtii*. Los cultivos de esta microalga expuestos a 41°C (C 41°C) presentan un porcentaje de células con condensación de cromatina significativamente superior que los cultivos expuestos a 20 °C (C 20°C), tal y como muestra la Figura 4.4.2. Este incremento en el porcentaje de células con condensación de cromatina se detecta transcurridas 3 h desde la exposición de los cultivos a estrés térmico (Fig.4.4.2; $p < 0,05$). Después de 24 h, en los cultivos expuestos a estrés por calor, el porcentaje de células que muestran condensación de cromatina (DAPI+) representa el $87,54 \pm 2,54\%$ frente al $2,33 \pm 0,24\%$ de células con condensación de cromatina en los cultivos mantenidos a 20°C de temperatura (Figs. 4.4.2 y 4.4.3).

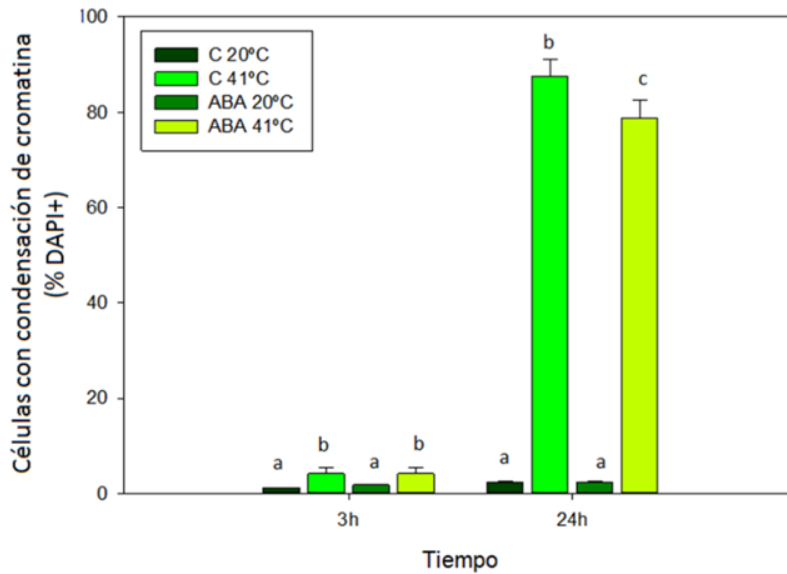


Figura 4.4.2. Condensación de cromatina en las células de *C. reinhardtii* después de 3 y 24 h de la exposición a 20°C y a 41°C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan el porcentaje de células con condensación de cromatina (DAPI+) con respecto al total de células analizadas. Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

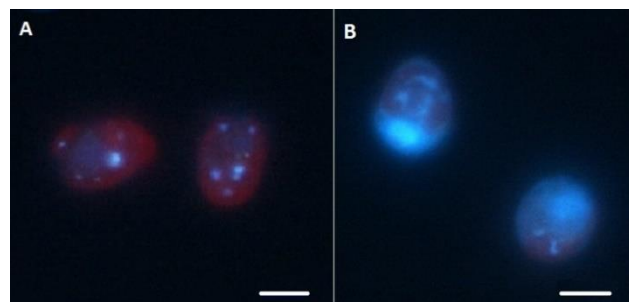


Figura 4.4.3. Análisis de condensación de cromatina en células de *C. reinhardtii* después de 3 h de la exposición 20°C (A) y a 41°C (B). La intensa fluorescencia azul emitida por los núcleos teñidos con DAPI indica condensación de cromatina. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400.

En el caso de los cultivos tratados con ABA, la exposición a 41°C (ABA 41°C) provoca un incremento significativo de las células que presentan condensación de cromatina con respecto a los cultivos expuestos a 20°C de temperatura (ABA 20°C) (Fig. 4.4.2; $p < 0,05$). Sin embargo, transcurridas 24 h de la exposición al calor, el porcentaje de células con condensación de cromatina (DAPI+) en los cultivos tratados con ABA y expuestos a 41°C (ABA 41°C) es significativamente inferior al observado en los cultivos expuestos a 41°C en ausencia de ABA (C 41°C), con valores de $77,17 \pm 3,79$ % en los cultivos tratados (ABA 41°C) frente a $87,50 \pm 3,54$ % en los cultivos no tratados (C 41°C) (Fig. 4.4.2; $p < 0,05$).

Finalmente se lleva a cabo un análisis de la actividad caspasa mediante el ensayo *CellEvent Caspase-3/7Green* (Molecular Probes) desarrollado para CMF. Los datos obtenidos reflejan que el estrés por calor induce de manera significativa dicha actividad enzimática en las células de *C. reinhardtii* (Fig. 4.4.4.; $p < 0,05$).

En los cultivos sometidos a 40 °C (C 41°C) se observa un aumento significativo en el porcentaje de células que presentan con actividad caspasa (caspasa+) con respecto a los valores obtenidos en los cultivos mantenidos a 20 °C (C 20°C) (Fig.4.4.4; $p < 0,05$). Este incremento en el porcentaje de células con esta actividad enzimática se detecta inmediatamente después de la exposición al calor (0 h), donde el porcentaje de células con actividad caspasa en los cultivos expuestos a 20°C representa el $0,60 \pm 0,00\%$ de la población frente al $11,97 \pm 0,00 \%$ de células que esta actividad en los cultivos expuestos a 41°C (C 41°C). Transcurridas 3 y 24 h desde el choque térmico, el porcentaje células con actividad caspasa en estos cultivos aumenta hasta representar el $64,23 \pm 3,54\%$ y $68,05 \pm 2,05\%$ de la población total analizada, respectivamente.

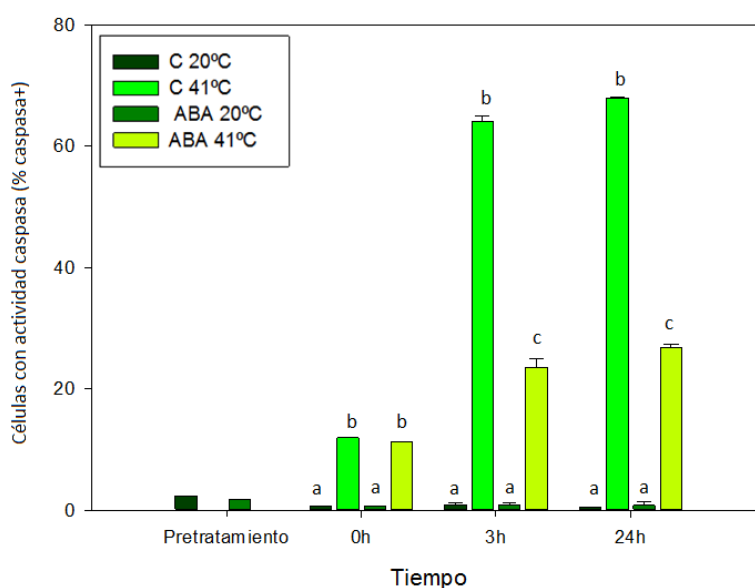


Figura 4.4.4. Población de células de *C. reinhardtii* con actividad caspasa a diferentes tiempos, antes (pretratamiento) y después de 0, 3 y 24 h de la exposición a 20°C y a 41°C de temperatura, en cultivos con y sin tratamiento con ABA. Los datos representan el porcentaje de células con actividad caspasa (caspasa+) con respecto al total de células analizadas mediante CMF. Los valores expresan la media de las réplicas \pm desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado (ANOVA multifactorial; $p < 0,05$).

En los cultivos tratados con ABA, también se observa un incremento significativo de la actividad caspasa celular de los cultivos expuestos a 41 °C frente a los cultivos expuestos a 20°C (Fig. 4.4.4; $p < 0,05$). Sin embargo, tanto a las 3 como a las 24 horas después de la

exposición al estrés, los porcentajes células con actividad caspasa obtenidos en los cultivos tratados con ABA y expuestos a 41°C (ABA 41°C) son significativamente inferiores a los observados en los cultivos sin ABA sometidos a la misma temperatura (C 41°C) (Fig. 4.4.4; $p < 0,05$).

El análisis del ciclo celular mediante CMF en los cultivos de *C. reinhardtii* demuestran un incremento significativo en el número de células en fase G1 (1n) como consecuencia de la exposición al estrés por calor (Fig. 4.4.1). Este hecho confirma la hipótesis planteada en la discusión del apartado de tamaño y autofluorescencia de la clorofila *a*, en concordancia con el descenso registrado en el tamaño de las células microalgales expuestas a 41°C y con la inhibición observada del mismo modo en el crecimiento. Como ya se comentó, este bloqueo de la división celular en la fase G1 puede ser debido a un intento de adaptación de las células al estrés por calor (Rioboo *et al.*, 2009).

A la vista de los resultados obtenidos mediante la tinción con IP que reflejan una drástica pérdida de viabilidad celular en los cultivos de *C. reinhardtii* sometidos a una temperatura de 41°C, se estudió la potencial inducción de procesos de muerte celular programada en esta microalga como consecuencia del choque térmico. Para ello, se utilizaron tres marcadores habitualmente utilizados en la detección de esta respuesta, tanto en células animales como vegetales: activación de caspasas, condensación de cromatina y pérdida de contenido de ADN nuclear detectada como núcleos subG0. En conjunto, los resultados del presente estudio sugieren que la exposición a una temperatura elevada de las células de *C. reinhardtii* durante un corto periodo de tiempo desencadena un proceso de muerte celular programada en esta microalga,

Como se comentó en la Introducción, los procesos de muerte celular programada han sido intensivamente estudiados en organismos superiores como respuesta a cambios ambientales, fisiológicos y bioquímicos, aunque recientemente se ha observado que está también presente en los organismos unicelulares como las microalgas (Debrabant *et al.*, 2003). En el presente estudio, la exposición a estrés térmico provoca un incremento en el número de células microalgales cuyos núcleos han sufrido alteraciones importantes como la pérdida de ADN (núcleos subG0) y la condensación de la cromatina (Figs. 4.4.1 y 4.4.2). Ambas alteraciones son características frecuentemente descritas en células en proceso de muerte celular programada (Popovich y Kitts, 2004; Kajstura *et al.*, 2007). Además, el análisis de la activación de la actividad caspasa en *C. reinhardtii* como consecuencia de la

exposición al estrés térmico registrado apoya esta hipótesis. Las caspasas (CASPase; *cysteinyl aspartate specific proteinase*) son cisteína-proteasas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico en un residuo de ácido aspártico y actúan sobre enzimas encargadas de reparar el ADN, sobre proteínas estructurales como la actina y sobre endonucleasas. Las caspasas se expresan como proenzimas, sin actividad biológica, y deben ser activadas para poder ejercer su acción, iniciando determinados procesos celulares implicados en la muerte celular programada entre los que se incluye la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina (Brentnall *et al.*, 2013)

Otros autores también relacionaron la activación de enzimas caspasas con la detección de marcadores morfológicos característicos de estos procesos de muerte celular programada en células de *Chlamydomonas reinhardtii* expuestas a radiación UV y en *Dunaliella tertiolecta* sometida a oscuridad (Segovia *et al.*, 2003; Moharikar *et al.*, 2006). Zuppini *et al.* (2010) también describieron características morfológicas tales como condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y actividad caspasa en células de otra especie microalgal, *Chlorella saccharophila*, tras ser sometidas a estrés osmótico. En el presente estudio, las células de *C. reinhardtii* que presentan actividad caspasa representan el $68,05 \pm 0,05\%$ de la población después de 24 h del choque térmico, momento en el que también se detecta la aparición de una población clorótica y un aumento en la pérdida de viabilidad celular de los cultivos por lo que se podría relacionar estos dos fenómenos con la acción enzimática de las caspasas y con la ocurrencia de muerte celular programada en esta especie. Aunque el potencial papel que este proceso, aparentemente altruista, podría desempeñar en la naturaleza en el caso de organismos unicelulares aún es objeto de debate, distintos autores han sugerido que la muerte celular programada puede ser una respuesta adaptativa de los microorganismos para controlar el crecimiento poblacional durante los períodos de los recursos alimentarios limitados (Welburn *et al.* 1997, Al-Olayan *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2002) o ante una situación de estrés ambiental como se sugiere en este trabajo.

De nuevo, los resultados obtenidos en los cultivos tratados con ABA muestran una menor incidencia del estrés por calor sobre estos marcadores en las células microalgales cultivadas en presencia de esta hormona. En concreto, el descenso registrado en el porcentaje de células que presentan activación de caspasas y del porcentaje de células que presentan condensación de cromatina en los cultivos tratados con ABA podría indicar la participación de la hormona en mecanismos de termotolerancia en las células microalgales, a través del control del estrés oxidativo generado por el estrés térmico.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo reflejan que la exposición de los cultivos de *C. reinhardtii* a estrés por calor provoca importantes alteraciones sobre la fisiología celular de esta microalga dulceacuícola. Inmediatamente después de la exposición de las células a un choque térmico, *C. reinhardtii* experimenta un descenso del potencial de membrana citoplasmática y la acumulación de iones Ca^{+2} y de ROS en el interior celular, metabolitos que podrían participar en la señalización celular del incremento de temperatura y desencadenar múltiples vías metabólicas como respuesta al estrés. El incremento registrado en la actividad celular de *C. reinhardtii* en este momento podría apoyar esta hipótesis. Sin embargo, los elevados niveles de ROS, detectados en las células de *C. reinhardtii* incluso 24 h después del choque térmico, sugieren la ocurrencia de un desajuste en el delicado equilibrio redox de la célula al verse superados los sistemas antioxidantes como consecuencia de las severas alteraciones producidas por la exposición al calor. Este estrés oxidativo podría ser una de las causas de las alteraciones registradas en las membranas celulares de *C. reinhardtii* como consecuencia del estrés por calor. Dicho estrés oxidativo estaría relacionado con los daños observados a nivel de la membrana plasmática, tal y como refleja la pérdida de viabilidad celular en los cultivos expuestos a 41°C y a nivel de las membranas del cloroplasto, tal y como refleja la aparición de células cloróticas en dichos cultivos, las cuales presentan elevados niveles de ROS.

Por otro lado, la exposición de *C. reinhardtii* a estrés térmico provoca la activación de la actividad caspasa, la condensación de la cromatina del núcleo y la pérdida de ADN nuclear (núcleos subG0) de las células microalgales, alteraciones morfológicas y bioquímicas frecuentemente descritas en células en proceso de muerte celular programada.

En cuanto a la hormona vegetal ensayada, el tratamiento de las células de *C. reinhardtii* en presencia de ABA no presenta ningún efecto detectable sobre los parámetros analizados cuando los cultivos se mantiene a su temperatura óptima de crecimiento. Sin embargo, el tratamiento con ABA incrementa la tolerancia de *C. reinhardtii* frente al estrés térmico, reduciendo el impacto provocado por este estrés sobre todos los parámetros analizados en el presente trabajo. Esta termotolerancia podría ser deberse a la inducción de mecanismos de control de la concentración intracelular de ROS en las células tratadas con ABA.

En base a los resultados obtenidos, para profundizar en los mecanismos que intervienen en las alteraciones en la fisiología celular de *C. reinhardtii* provocadas por el estrés térmico, en próximos ensayos se estudiará la respuesta de las proteínas de choque

térmico. En este punto se incidirá particularmente en el estudio de la HSP70, cuya expresión se relaciona con la inducción de respuestas antioxidantes frente al estrés por calor (Hu *et al.*, 2010). Dado el importante papel que el estrés oxidativo parece tener en el estrés por calor, se analizará la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx), tanto durante la exposición al estrés como inmediatamente después, en combinación con el tratamiento con la hormona ensayada en este trabajo, el ABA.

Por último, se propone la realización de ensayos que complementen los resultados obtenidos de muerte celular programada en *C. reinhardtii*. Además de estudiar la expresión de enzimas caspasas, se realizarán ensayos TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) para confirmar las alteraciones observadas a nivel de ADN en las células sometidas a estrés térmico.

5. Conclusiones

1. La exposición de *C. reinhardtii* a estrés térmico provoca alteraciones significativas sobre la fisiología de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii*. Dichas alteraciones se caracterizan por un descenso del crecimiento y de la viabilidad celular, un descenso del tamaño celular y de la autofluorescencia de la clorofila *a*, un bloqueo del ciclo celular en fase G1, la despolarización de la membrana plasmática, un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{+2} y ROS, y un incremento de la actividad celular inmediatamente después del choque térmico. En conjunto, los resultados sugieren que estas alteraciones son consecuencia de un estrés oxidativo en las células.

2. La exposición de *C. reinhardtii* a estrés térmico provoca la activación de la actividad caspasa, la condensación de la cromatina del núcleo y la pérdida de ADN nuclear (núcleos subG0) de las células microalgales. Estas alteraciones morfológicas y bioquímicas son frecuentemente descritas en células en proceso de muerte celular programada.

3. El tratamiento con la hormona vegetal ABA incrementa la tolerancia de *C. reinhardtii* frente al estrés térmico. Esta termotolerancia podría ser deberse a la inducción de mecanismos de control de la concentración intracelular de ROS en las células tratadas con ABA.

4. La citometría de flujo resulta ser una técnica rápida y precisa, que permite caracterizar la respuesta de *C. reinhardtii* al estrés térmico a diferentes niveles de la fisiología celular de la microalga.

6. Bibliografía

- Agarwal, S., Sairam, R. K., Srivastava, S. G., Tyagi A., Meena, R. C. (2005). *Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings*. Plant Science, 169:559–570.
- Agustí, S., Satta, M. P., Mura, M. P., Benavent, E. (1998). *Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lysis: evidence of high phytoplankton lysis rates in the northwestern Mediterranean*. Limnology and Oceanography, 43: 1836-1849.
- Al-Olayan, E. M., Williams, G. T., Hurd, H. (2002). *Apoptosis in the malaria protozoan, Plasmodium berghei: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito*. International Journal for Parasitology, 32: 1133–1143.
- Annamalai, P. y Yanaghiara, S. (1999). *Identification and characterization of a heat stress induced gene in cabbage encodes a kunitz type protease inhibitor*. Journal of Plant Physiology, 155: 226-233.
- Bajguz, A. (2009). *Brassinosteroid enhanced the level of abscisic acid in Chlorella vulgaris subjected to short-term heat stress*. Journal of Plant Physiology, 166: 882–886.
- Benov, L., Szejnberg, L., Fridovich, I. (1998). *Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical*. Free Radical Biology & Medicine, 25: 826-831.
- Bold, H. y Wynne, M. (1985). *Introduction to the Algae*. Prentice-Hall, New Jersey. 720 pp.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., Ladron De Guevara, R., Cepero, E., Boise, L. H. (2013). *Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis*. BMC Cell Biology, 14:32
- Carter, N. P. y Meyer, E. W. (1990). *Introduction to the principles of flow cytometry. En: Flow Cytometry. A Practical Approach*. Ormerod, M.G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford, pp 1-28.
- Darehshouri, A., Affenzeller, M., Lütz-Meindl, U. (2008). *Cell death upon H₂O₂ induction in the unicellular green alga Micrasterias*. Plant Biology, 10:732–45.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., Traganos, F. (1992). *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. Cytometry, 13: 795-808.

- Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., Nakhasi, H. L. (2003). *Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms*. International Journal for Parasitology, 33: 257–267.
- Desikan, R., Mackerness, S.A.H., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2001). *Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress*. Plant Physiology, 127: 159-172.
- Dimova, E. G., Bryant, P. E., Chankova, S. G. (2008). *Adaptive response: some underlying mechanisms and open questions*. Genetics and Molecular Biology, 31: 396-408.
- Ding, W., Song, L., Wang, X., Bi, Y. (2010). *Effect of abscisic acid on heat stress tolerance in the calli from two ecotypes of Phragmites communis*. Biologia Plantarum, 54(4):607-613.
- Eullaffroy, P. y Vernet, G. (2003) *The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae*. Water Research, 37:1983–1990.
- García, J.M. y Roselló, J. (1998). *Biología y Botánica*. Univ. Politéc, Valencia. Tomo II, 362 pp.
- Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L., Garnier-Laplace, J. (2007). *Effect of selenate on growth and photosynthesis of Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology, 83: 149-158.
- Gerloff-Elias, A., Barua, D., Mölich, A., Spijkerman, E. (2006). *Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga Chlamydomonas acidophila*. FEMS Microbiology Ecology, 56: 345–354.
- Gong, M., Li, Y. J., Chen, S. Z. (1998). *Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems*. Journal of Plant Physiology, 153: 488–496.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C. (2004). *Atrazine induced chlorosis in Synechococcus elongatus cells*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 46: 301-307.
- Gorman, D.S., y Levine, R.P. (1965). *TAP and Tris-minimal medium recipes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 54: 1665-1669.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985). *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. Journal of Biological Chemistry, 260: 3440-3450.

- Gurley, W. B. (2000). *HSP101: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants*. *The Plant Cell*, 12: 457-460.
- Hanikenne, M. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance*. *New Phytologist*, 159: 331-340.
- Harris, E.H. (2001). *Chlamydomonas as a model organism*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:363-406.
- Harris, E.H. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, Oxford (UK). pp 480.
- Hema, R., Senthil-Kumar, M., Shivakumar, S., Chandrasekhara Reddy, P., Udayakumar, M. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes*. *Planta*, 226: 655-670.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., Ikeuchi, M. (2001). *DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light*. *Plant Cell*, 13:793-80.
- Hoeberichts, F.A. y Woltering, E.J. (2003). *Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators*. *Bioessays*, 25: 47-57.
- Howarth, C. J. y Ougham, H. J. (1993). *Gene expression under temperature stress*. *New Phytologist*, 125: 1-26.
- Hu, X., Liu, R., Li, Y., Wang, W., Tai, F., Xue, R., Li, C. (2010). *Heat shock protein HSP70 regulates the abscisic acid- induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress*. *Plant Growth Regulation*, 60: 225-235
- Janicka-Russak, M. (2011). *Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses*. In: *Abiotic stress response in plants- physiological, biochemical and genetic perspectives*. Shanker, A., Venkateswarlu, B., editors. pp 197-218.
- Janicka-Russak, M. y Kabała, K. (2012). *Abscisic acid and hydrogen peroxide induce modification of plasma membrane H⁺-ATPase from Cucumis sativus L. roots under heat shock*. *Journal of Plant Physiology*, 169: 1607-1614.
- Kajstura, M., Halicka, H.D., Pryjma, J., Darzynkiewicz, Z. (2007). *Discontinuous Fragmentation of Nuclear DNA During Apoptosis Revealed by Discrete "Sub-G1" Peaks on DNA Content Histograms*. *Cytometry*, 71A: 125-131.

- Klapperstück, T., Glanz, D., Klapperstück, M., Wohlrab, J. (2009). *Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry*. Cytometry, 75A: 593-608.
- Kobayashi M, Hirai N, Kurimura Y, Ohigashi H, Tsuji Y. (1997). *Abscisic acid-dependent algal morphogenesis in the unicellular green alga Haematococcus pluvialis*. Plant Growth Regulation, 22:79-85.
- Kobayashi, M., Todoroki, Y., Hirai, N., Kurimura, Y., Ohigashi, H., Tsuji, Y. (1998). *Biological activities of abscisic acid analogs in the morphological change of the green alga Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 85: 529–531.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., Mignotte, B. (1995). *The biochemistry of programmed cell death*. The FASEB Journal, 9(13), 1277-1287.
- Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M. (2001). *Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper (II) on the marine dinoflagellate Amphidinium carterae*. Cytometry, 44: 226-235.
- Larkindale, J. y Knight, M. R. (2002). *Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid*. Plant Physiology, 128: 682-695.
- Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., Nakhasi, H.L. (2002), *Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania*. Cell Death and Differentiation 9: 53-64.
- Lemaire, S.D, Hours, M., Gerard-Hirne, C., Troubal, A., Roche, O., Jacquot, J.P. (1999). *Analysis of light/dark synchronization of cell-wall-less Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyta) cells by flow cytometry*. European Journal of Phycology, 34: 279-286.
- Liu, H. T., Gao, F., Han, J. L., Liu, D. L., Sun, D. Y., Zhou, R.G. (2008). *The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 55: 760–77.
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, O., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q. (2012). *Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells*. Nature Cell Biology, 14: 177–185

- Liu, W., Au, D. W. T., Anderson, D. M., Lam, P. S. K., Wu, R. S. S. (2007). *Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga Chattonella marina*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 346: 76–86.
- Lloyd, D., Harris, J. C., Maroulis, S., Biagini, G. A., Wadley, R. B., Turner, M. P., Edwards, M. R. (2000). *The microaerophilic flagellate Giardia intestinalis: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity*. Microbiology, 146: 3109-3118.
- Mittler R. y Cheung A.Y. (2004). *Cell death in plant development and defense*. En: Lockshin, R. A., Zakeri, Z. (eds) *When cells die II: a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*. Wiley, Hoboken. pp 99–122.
- Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P. (2012). *How do plants feel the heat?* Trends in Biochemical Sciences, 37: 118–125.
- Moharikar, J.S., Kulkarni, A.B., Rao, B.J. (2006). *Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analysis*. Phycological Society of America, 42: 423-433.
- Mullaney, P. F., Van Dilla, M. A., Coulter, J. R. (1969). *Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination*. Review of Scientific Instruments, 40: 1029-1034.
- Ning, S. B., Guo, H. L., Wang, L., Song, J. C. (2002). *Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism Anabaena*. Journal of Applied Microbiology, 93: 15-28.
- Nooden, LD. (2004). *Introduction*. En: *Plant cell death processes*. Amsterdam: Elsevier. pp 1–18.
- Olson, R.J., Vaultot, D., Chisholm, S.W. (1986). *Effects of enviromental stresses on the cell cycle of two marine phytoplankton species*. Plant Physiology, 80: 918-925.
- Ormerod, M.G. (1990). *Analysis of DNA. General methods*. En: Ormerod, M.G. (Ed.), *Flow Cytometry. A practical Approach*. Oxford Univesity Prees, Oxford, pp. 69-87.
- Perl-Treves, R. y Perl, A. (2002). *Oxidative stress: an introduction*. En: *Oxidative stress in plants*. Inzé, D. y Van Montagu, M. (Ed.). Taylor & Francis, London. pp. 1-32.
- Popovich, D.G. y Kitts, D.D. (2004). *Ginsenosides 20(S)-protopanaxadiol and Rh2 reduce cell proliferation and increase sub-G1 cells in two cultured intestinal cell*

- lines, Int-407 and Caco-2*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 82(3): 183-190.
- Porter, A. G. y Jänicke, R. U. (1999). *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death and Differentiation, 6(2):99-104
 - Prado, R., Garcia, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, A. (2009). *Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat*. Environment International, 35: 240–247
 - Rabinovitch, P.S. y June, C.H. (1990). *Intracellular ionized calcium, membrane potential, and pH*. En: *Flow cytometry. A practical approach*. Ormerod, M. G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford. pp. 161-185.
 - Rioboo, C., O'Connor, J. E., Prado, R., Herrero, C., Cid, A. (2009). *Cell proliferation alterations in Chlorella cells under stress conditions*. Aquatic Toxicology, 94: 229-237.
 - Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg Z., Weiss, Y. G., Maathius, F. J. M., Goloubinoff, P. (2009) *The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane*. The Plant Cell, 21: 2829–284.
 - Saidi, Y., Peter, M., Finka, A., Cicekli, C., Vigh, L., Goloubinoff, P. (2010). *Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca²⁺-dependent heat shock response*. Plant Signaling & Behavior, 5:12: 1530-1533.
 - Scott, J. A., Khaw, B., Homey, C. J., Rabito, C. A. (1987). *Oxygen radicals alter the cell membrane potential in a renal cell line (LLCPK1) with differentiated characteristics of proximal tubular cells*. Biochimica et Biophysica Acta, 897: 25-32.
 - Segovia, M., Haramaty, L., Berges, J. A., Falkowski, P. G. (2003). *Cell death in the unicellular chlorophyte Dunaliella tertiolecta. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans*. Plant Physiology, 132: 99–105.
 - Sobrino, C., Montero, O., Lubian, L. M. (2004). *UV-B radiation increases cell permeability and damages nitrogen incorporation mechanism in Nannochloropsis gaditana*. Aquatic Sciences, 66: 421-429.
 - Stirk, W. A., Novák, O., Hradecká, V., Pěnčík, A., Rolčík, J., Strnad, M., Van Staden, J. (2009). *Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in Ulva fasciata (Chlorophyta) and Dictyota humifusa (Phaeophyta): towards understanding their biosynthesis and homeostasis*. European Journal of Phycology, 44(2): 231–240.

- Suzuki, N. y Mittler, R. (2006). *Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction*. *Physiologia Plantarum*, 126: 45–51.
- Tominaga, N., Takahata, M., Tominaga, H. (1993). *Effects of NaCl and KNO₃ – concentrations on the abscisic acid content of Dunaliella sp. (Chlorophyta)*. *Hydrobiologia*, 267: 163–168.
- Tsien, R. Y., Pozzan, T., Rink, T. J. (1982). *Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator*. *The Journal of Cell Biology*, 94: 325-334.
- Tuteja, N. y Mahajan, S. (2007). *Calcium signaling network in plants: an overview*. *Plant Signaling & Behavior*, 2(2): 79–85.
- Van Doorn, W. G. y Woltering, E. J. (2005). *Many ways to exit? Cell death categories in plants*. *Trends in Plant Science*, 10: 117–122.
- Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A. M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A.J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhitovskiy, B., Bozhkov, P. V. (2001). *Morphological classification of plant cell deaths*. *Nature*, 18: 1241–1246.
- Vardi, A., Berman-Frank, I., Rozenberg, T., Hadas, O., Kaplan, A., Levine, A. (1999). *Programmed cell death of the dinoflagellate Peridinium gatunense is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress*. *Current Biology*, 9: 1061-1064.
- Vierling, E. (1991). *The roles of heat shock proteins in plants*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:579-620.
- Wei, M. K., Wu, Q. P., Huang, Q. y Zhang, J. M. (2008). *Plasma membrane damage to Candida albicans caused by chlorine dioxide (ClO₂)*. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 67-73.
- Welburn, S.C., Williams, G.T., Barcinski, M.A. (1997). *Programmed Cell Death in Trypanosomatids*. *Parasitol Today*, 13: 22-25.
- Woltering, E.J., van der Bent, A., Hoeberichts, F. A. (2002). *Do plant caspases exist?* *Plant Physiology*, 130: 1764–1769.
- Wu, F., Yang, H., Chang, Y., Cheng, J., Bai, S., Yin, J. (2012). *Effects of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant capacity in Chinese Bayberry during storage*. *Scientia Horticulturae*, 135: 106-111

- Xue, Y., Peng, R., Xiong, A., Li, X., Zha, D., Yao, Q. (2010). *Over-expression of heat shock protein gene hsp26 in Arabidopsis thaliana enhances heat tolerance*. *Biologia Plantarum*, 54(1): 105-111.
- Yordanova, Z. P., Iakimova, E. T., Cristescu, S. M., Harren, F. J. M., Kapchina-Toteva V. M., Woltering, E. J. (2010). *Involvement of ethylene and nitric oxide in cell death in mastoparan-treated unicellular alga Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Biology International*, 34: 301–308.
- Yoshida, K., Igarashi, E., Mukai, M., Hirata, K., Miyamoto, K. (2003). *Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, Chlamydomonas reinhardtii, by abscisic acid*. *Plant, Cell & Environment*, 26: 451-457.
- Yoshida, K., Igarashi, E., Wakatsuki, E., Miyamoto, K., Hirata, K. (2004). *Mitigation of osmotic and salt stresses by abscisic acid through reduction of stress-derived oxidative damage in Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, 167: 1335-1341.
- Zuo, Z., Zhu, Y., Bai, Y., Wang, Y. (2012). *Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51:175–184.
- Zuppini, A., Andreoli, C., Baldan, B. (2007). *Heat stress: an inducer of programmed cell death in Chlorella saccharophila*. *Plant and Cell Physiology*, 48:1000 –1009.
- Zuppini, A., Bugno, V. and Baldan, B. (2006). *Monitoring programmed cell death triggered by mild heat shock in soybean-cultured cells*. *Functional Plant Biology*, 33: 617–627.
- Zuppini, A., Gerotto, C., Baldan, B. (2010). *Programmed cell death and adaptation: two different types of abiotic stress response in a unicellular chlorophyte*. *Plant and Cell Physiology*, 51:884–895.
- Zuppini, A., Gerotto, C., Moscatiello, R., Bergantino, E., Baldan, B. (2009). *Chlorella saccharophila cytochrome f and its involvement in the heat shock response*. *Journal of Experimental Botany*, 60:4189-4200.

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico
ANOVA: Análisis de la varianza
CAT: catalasa
CCAP: Colección de Cultivos de Algas y Protozoos
CMF: Citometría de flujo
DAF: Diacetato de fluoresceína
DAPI: 4'-6diamino-2-fenilindol
DiBAC₄(3): Bis-(1,3-acido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol
DMSO: Dimetilsulfóxido
FL: Fluorescencia
FS: Luz refractada en un ángulo <20°
GPx: glutatión peroxidasa
HE: Hidroetidina
HSP: Proteínas de choque térmico
IP: Ioduro de propidio
LMA: Agarosa con bajo punto de fusión
PBS: Tampon fosfato salino
PCD: Muerte celular programada
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SOD: superóxido dismutasa
SS: Luz refractada en el ángulo lateral
TAP: Tris-acetato-fosfato
TC: Tasa de crecimiento
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
u.a.: Unidades arbitrarias