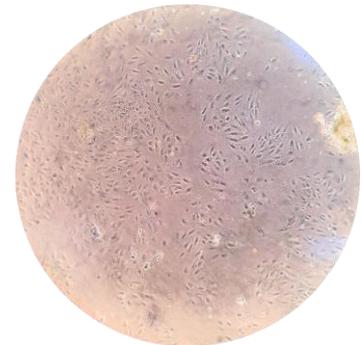
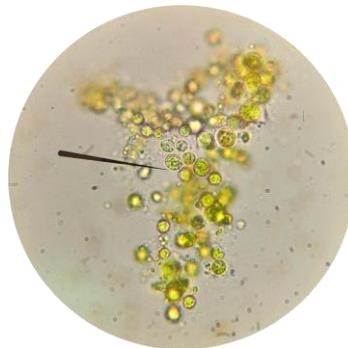
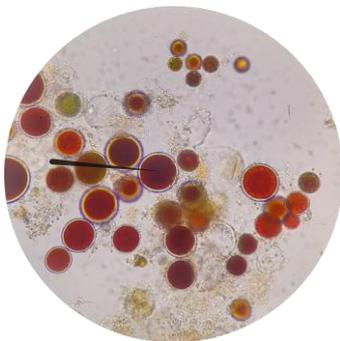




**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y**  
**FARMACIA**



# “Co-cultivo de microalgas aisladas de la región de Bahía Blanca: evaluación de su rol en células de la retina”



**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ALUMNA: Durán, Lourdes Magdalena**  
**DIRECTORA: Dra. Scodelaro Bilbao, Paola**  
**CO-DIRECTORA: Dra. Simón, María Victoria**

Mayo 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

# “Co-cultivo de microalgas aisladas de la región de Bahía Blanca: evaluación de su rol en células de la retina”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Durán Lourdes Magdalena**  
*Firma de la Alumna*

**Scodelaro Bilbao Paola**  
*Firma de la Directora*

**Simón Ma. Victoria**  
*Firma de la co-Directora*

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que les tengo que agradecer por apoyarme y motivarme para alcanzar esta meta tan importante en mi vida, ayudándome a perseguir mi sueño desde muy chica. A cada una de ellas, GRACIAS! No estaría hoy acá si no fuera por ustedes. Soy quien soy gracias al amor y apoyo incondicional de los que me rodearon y rodean cada día.

A mis papás y mi hermana, por dejarme cumplir el sueño de estudiar la carrera que amo, por el apoyo de todos los días, escucharme y acompañarme, incluso estando lejos. Por las visitas y las encomiendas que hacían tener a casa un poco más cerca, estoy eternamente agradecida con ustedes.

A mis perras, Roma y Floppy, por su hermosa compañía y ser mi cable a tierra.

A mis tíos y primas, Walter, Pati, Loli, Marcelo, José, Ro, Azu y Juli, por siempre tener palabras de aliento, por hacer que Bahía se sienta como casa y, por creer que soy Bióloga desde el día uno.

A mis amigas de toda la vida, la familia que elegí. Soy muy afortunada de tenerlas, gracias por la motivación, por hacer las cosas mucho más livianas y alentarme, incluso cuando creía que no podía. En especial a las que están en Bahía, Gine, Cami, Ro y Caro, por bancarse mis crisis a la madrugada, por las cenas, cumplir el rol de enfermeras, las tardes de estudio y risas. Gracias por su incondicionalidad y amor todos los días!

A Belu, mi primera amiga en la Universidad, por incentivar-me a superarme, por la escucha de todos los días, la compañía, las caminatas interminables y la complicidad. Gracias por ser refugio y calma.

A los amigos que me dio la Universidad, Aniluz, Mica, Solci, Mai, Anita, Agus, Juli, David, Orne y Mili, por las tardes de estudio, las juntadas, las risas y la buena compañía. Gracias por apoyarme a seguir, aun estando lejos.

A mis amigos del gimnasio, Vale, Andi, Juan, Nano, Juan S. y Martin, por festejar los logros como propios, bancarse mis crisis, la escucha y compañía.

A mi directora Pao y mi co-directora Vicky, por abrirme las puertas de su trabajo, por enseñarme y acompañarme en este camino.

A Nati, mi docente consejera, por estar presente en cada circunstancia que se presentó, por la ayuda, la escucha y, sobre todo, por los consejos y la motivación que me brindó en cada conversación.

A la Universidad Nacional del Sur, por su excelencia y por haberme formado no solo académicamente, sino también como persona. Cada docente que me crucé hizo de mi paso por la UNS un hermoso recuerdo, a cada uno de ellos, GRACIAS! Gracias por haberme transmitido su pasión hacia la Biología.

*Solo queda agradecer. Porque sin ustedes nada sería igual. Porque sin ustedes, no sé si hubiera llegado hasta acá.*

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
<b>INDICE</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>OBJETIVOS</b> .....	9
<b>HIPÓTESIS</b> .....	9
<b>MATERIALES y MÉTODOS</b> .....	10
CULTIVOS MICROALGALES .....	10
DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA.....	11
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOMASA OBTENIDA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CULTIVOS DE CÉLULAS EPITELIALES DE LA RETINA .....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	13
<b>RESULTADOS</b> .....	14
<b>DISCUSIÓN</b> .....	23
<b>CONCLUSIONES</b> .....	26
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	27

## RESUMEN

El estudio de microalgas ha despertado gran interés debido a su capacidad de síntesis de biomoléculas de interés comercial y medicinal. Por ello, el objetivo de la presente Tesis de Grado fue desarrollar co-cultivos de dos microalgas aisladas de Bahía Blanca, *Chlorella* sp. y *Haematococcus pluviialis*, con el fin de evaluar si esta estrategia de cultivo aumenta la producción de biomasa y diversidad de biomoléculas. Además, se propuso evaluar su rol en células del epitelio pigmentado de retina (EPR).

Nuestros hallazgos indicaron que el cultivo conjunto de *H. pluviialis* (H) y *Chlorella* sp. (C) empleando una proporción H:C (1:1), aumentaron significativamente la producción de biomasa, en comparación con lo observado para cada una de esas especies en monocultivo, lo que sugiere la existencia de una interacción biológica beneficiosa entre ambas especies. Además, se observó un incremento en el contenido de lípidos, destacándose principalmente triglicéridos y los esteroides. Asimismo, se evidenció un aumento de la concentración de carotenoides totales, el cual se sugiere que se encuentra asociado con la mejora observada en la actividad antiradicalaria del co-cultivo H:C (1:1). Estos resultados resaltan el potencial de la estrategia de cultivo conjunto para mejorar la producción de biomoléculas al utilizar estas especies microalgales.

Asimismo, se demostró que la incubación de las células del epitelio pigmentado de retina (EPR) con extractos totales de las microalgas posee un efecto diferencial y dependiente de la concentración. A dosis elevadas (300 y 100 µg/ml) se detectaron cambios morfológicos compatibles con daño oxidativo, mientras que a dosis más bajas (50 y 25 µg/ml) no se observaron cambios en la morfología del EPR, lo que indicaría la ausencia de un efecto tóxico sobre el cultivo celular. Los resultados sobre el efecto protector de los extractos de *Chlorella* sp. y *H. pluviialis* en células sometidas a estrés oxidativo no fueron concluyentes y quedan pendientes para futuras investigaciones.

En conjunto, los resultados obtenidos destacan la importancia biotecnológica de la estrategia de cultivo conjunto de las especies microalgales evaluadas, y la importancia de considerar la cantidad de biomasa que se debe utilizar para realizar ensayos con cultivos celulares.

## INTRODUCCIÓN

El interés por el estudio de las microalgas ha aumentado en los últimos años. Su potencial como fuente natural de compuestos bioactivos como proteínas, vitaminas y pigmentos las convierte en una opción viable para su utilización a nivel industrial (Scodelaro Bilbao et al., 2016). A su vez, al ser recursos naturales renovables y sostenibles presentan un gran potencial en diversas áreas productivas como en la obtención de biocombustibles, productos medicinales bioactivos e ingredientes alimentarios, entre otros (Khan et al., 2018). Hasta el momento, los monocultivos han sido la estrategia más estudiada y aplicada (Bumbak et al., 2011). La utilización de cultivos conjuntos o co-cultivos de microalgas surge como una opción novedosa para mejorar su potencial biotecnológico (Rosero-Chasoy et al., 2021). Este tipo de sistemas proporciona protección contra los microorganismos invasores, previniendo así la contaminación. Además, mediante la liberación de metabolitos al medio de cultivo, se promueve y regula la comunicación e interacciones entre las especies de microalgas que conviven allí (Rashid et al., 2019). De esta manera, el cultivo conjunto permite inducir la expresión diferencial de genes respecto a cada especie en monocultivo (Zhu et al., 2015; 2017), aumentando así la producción de biomasa y/o la diversidad de productos a obtener (Padmaperuma et al., 2017). La implementación de co-cultivos también permite disminuir el costo de mano de obra y optimizar el uso de agua y nutrientes (Padmaperuma et al., 2018). Además, cabe destacar que el rendimiento de este tipo de cultivo está regulado por factores como la intensidad lumínica, la aireación, el suministro de carbono, nutrientes, pH y la temperatura, entre otros (Rashid et al., 2019).

Considerando lo expuesto, la implementación de la estrategia de co-cultivo de microalgas se establece como una alternativa valiosa considerando la gran diversidad de especies que existen en nuestro país. Ciertas microalgas se consideran una buena opción para este abordaje debido a que, en monocultivo, poseen altas tasas de crecimiento, tolerancia a condiciones ambientales hostiles y, además, sintetizan una gran variedad de moléculas con actividad biológica (Indrayani et al., 2019). Entre ellas se destacan ácidos grasos esenciales (Adarme-Vega, 2012), así como otras moléculas de interés biológico, como los esteroides y los pigmentos vegetales dada su capacidad hipocolesterolemia y poder antioxidante, respectivamente (Scodelaro Bilbao et al., 2020a). Particularmente, dos especies halladas en la región de Bahía Blanca, *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella* sp., se presentan atractivas para el cultivo conjunto.

*Haematococcus pluvialis* pertenece a la clase Chlorophyceae, es una microalga oleaginosa biflagelada unicelular, con un diámetro aproximado de 30 micrómetros, que presenta variaciones morfológicas y fisiológicas asociadas a su ciclo de vida. Cuando es sometida a condiciones de estrés, como intensidades altas de luz, deficiencia de nutrientes, altas concentraciones de sales, baja y alta temperatura, pierde la motilidad y cambia a una forma esférica. Luego, en caso de que las condiciones persistan, las células se enquistan, aumentan de tamaño y desarrollan una pared celular resistente (Morales et al., 2015; Khoo et al., 2019). Esta fase es conocida como la fase de acumulación donde las

aplanosporas asexuales se perciben como quistes rojos, en los cuales se acumula astaxantina (Mularczyk et al., 2020). La astaxantina (3,3-dihidroxi-B- caroteno-4,4-diona) es un antioxidante que pertenece al grupo de los carotenoides. Debido a su estructura química, puede atravesar la membrana lipídica de las células, protegiendo la superficie interna y externa de la acción oxidante por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Morales et al., 2015). Este pigmento es un compuesto prometedor en la prevención de enfermedades, considerando sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas, y, por lo tanto, como un potencial agente terapéutico para enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Sendra, 2019).

Las especies del género *Chlorella* son intensamente estudiadas debido a su importancia biotecnológica como fuente de moléculas vitales para la nutrición humana y materia prima para biocombustible (Kim et al., 2015). Son organismos unicelulares que poseen una forma esférica definida, miden de 2 a 10 micrómetros de diámetro y carecen de estructuras que les permitan desplazarse (Coronado-Reyes et al., 2020). Poseen una pared celular rígida que permite preservar la estructura, forma e integridad del contenido celular y, además, protegerla contra invasores y condiciones ambientales hostiles. Su tasa de crecimiento es elevada y responden ante la variación de las condiciones de cultivo realizando ajustes en su metabolismo que se traducen en la síntesis de metabolitos específicos (Safi et al., 2014). Entre los metabolitos primarios de importancia sintetizados por *Chlorella* sp. se encuentran lípidos, como ciertos ácidos grasos esenciales poliinsaturados (PUFA); proteínas conformadas por aminoácidos esenciales; carbohidratos, siendo el almidón el más abundante, y carotenoides resultantes del metabolismo secundario (Coronado-Reyes et al., 2020). Entre estos últimos se destacan las clorofilas y el beta-caroteno que se valora por su capacidad antioxidante y su efecto protector ante la aparición de diversas patologías como la degeneración de la retina, el aumento del colesterol sanguíneo y diversas enfermedades crónicas (Safi et al., 2014). En conjunto, estas moléculas y sus propiedades hacen que la biomasa de *Chlorella* sp. sea adecuada para la elaboración de suplementos (Kim et al., 2015).

Frente a lo mencionado, la presente Tesis de Grado propone desarrollar el cultivo conjunto de especies de agua dulce aisladas de Bahía Blanca y la región, particularmente *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella* sp., explorando si esta estrategia induce un aumento en la producción de moléculas de interés biológico, como lípidos neutros, esteroides y pigmentos con actividad antioxidante.

Por otro lado, considerando que ambas especies microalgales poseen moléculas con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, son candidatas ideales para atenuar el efecto de enfermedades que se caractericen por la presencia de ambientes oxidativos e inflamatorios. Particularmente en la retina, las enfermedades proliferativas del tejido se caracterizan por un aumento en el estrés oxidativo e inflamación de las células que naturalmente le prevén sostén estructural y metabólico a la retina: las células gliales de Müller y el epitelio pigmentado de la retina (Sendra, 2019).

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células pigmentadas con microvellosidades, situada entre la retina y la capa coroidea del ojo. Estas células desempeñan funciones claves como la absorción de luz, protección contra la fotooxidación y en la regulación del flujo de nutrientes, iones y agua entre la retina y los capilares de la capa coroides. Además, participan en la fagocitosis de sustancias extrañas y liberan factores de crecimiento que son importantes para el funcionamiento adecuado de la retina (Chiba et al., 2013; Ponnalagu et al., 2017).

En las enfermedades proliferativas de la retina, como la retinopatía diabética, donde los niveles altos de glucosa producen estrés oxidativo, las células epiteliales experimentan una serie de cambios morfológicos, modificando su morfología cuboide y adquiriendo forma de huso (Shu y Loviu et al., 2017). Este proceso da como resultado un nuevo tipo celular mesenquimal, denominado miofibroblasto, que invade la retina y genera una cicatriz fibrosa, la cual altera la ordenada arquitectura del tejido y culmina en la pérdida de la visión. Los mecanismos detrás de estos cambios morfológicos aún no se comprenden completamente, aunque investigaciones recientes demuestran que los esfingolípidos, una de las tres clases principales de lípidos de la membrana, promueven la transición hacia el fenotipo mesenquimal. La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un lípido intermedio producido por la acción catalítica de dos esfingosinas quinasas (SphK) diferentes, SphK1 y SphK2. La SphK1 está presente en todos los tipos celulares, se ubica en el citosol y es la responsable de generar la mayor cantidad de S1P, cuyas funciones en la supervivencia, diferenciación, angiogénesis, inflamación y migración están ampliamente identificadas (Spiegel y Milstein, 2003; Simon et al., 2021). En la retina S1P tiene propiedades tanto beneficiosas como perjudiciales. Por un lado, promueve la supervivencia y diferenciación de las neuronas fotorreceptoras (Miranda et al., 2009). Sin embargo, la S1P también desencadena procesos que afectan negativamente el funcionamiento de las células de apoyo de la retina. Investigaciones recientes demuestran que S1P estimula la migración y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en las células gliales y epiteliales de la retina (Simón et al., 2015; Simón et al., 2022). Paralelamente, hallazgos muy recientes sugieren que la ausencia de S1P conlleva a alteraciones morfológicas y moleculares en las células epiteliales, entre ellas un aumento del estrés oxidativo, la pérdida de las uniones intercelulares y un cambio morfológico hacia un fenotipo ahusado mesenquimal (Torlaschi et al., SAIC 2023, Torlaschi et al., publicación en preparación).

En relación a esto, se ha reportado que algunas especies de microalgas en monocultivo tienen propiedades protectoras en cultivos de células epiteliales de la retina. Este efecto se debe principalmente a la presencia de carotenoides y ácidos grasos esenciales en las microalgas que pueden prevenir el daño oxidativo causado por niveles elevados de glucosa (Lauritano e Ianora, 2016). A la luz de los mencionados antecedentes, y como parte final del presente trabajo de Tesis, nos propusimos investigar que rol juegan los cultivos microalgales de *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella* sp. ejercen efectos antioxidantes y/o protectores en cultivos de células del EPR sometidos a estrés oxidativo.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar co-cultivos empleando microalgas aisladas de la región de Bahía Blanca para aumentar la biomasa y la diversidad de sustancias bioactivas obtenidas a partir de ellos. Evaluar el rol de la biomasa obtenida en cultivos de células del epitelio pigmentado de la retina (EPR).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar cultivos conjuntos de especies de microalgas, a escala de laboratorio, en los cuales se observe un crecimiento óptimo y armónico de las especies involucradas.
- Determinar la composición bioquímica de la biomasa resultante, evaluando la producción de moléculas con actividad biológica.
- Optimizar la concentración de biomasa microalgal para su ensayo en cultivos de células epiteliales de retina.
- Evaluar el efecto de la biomasa obtenida sobre dos líneas celulares humanas derivadas del EPR (ARPE 19 y D407) sometidas a estrés oxidativo.

### **HIPÓTESIS GENERAL**

Se plantea como hipótesis de trabajo que el cultivo conjunto de especies de microalgas de agua dulce, aisladas de la región de Bahía Blanca, es una estrategia apropiada para aumentar el rendimiento de los cultivos microalgales y la producción de moléculas con actividad biológica. A su vez, se postula que estas microalgas ejercen un efecto positivo sobre células del EPR, permitiendo preservar su morfología cuboide y evitando cambios compatibles con la presencia de estrés oxidativo y/o por la ausencia de síntesis de esfingosina-1-fosfato (S1P).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- CULTIVOS MICROALGALES

#### A. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE MICROALGAS

Las especies utilizadas para el desarrollo de la presente Tesis de Grado, *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella* sp., fueron aisladas a partir de cursos de agua de la región de Bahía Blanca y forman parte de la colección disponible en el Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA, CERZOS, CONICET-UNS). Las mismas se mantuvieron en medio Basal de Bold ( $\text{NaNO}_3$  0,25 g L<sup>-1</sup>;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,025 g L<sup>-1</sup>;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,075 g L<sup>-1</sup>;  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  0,175 g L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,075 g L<sup>-1</sup>;  $\text{NaCl}$  0,025 g L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $1,0 \times 10^{-3}$  g L<sup>-1</sup>;  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $2,8 \times 10^{-3}$  g L<sup>-1</sup>;  $\text{MnCl}_2$   $1,8 \times 10^{-3}$  g L<sup>-1</sup>;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,2 \times 10^{-3}$  g L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0,4 \times 10^{-3}$  g/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $0,08 \times 10^{-3}$  gL<sup>-1</sup>;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $0,05 \times 10^{-3}$  g L<sup>-1</sup>), en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de intensidad y exposición de luz (60  $\mu\text{moles}$  de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; fotoperiodo 16/8 horas (luz/oscuridad)), temperatura (20 +/- 1°C), agitación (30 rpm), aireación constante y pH = 7,0 (Scodelaro et al., 2016; 2020a). Las células se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento realizando repiques quincenales.

#### B. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos propuestos, se utilizaron monocultivos de *H. pluvialis* y de *Chlorella* sp. (condiciones control). A su vez, se evaluaron tres condiciones diferentes de cultivo conjunto, considerando la proporción relativa de cada una de las especies (C:H) 1:2, 1:1 y 2:1. Para ello, se partió de inóculos de densidad celular inicial de  $2,56 \times 10^4$  células/mL de cada una de las especies evaluadas. Los ensayos se realizaron por triplicado, a escala de laboratorio, en Erlenmeyer, contemplando un volumen final de 250 mL.

#### C. DETERMINACIÓN DE DENSIDAD CELULAR

Se llevaron a cabo conteos celulares diarios utilizando una cámara de Neubauer según se detalla en Scodelaro Bilbao et al., 2016; 2020a.

#### D. DETERMINACIÓN DE PESO SECO

La producción de biomasa se evaluó mediante la cuantificación del peso seco. Éste se determinó por triplicado empleando filtros Whatman GF/C (1,2  $\mu\text{m}$ ) previamente acondicionados y pesados. Una vez filtradas las muestras se realizaron lavados con 10 mL de agua destilada y se secaron durante 24 horas a 70°C en estufa. Luego, se enfriaron en desecador y se registró el peso obtenido en balanza analítica (Bongiovani et al., 2019; Scodelaro Bilbao et al., 2016).

## **E. MICROSCOPIA ÓPTICA**

Se realizaron observaciones periódicas de las células, empleando un microscopio óptico, para la detección de posibles cambios morfológicos en las especies involucradas. Para ello, se registró el tamaño celular de 40 células por condición ensayada (Scodelaro Bilbao et al., 2016).

## **2- DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA**

### **A. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LÍPIDOS NEUTROS**

Se realizó mediante espectrofluorimetría utilizando el colorante lipofílico 9-(dietilamino)-5H-benzo[a]fenoxazina-5-ona (Rojo Nilo, Sigma-Aldrich, USA), según el protocolo que se detalla en Almeyda et al., 2020.

### **B. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS (TAG) Y ESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

Se realizó a partir de un extracto lipídico total obtenido mediante la aplicación del método de Folch (Folch et al., 1957). Luego, mediante cromatografía unidimensional de capa delgada (TLC), utilizando sílica G (Merck) como fase estacionaria y una fase móvil compuesta por n-hexano:éter dietílico (80:20 v/v) para separar los esteroides y TAG de cada muestra. A continuación, los lípidos fueron eluidos y cuantificados mediante los kits comerciales TG color GPO/ PAPA AA y Colestat enzimático (Wiener Lab), siguiendo las instrucciones del fabricante (Scodelaro Bilbao et al., 2020).

### **C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS**

La concentración de pigmentos se determinó por espectrofotometría aplicando el método establecido por Jeffrey y Humphrey (1975) (Scodelaro Bilbao et al., 2016).

### **D. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Se utilizó el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, USA) sobre una alícuota de biomasa re-suspendida en metanol. Se midió la absorbancia del extracto a una longitud de onda de 520 nm a tiempo cero y luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (Scodelaro Bilbao et al., 2016).

### **3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BIOMASA OBTENIDA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CULTIVOS DE CÉLULAS EPITELIALES DE LA RETINA**

#### **A. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS MICROALGALES**

Para la preparación de los extractos microalgales totales, correspondientes a cada condición ensayada, se utilizaron 15 mg de biomasa liofilizada en cada caso. A continuación, se añadieron 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como vehículo. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante un 1 minuto. Como resultado del proceso, se obtuvieron tres soluciones concentradas de extractos microalgales: una de *Chlorella* sp. (denominada C), otra de *H. pluvialis* (H) y una tercera del co-cultivo de ambas especies mencionadas H:C (1:1). Cada una de ellas, en una concentración final de 50 mg biomasa/mL.

#### **B. CULTIVOS CELULARES EPITELIALES**

Se emplearon cultivos de células epiteliales utilizando las líneas celulares humanas ARPE-19 y D407, ambas originadas del EPR. Estas líneas se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), con suplementación de suero fetal bovino (SFB) al 10% o 5%, respectivamente. Las células se mantuvieron en condiciones óptimas de viabilidad mediante incubación a 36,5°C con 5% de CO<sub>2</sub> en un Incubador Sanyo con CO<sub>2</sub>. Rutinariamente, las células se repicaron utilizando Tripsina/EDTA para despegarlas del sustrato y luego se transfirieron a un nuevo frasco de cultivo, realizando diluciones del cultivo (1:3 para ARPE-19 y 1:10 para D407) para mantenerlas en crecimiento óptimo. En todos los ensayos se utilizaron pasajes menores a 20, de forma de asegurar la conservación de las características epiteliales.

Para realizar los experimentos, las células se sembraron en cápsulas plásticas de 35 mm en DMEM con SFB. Una vez que las células alcanzaron un nivel de confluencia del 80% se sustituyó el medio de cultivo por DMEM sin suero por 24 horas. Tras este periodo, los cultivos se suplementaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; el inhibidor de la esfingosina quinasa 1 (SphK1) y/o los extractos de microalgas, según el diseño experimental.

#### **C. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MICROALGAS SOBRE LOS CULTIVOS**

En primer lugar, se determinó la toxicidad del extracto total de las microalgas sobre los cultivos de células epiteliales. Para ello, se expuso a las células de la línea ARPE-19 a diferentes concentraciones de *H. pluvialis* y *Chlorella* sp. (300 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml y 25 µg/ml) en placas multiwell por 24 hs. Se evaluó por microscopía óptica el número de células epiteliales y su morfología tras la suplementación con cada uno de los extractos. Cabe destacar que las concentraciones ensayadas fueron obtenidas de la bibliografía, en las cuales se observó el poder antioxidante de los extractos microalgales en cultivos de células pancreáticas (Lin et al., 2014).

#### **D. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ESFINGOSINA QUINASA 1 (SphKI2)**

Previamente en el laboratorio de Neurobiología del INIBIBB se estableció que la ausencia de SIP endógena en las células del EPR provoca alteraciones morfológicas significativas, como la aparición de vacuolas, la pérdida de la morfología epitelial cuboide y la transición hacia células ahusadas (Torlaschi et al., SAIC 2023, Torlaschi et al; publicación en preparación). Con estos antecedentes decidimos investigar si el extracto total de las microalgas era capaz de prevenir estos cambios. Para ello, los cultivos de ARPE 19 fueron pre-incubados con los extractos de microalgas por 12 hs, tras lo cual se suplementaron con el inhibidor de esfingosina quinasa 1 (SphKI2), de manera de inhibir la síntesis endógena de SIP, en una concentración 15  $\mu$ M por 24 hs. Luego se evaluó la morfología celular mediante análisis por microscopía óptica.

#### **E. MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO**

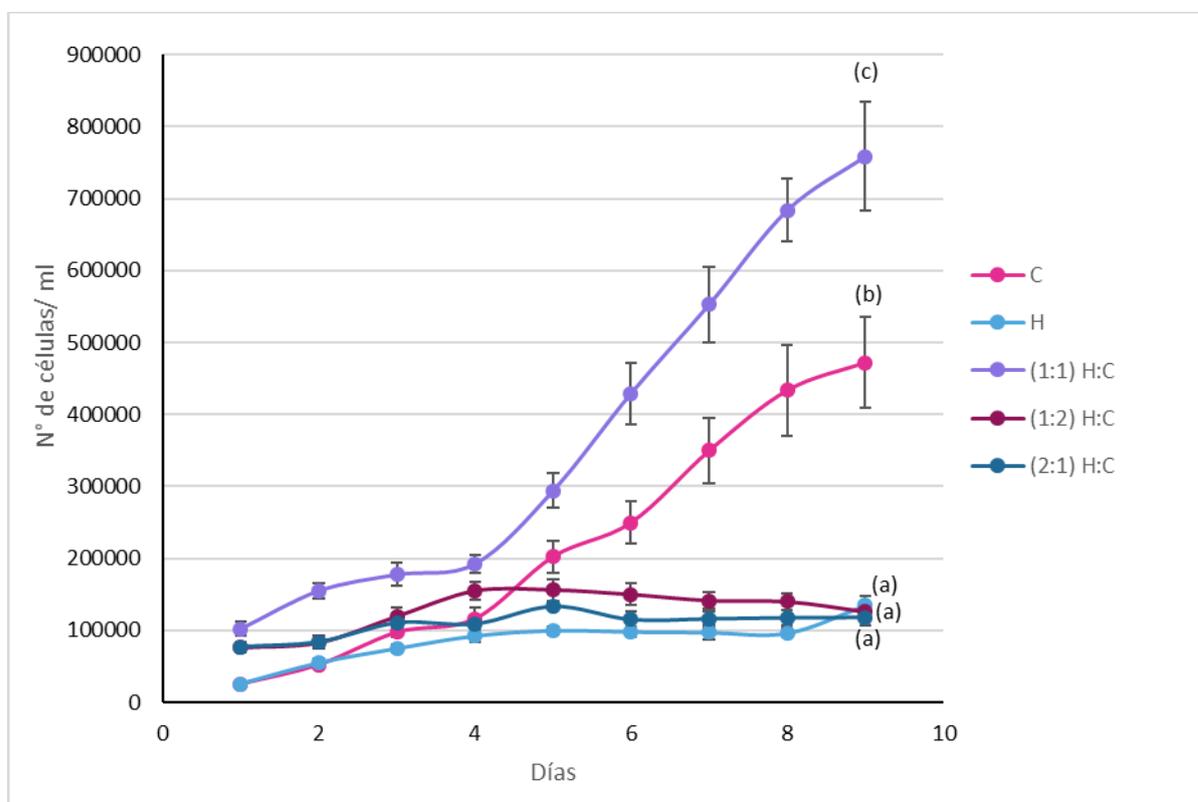
Para evaluar la capacidad antioxidante de las microalgas se llevó a cabo un ensayo en placas multiwell utilizando la línea celular D407. Las células se cultivaron inicialmente en medio DMEM con SFB al 5% por 24 hs, tras lo cual se privaron del mismo por otras 24 hs. Después se añadió peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a una concentración 500  $\mu$ M y se dejó actuar durante 6 horas. Posteriormente, se examinaron las células por microscopía óptica para detectar alteraciones morfológicas anormales, como la presencia de vacuolas o la transición hacia formas ahusadas.

#### **4- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos representan el promedio de, al menos, tres experimentos distintos. Se determinó su significancia estadística mediante un análisis de ANOVA, considerando como significativo un valor de  $p < 0,05$  y altamente significativo un valor de  $p < 0,01$ .

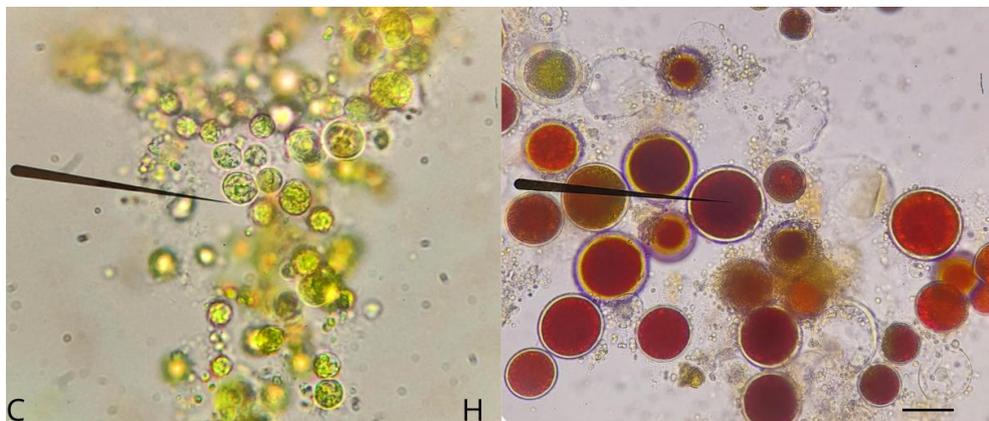
## RESULTADOS

En primer lugar, se analizó el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* (H) y *Chlorella* sp. (C) tanto en monocultivo como en cultivos conjuntos preparados empleando diferentes proporciones relativas de ambas especies (H:C (1:1); H:C (1:2); H:C (2:1)). Como se observa en la **Figura 1**, los resultados indican que *Chlorella* sp. en monocultivo mostró un aumento significativo y sostenido en la densidad celular alcanzando su máximo de 472.500 células/ml hacia el final del ensayo (Día 9); mientras que *H. pluvialis* en monocultivo experimentó un aumento menos marcado en la cantidad de células, alcanzando el máximo en el día 6 con 98.000 células/ml, valor que se mantuvo constante hasta el final del ensayo (Día 9). Con respecto a los co-cultivos, las proporciones H:C (1:2) y H:C (2:1) evidenciaron un perfil de crecimiento similar, sin diferencias estadísticamente significativas entre sí, mostrando un aumento de magnitud semejante en la densidad celular hasta el día 5; luego éste se mantuvo constante. A diferencia de lo observado para estas condiciones, el co-cultivo H:C (1:1) presentó un marcado aumento en la densidad celular, siendo éste estadísticamente significativo y alcanzando valores por encima de los evidenciados en todas las condiciones ensayadas (758.750 células/ml al final del ensayo) (**Figura 1**).

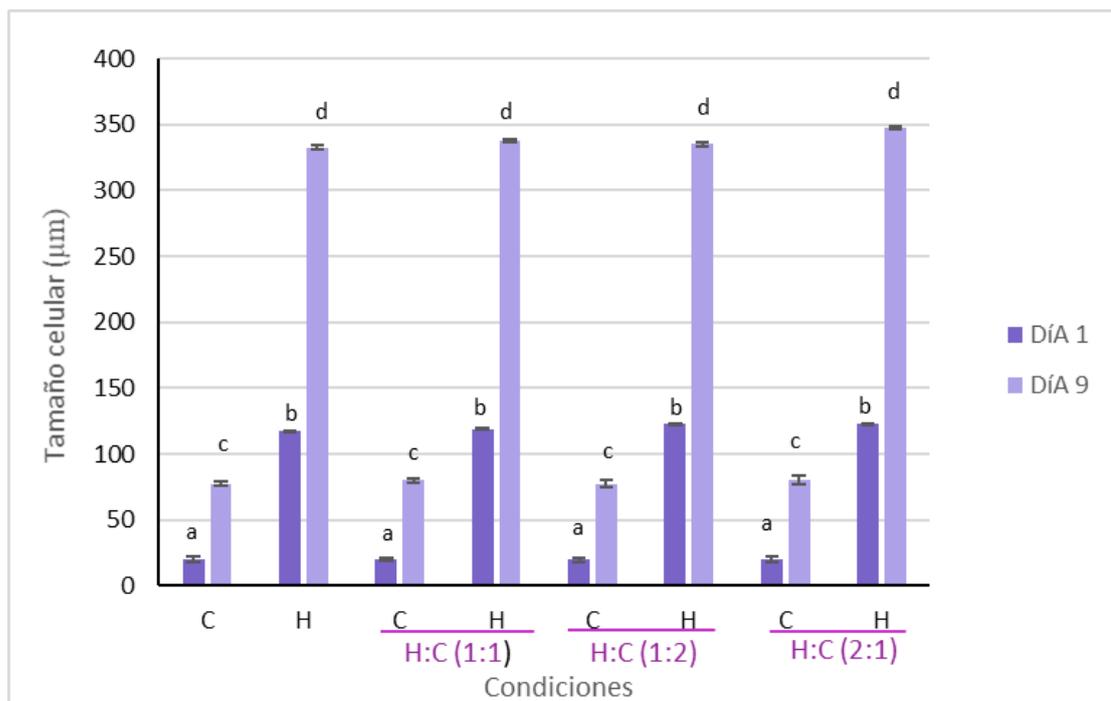


**Figura 1. Representación gráfica correspondiente a densidad celular en mono y co-cultivos.** Las especies se identificaron como H para *Haematococcus pluvialis* y C para *Chlorella* sp. Los co-cultivos se indican como H:C seguido de la proporción de cada especie. Se realizaron tres repeticiones (n=3) y se compararon sus respectivas varianzas, representado la (a) el menor valor y la (c) el mayor. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se expresan con letras diferentes.

Para detectar posibles cambios morfológicos como consecuencia de la aplicación de la estrategia de cultivo conjunto, se analizó el tamaño celular de *H. pluvialis* y *Chlorella* sp. tanto en monocultivo como en las diferentes condiciones de co-cultivo ensayadas. El análisis, llevado a cabo mediante microscopía óptica, evidenció que *H. pluvialis* posee un mayor tamaño celular que *Chlorella* sp. en todas las condiciones estudiadas, tanto en monocultivo como en co-cultivo (**Figura 2**). Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño celular de las especies utilizadas al comparar el inicio (Día 1) y con el final (Día 9) de cada ensayo. Sin embargo, no se observaron diferencias relevantes desde el punto de vista estadístico, entre monocultivos y co-cultivos (**Figura 3**).



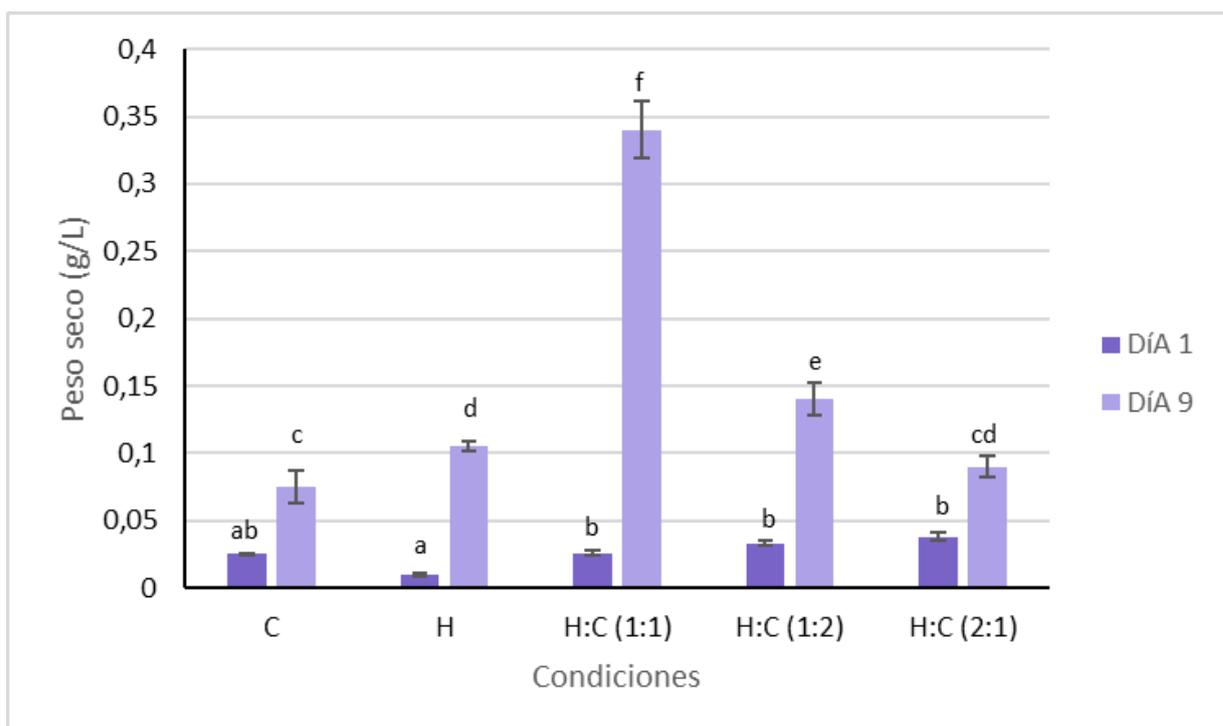
**Figura 2.** Fotografías tomadas del microscopio óptico, donde se observa la morfología celular de *Chlorella* sp (C) y de *H. pluvialis* (H). La escala utilizada es de 2,5  $\mu\text{m}$ , según se indica con la barra correspondiente.



**Figura 3. Representación gráfica del tamaño celular en mono y co-cultivos.** Las especies se identificaron como H para *H. pluvialis* y C para *Chlorella* sp. Los co-cultivos se señalan como H:C seguido de la proporción relativa de cada especie. El cultivo se llevó a cabo durante 10 días; se muestran los resultados correspondientes al inicio (Día 1) y final (Día 9). Se realizaron tres ensayos (n=3) y se compararon sus respectivas varianzas. Las

diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se muestran con letras diferentes, representando la (a) el menor valor y la (c) el mayor.

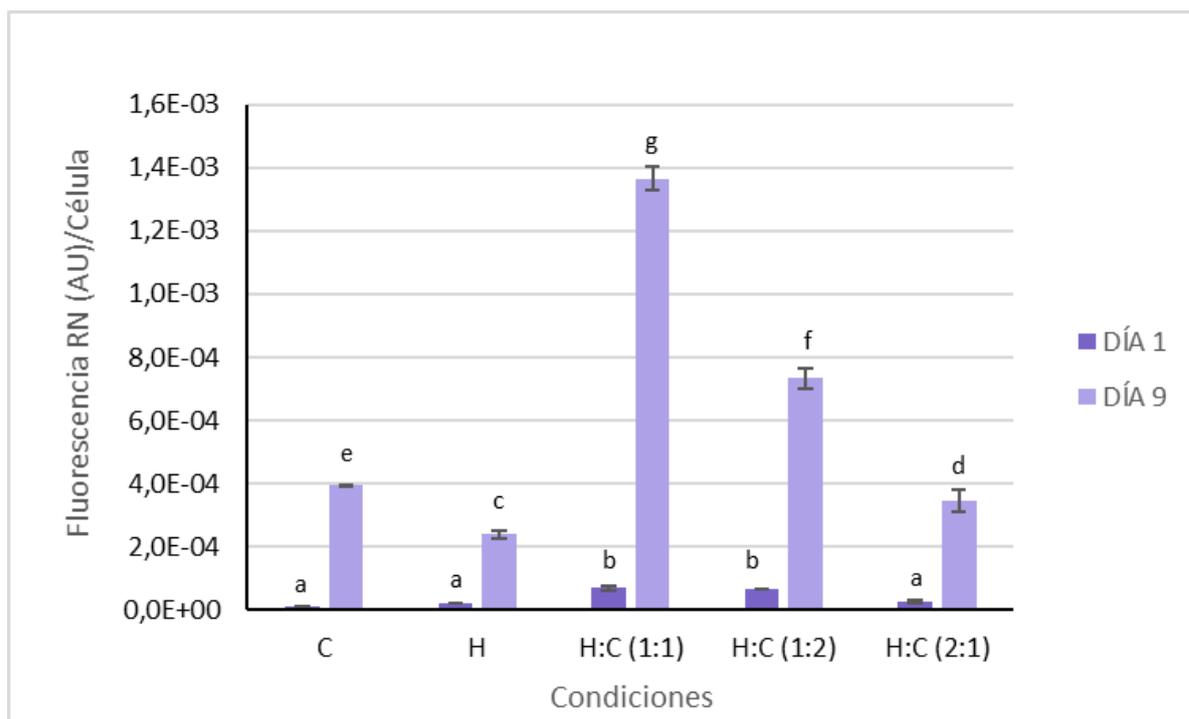
Respecto a la producción de biomasa, tal como se observa en la **Figura 4**, *H. pluvialis* registró un valor mayor respecto del obtenido para *Chlorella* sp., siendo estos de  $\sim 0,105$  g/L y  $\sim 0,075$  g/L, respectivamente. Por otro lado, los co-cultivos H:C 1:1 y 1:2 mostraron aumentos estadísticamente significativos respecto de la producción de biomasa y en comparación con los valores registrados para cada una de las especies en monocultivo. En relación a esto, la proporción H:C (1:1) evidenció el máximo valor ( $\sim 0,340$  g/L), siguiéndolo en magnitud el co-cultivo H:C (1:2) ( $\sim 0,140$  g/L). Finalmente, la condición H:C (2:1) no presentó diferencias respecto del monocultivo de H y C, alcanzando un valor aproximado de  $0,090$  g/L.



**Figura 4. Análisis de la producción de biomasa en mono y co-cultivos.** Resumen de los valores de peso seco, expresados en gramos por litro (g/L), obtenidos para todas las condiciones ensayadas al comienzo (Día 1) y final (Día 9) de cada ensayo ( $n=3$ ). Se identifica como H a *H. pluvialis* y como C a *Chlorella* sp. Los co-cultivos se identifican con H:C seguido de la proporción de cada especie. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se expresan empleando letras diferentes.

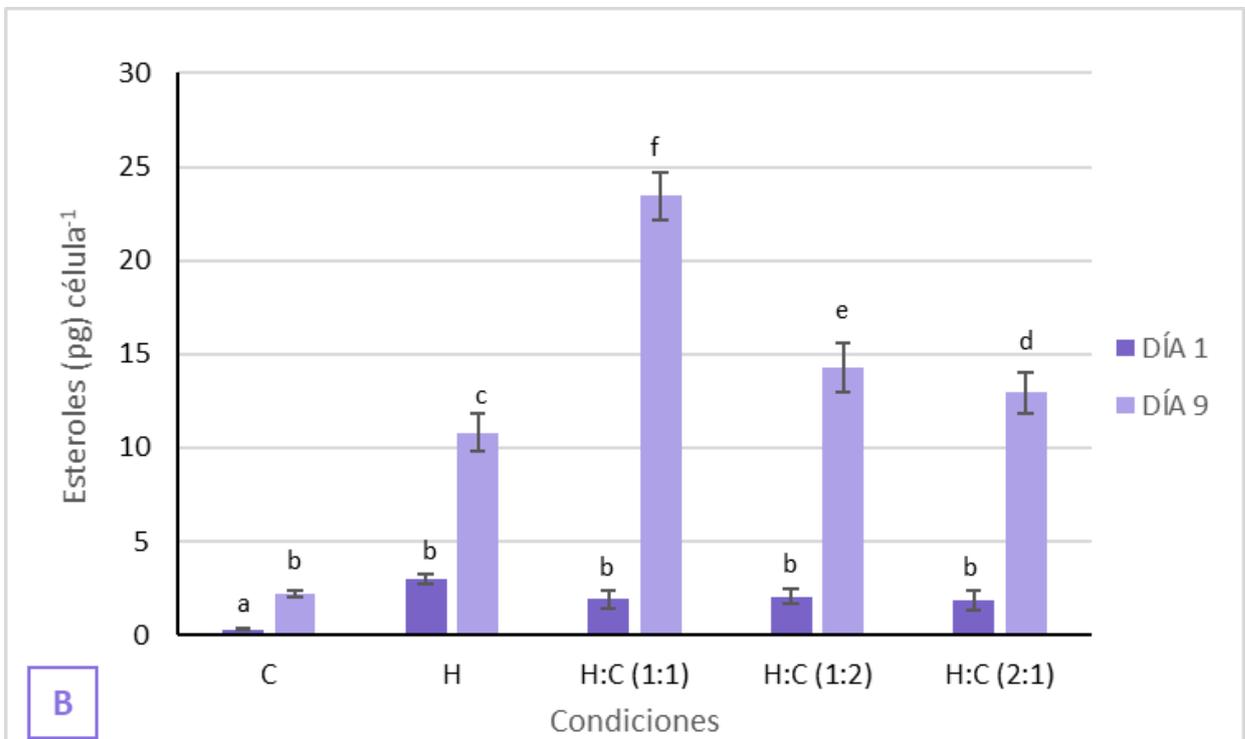
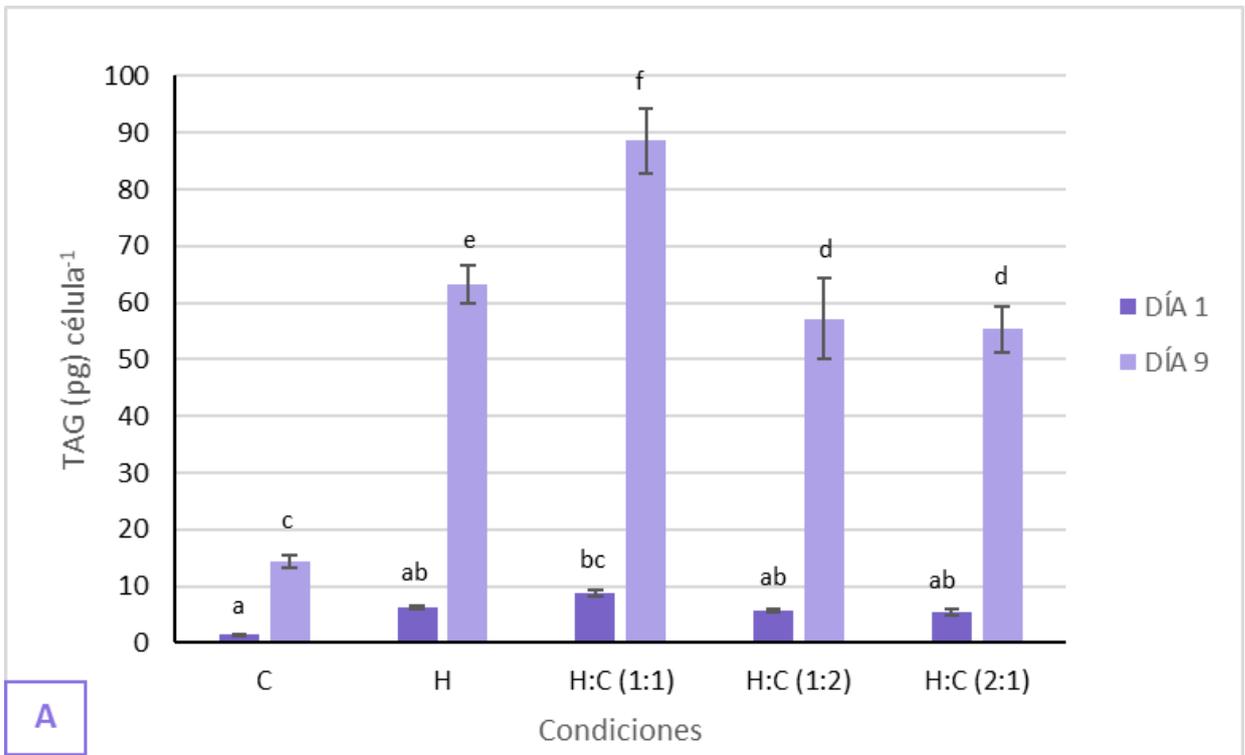
Para evaluar la presencia de lípidos neutros (LN), se utilizó el colorante lipofílico Rojo Nilo y se cuantificó su intensidad de fluorescencia mediante espectrofluorimetría. Los resultados obtenidos al final de cada ensayo, luego de 9 días de cultivo, mostraron un aumento estadísticamente significativo de la fluorescencia de Rojo Nilo en todas las condiciones experimentales evaluadas, lo cual se correlaciona con un aumento en la concentración de lípidos neutros. Respecto a los cultivos conjuntos, las condiciones H:C (1:1) y (1:2) alcanzaron los mayores valores en comparación con los respectivos

monocultivos, siendo la primera la que registró el nivel más alto de lípidos neutros. Este valor fue aún mayor que la suma de los valores obtenidos para cada una de las especies en monocultivo (**Figura 5**).



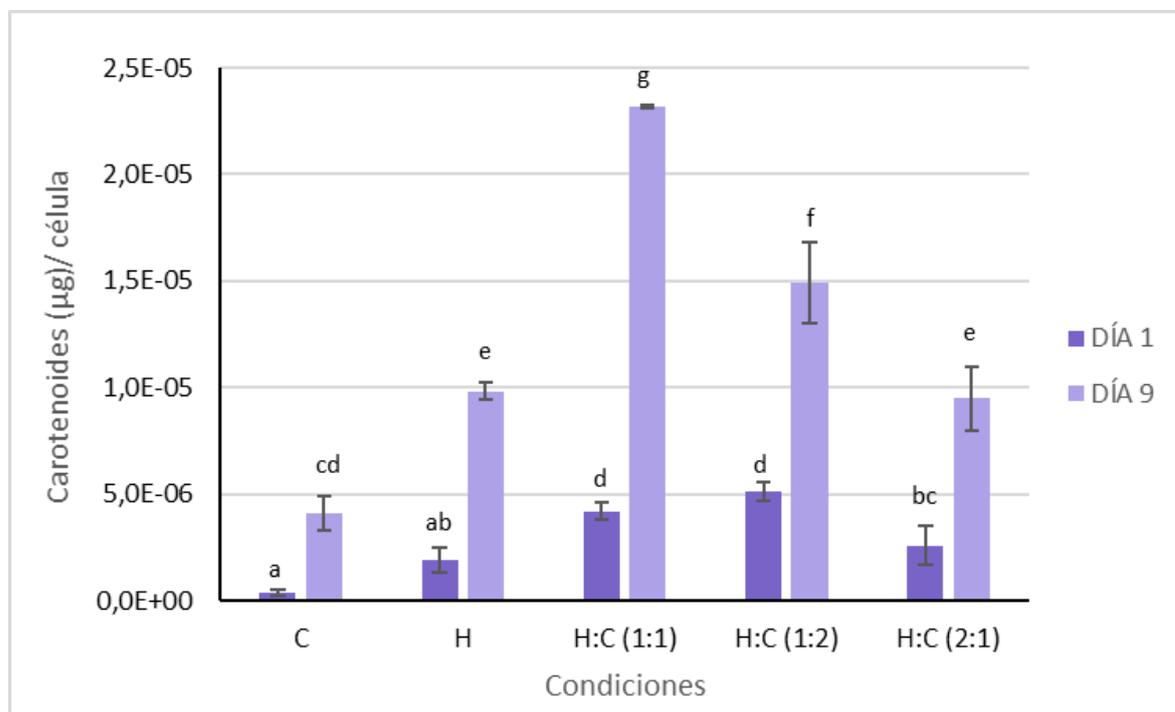
**Figura 5. Estimación de la presencia de lípidos neutros.** El gráfico representa los valores promedio de fluorescencia de Rojo Nilo (RN), expresada en unidades arbitrarias (AU). Se muestran los resultados obtenidos al inicio (Día 1) y al final (Día 9) de cada experimento (n=3). Las especies fueron identificadas como H (*H. pluviialis*) y C (*Chlorella* sp.). Los cultivos conjuntos se identifican como H:C, seguido de la proporción empleada de cada especie. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se expresan empleando letras diferentes.

A continuación, se determinó el contenido de triacilglicéridos (TAG) y esteroles de la biomasa obtenida tras 9 días de cultivo. Respecto a los TAG, tal como se observa en la **Figura 6a**, se observó un incremento estadísticamente significativo en todas las condiciones ensayadas, en comparación con los valores obtenidos al inicio. Considerando los monocultivos, *H. pluviialis* alcanzó un valor ~3,5 veces mayor que el registrado para *Chlorella* sp. En relación a los cultivos conjuntos, la condición H:C (1:1) alcanzó el máximo valor de TAG (~ 90 picogramos (pg) célula<sup>-1</sup>), mientras que las condiciones H:C (1:2) y (2:1) no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al contenido de TAG registrado para *H. pluviialis* en monocultivo. En cuanto al contenido de esteroles, los resultados obtenidos arrojaron un perfil similar al descrito para los TAG para todas las condiciones ensayadas, destacándose entre ellas el cultivo conjunto H:C (1:1), en el cual se alcanzó un valor máximo de ~24 pg célula<sup>-1</sup> (**Figura 6b**).



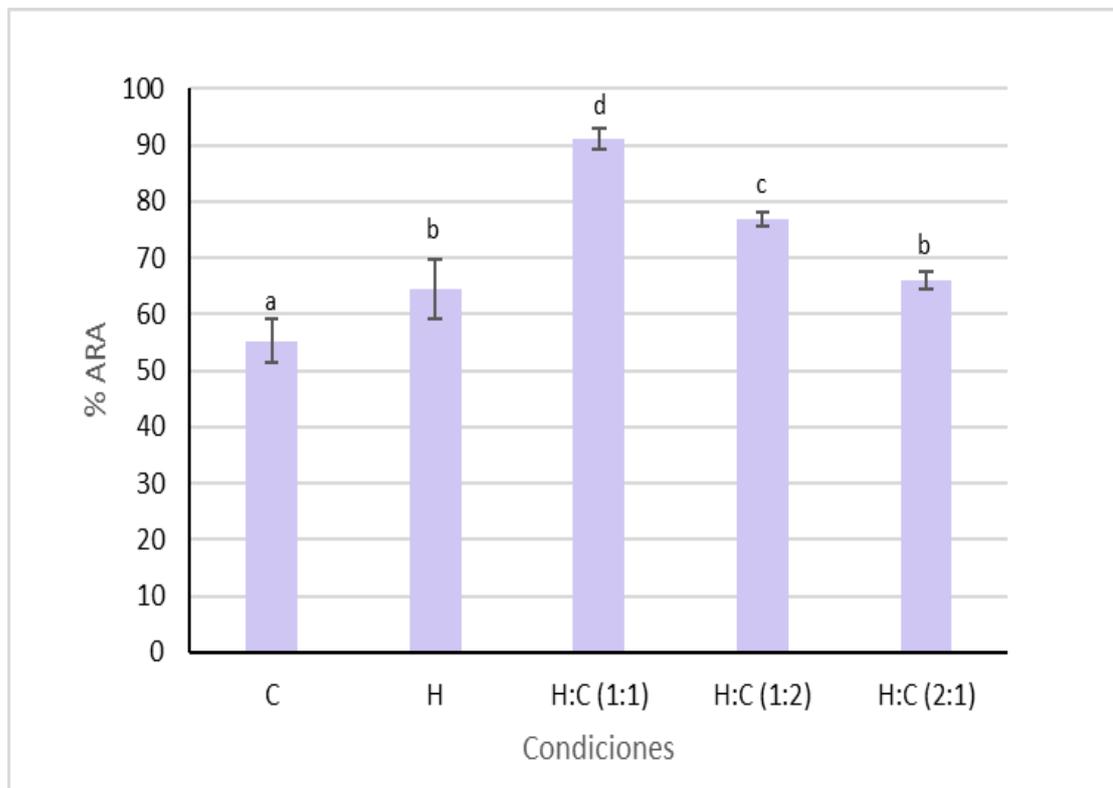
**Figuras 6. Contenido de TAG (a) y esteroles (b) en monocultivos y co-cultivos.** Las mediciones se hicieron al inicio (Día 1) y al final (Día 9) de cada ensayo. Los cultivos se identificaron como H para *H. pluvialis* y como C para *Chlorella* sp. Los co-cultivos se identifican como H:C seguido de la proporción de cada especie. Se realizaron tres réplicas para cada muestra (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se muestran con letras diferentes, representando la (a) el menor valor y la (f) el mayor.

La cuantificación espectrofotométrica de carotenoides (**Figura 7**) mostró que, al final de cada ensayo (Día 9), *H. pluvialis* fue la especie en monocultivo que evidenció el valor más elevado de estos pigmentos liposolubles. Por otro lado, el cultivo conjunto H:C (1:1) mostró el valor más elevado de carotenoides ( $2,3 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{célula}$ ) respecto de los cultivos conjuntos evaluados y, también, considerando todas las condiciones ensayadas.



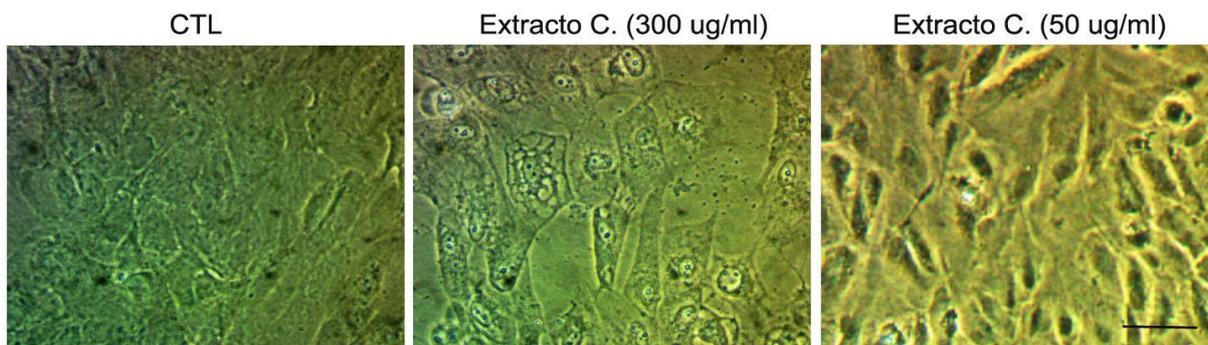
**Figura 7. Representación gráfica del contenido de carotenoides al inicio y al final de cada ensayo (DÍA 1 y DÍA 9).** Las mediciones se llevaron a cabo tanto en monocultivos como en co-cultivos, según lo indicado en Scodelaro et al., 2016. Se utilizaron tres réplicas (n=3) para cada grupo. Las especies fueron identificadas como H para *H. pluvialis* y C para *Chlorella* sp. Los co-cultivos fueron representados como H:C seguido de la proporción de cada especie. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se muestran con letras diferentes, representado la (a) el menor valor y la (g) el mayor.

Considerando los resultados obtenidos en relación a la concentración de carotenoides totales, se evaluó la capacidad antioxidante de la biomasa, expresándola como porcentaje de actividad anti-radicalaria (% ARA) (**Figura 8**). Los co-cultivos H:C (1:1) y (1:2) mostraron los valores más elevados de actividad antioxidante, alcanzando valores de ~91% y ~78%, respectivamente. La proporción H:C (2:1) no presentó diferencias significativas en comparación con el monocultivo de *H. pluvialis*, evidenciando ambas un valor cercano al 65% de ARA. Por último, *Chlorella* sp. obtuvo el valor más bajo, siendo éste significativamente menor al del resto de las condiciones evaluadas.



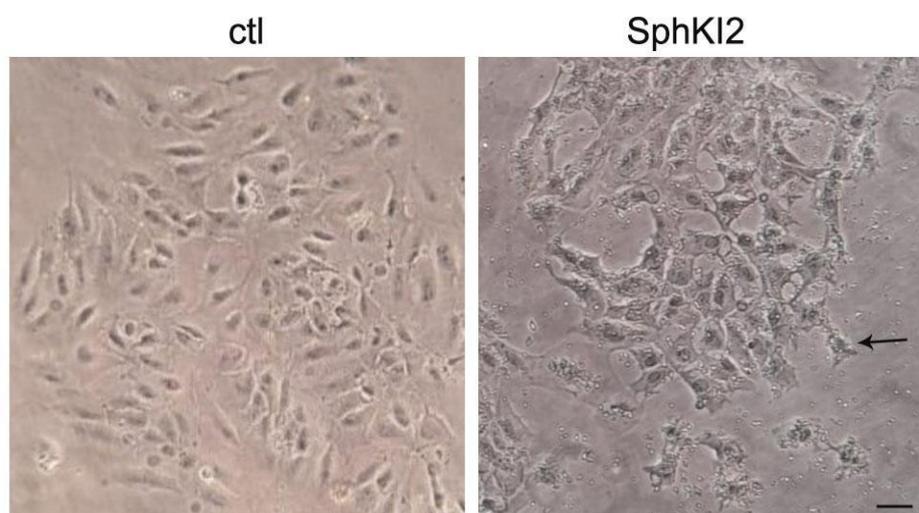
**Figura 8. Representación gráfica de la capacidad antioxidante en cada condición.** Se identificó a *H. pluvialis* como H y a *Chlorella* sp. como C. Los co-cultivos fueron identificados como H:C seguido de la proporción de cada especie. Las mediciones se efectuaron en monocultivos y en co-cultivos, siguiendo el método descrito por Scodelaro et al., 2016. Se realizaron tres réplicas (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) se muestran con letras diferentes, representado la (a) el menor valor y la (d) el mayor.

Una vez caracterizada la composición bioquímica de las especies de microalgas, se procedió a evaluar el efecto de esta biomasa sobre cultivos de células de la retina. En primer lugar, se evaluó la toxicidad del extracto total de microalgas sobre cultivos de células del EPR. Para ello, se realizaron observaciones al microscopio óptico luego de 24 horas de tratamiento con las distintas concentraciones del extracto. Se observó que tanto *Chlorella* sp. (C) como *H. pluvialis* (H), en las concentraciones de 300  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$ , provocaron cambios significativos en la morfología celular, tales como la presencia de vacuolas refringentes, granulaciones citoplasmáticas, bordes irregulares y fenotipo celular ahusado, cambios compatibles con toxicidad celular (**Figura 9, panel central**). Por el contrario, a concentraciones menores (50  $\mu\text{g/ml}$  y 25  $\mu\text{g/ml}$ ), el extracto total de cada una de las microalgas no resultó tóxico para los cultivos epiteliales (**Figura 9, panel derecho**), por lo cual se determinó que eran las concentraciones adecuadas para los futuros ensayos.



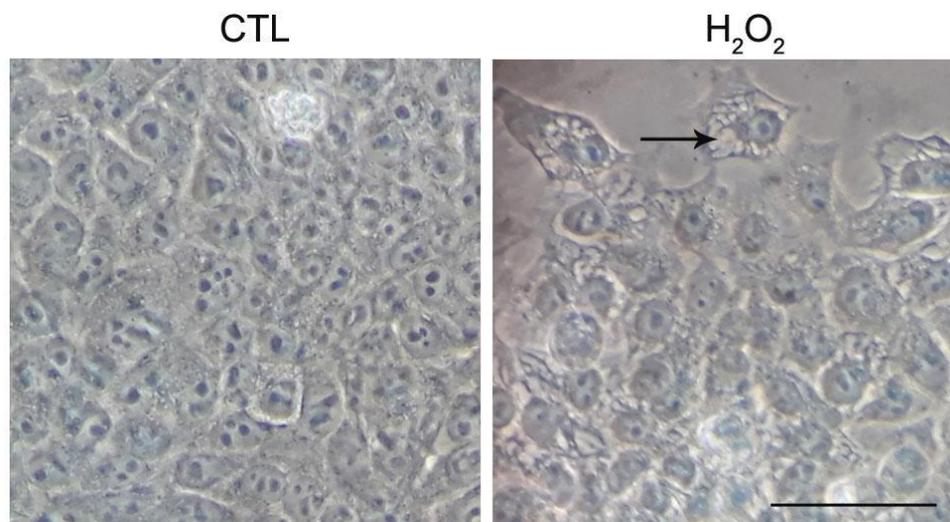
**Figura 9.** Imágenes capturadas mediante microscopía óptica donde se perciben cambios en la morfología celular evidenciando la toxicidad de los extractos de *Chlorella* sp. luego de 24 horas de tratamiento. **CTL:** morfología de las células control, se observan células normales. **Extracto C (300 µg/ml):** Se observan alteraciones en la morfología celular, esto sugiere que son concentraciones tóxicas para los cultivos celulares. Lo mismo se observó para el tratamiento con una concentración de 100 µg/ml de extracto total. **Extracto C (50 µg/ml):** Se visualizan algunas células con alteraciones morfológicas. Sin embargo, la gran mayoría no posee alteraciones y se asemejan al fenotipo celular normal. Se notaron cambios similares al utilizar los extractos totales de *H. pluvialis* en todas las concentraciones ensayadas.

A continuación, se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la enzima esfingosina quinasa 1 (SphKI2) y se examinaron los cambios morfológicos mediante microscopía óptica. Como se muestra en la **Figura 10**, el tratamiento con SphKI2 produjo una notable alteración de la morfología celular, con interacciones célula-célula más débiles, interrupción en la homogeneidad de la monocapa celular y pérdida del aspecto en empedrado característico del epitelio. Por el contrario, estos cambios no se observaron en los cultivos control, tratados con el vehículo (DMSO) del inhibidor.



**Figura 10.** Fotografías tomadas del microscopio óptico donde se observa la morfología de las células epiteliales. **CTL:** Morfología de los cultivos control, se observan células normales. **SphKI2:** Morfología de las células con tratamiento con el inhibidor SphKI2, se observan células anormales. La escala utilizada es de 30 micras (µm).

Paralelamente se puso a punto el ensayo de estrés oxidativo. Para ello, cultivos de la línea D407 se incubaron con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y se examinaron, mediante microscopía óptica, cambios en la morfología celular. Se contabilizaron las células y se las clasificó como normales -aquellas con morfología cuboide típica de epitelio- o anormales - aquellas que evidencian alteraciones en la morfología celular como vacuolas, granulaciones y formas más ahusadas-. Como se observa en la **Figura 11**, en el cultivo tratado con  $H_2O_2$  la presencia de células anormales es del 97% y de células normales el 3%. En contraste, en el grupo control el 100% de las células eran del fenotipo normal.



**Figura 11.** Fotografías tomadas del microscopio óptico donde se evidencian las alteraciones morfológicas celulares en la línea celular D407 causadas por el daño oxidativo. **CTL:** se observan células con la clásica apariencia en empedrado, típica de las células epiteliales normales. **H2O2:** corresponde al tratamiento con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), se observa una célula anormal, con numerosas vacuolas citoplasmáticas (flecha negra). La escala utilizada es de 20 micras ( $\mu m$ ).

Desafortunadamente, debido a limitaciones de tiempo e inconvenientes técnicos en el Laboratorio de Neurobiología del INIBIBB –rotura del incubador Sanyo que permite el mantenimiento de los cultivos celulares -, los tratamientos con las microalgas frente al estrés oxidativo y en ausencia de SIP endógena no pudieron completarse. Los experimentos realizados en este marco arrojaron resultados no concluyentes y sugieren otra forma de administración del extracto de microalgas, tarea que queda pendiente para futuras investigaciones.

## DISCUSIÓN

En los últimos años el estudio de las microalgas ha generado un gran interés debido a su capacidad para acumular biomoléculas de importancia. Sin embargo, desde una perspectiva biotecnológica, es crucial desarrollar técnicas de cultivo eficaces para incrementar la producción de biomasa y la diversidad de biomoléculas. Mediante la fotosíntesis, las microalgas utilizan agua, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y luz solar para sintetizar biomasa y moléculas con múltiples aplicaciones en la industria, incluyendo la producción de biocombustibles y bioproductos de alto valor cosmético y medicinal (Zhua et al., 2019). En este sentido, Arkronrat y colaboradores (2016) proponen el uso de co-cultivos como una alternativa para aumentar la producción de microalgas y mejorar el rendimiento, mediante el control de factores como la temperatura, los nutrientes, la luz y el pH.

Los resultados obtenidos al analizar la densidad celular en todas las condiciones ensayadas sugieren que la estrategia de co-cultivo es una alternativa viable para un aumento de la biomasa microalgal. Resultados similares obtuvieron Arkronrat y colaboradores (2016), quienes registraron una densidad celular máxima en el co-cultivo de *Nannochloropsis* sp. y *Tetraselmis* sp., dos especies de microalgas marinas, bajo condiciones controladas de laboratorio. El hecho de que el co-cultivo de *H. pluvialis* (H) y *Chlorella* sp. (C) (1:1) alcanzó la máxima densidad celular, sugiere la existencia de una interacción biológica beneficiosa entre ambas especies. En los sistemas de co-cultivo, se puede dar una relación simbiótica donde una especie utilice los desechos de la otra para su crecimiento, produciéndose un equilibrio entre el suministro y el consumo de carbono orgánico e inorgánico (CO<sub>2</sub>) que puede beneficiar la convivencia entre las especies involucradas (Rashid et al., 2019). En este sentido, también, se ha establecido que durante el cultivo conjunto de microalgas, se liberan productos solubles interespecíficos (SAP) que contemplan una variedad de moléculas como carbohidratos, aminoácidos, proteínas, lípidos y ácidos orgánicos que jugarían un rol clave en el efecto observado. Según los hallazgos de Wang y colaboradores (2022), la liberación de SAP en monocultivos de *H. pluvialis* provoca daño celular. Sin embargo, en condiciones de co-cultivo con *Scenedesmus* sp., se observa un efecto de mutualismo. En este escenario, los SAP liberados por *Scenedesmus* sp. aumentan la tasa de crecimiento y la producción de biomasa de *H. pluvialis*, mientras que los SAP liberados por *H. pluvialis* aceleran el crecimiento de *Scenedesmus* sp. Considerando esto, los resultados obtenidos en la presente Tesis de Grado indican que el co-cultivo con la proporción H:C (1:1) obtuvo el mayor valor de producción de biomasa lo cual podría deberse a la presencia de SAP que mediarían o facilitarían la convivencia entre ambas especies. Por otro lado, destacamos que para llegar a una simbiosis positiva es crucial establecer la proporción específica de cada especie que se co-cultiva (Rashid et al., 2019; Wang et al., 2022). En el caso de las microalgas *H. pluvialis* (H) y *Chlorella* sp. (C) que fueron aisladas a partir de la región de Bahía Blanca, esa proporción fue de H:C (1:1).

Por otro lado, la tasa de crecimiento de *Chlorella* sp. mostró ser mayor que la de *H. pluvialis*. Esto puede deberse a la diferencia de tamaño que hay entre las dos especies utilizadas, considerando el

hecho de que las especies de menor tamaño crecen más rápido, ya que asimilan los nutrientes de manera más fácil y su relación superficie/volumen es mayor (Oncel et al., 2010). En relación a esto, investigaciones realizadas por Azaman y su equipo (2017) revelaron que, en cultivos mixotróficos de *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella zofingiensis*, se observaban cambios morfológicos en las células. Además, encontraron que los tamaños celulares aumentaban de 1 a 2 veces debido al aumento en cantidad de cloroplastos, cuerpos lipídicos, amiloplastos, entre otros. En nuestro caso, *Chlorella sp.* y *H. pluvialis*, más allá de las diferencias en tamaño propias de cada especie y estadio de crecimiento, no evidenciaron alteraciones morfológicas significativas en ninguna de las condiciones evaluadas.

La cuantificación de lípidos neutros (LN) en microalgas utilizando el colorante lipofílico Rojo Nilo (RN) ofrece una forma rápida y sencilla de evaluar el contenido celular de lípidos neutros (Chen et al., 2009). Como ya mencionamos, bajo condiciones ambientales desfavorables o de estrés, como cambios bruscos en la temperatura, intensidad de luz y, especialmente, la baja disponibilidad de nutrientes del medio, alteran el contenido y la composición lipídica de las microalgas (Bellou et al., 2014; X. Hu et al., 2018), induciéndose la síntesis de triglicéridos (TAG), que son almacenados en cuerpos lipídicos citoplasmáticos (Mehariya et al., 2020; Ren et al., 2021; Scodelaro Bilbao et al., 2020). El estudio de Hu y colaboradores (2018) reveló que el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris* puede aumentar hasta dos a tres veces bajo condiciones de estrés por escasez de nutrientes, en contraste con su cultivo en condiciones en las cuales los nutrientes no son un factor limitante. Resultados similares se observaron en el estudio realizado por Damiani y colaboradores (2010), donde el contenido de lípidos neutros en *H. pluvialis* aumentó significativamente bajo distintas condiciones de estrés. En la presente Tesis, se observa un aumento significativo en el contenido lipídico en todas las condiciones evaluadas, hacia el final de cada ensayo. Particularmente, los co-cultivos H:C (1:1) y H:C (1:2) alcanzaron los valores más altos, siendo la proporción H:C (1:1) la que obtuvo el valor máximo. Resultados similares fueron encontrados por Rashid y su equipo (2019), descubriendo que el cultivo conjunto de dos especies de agua dulce, *Ettlia sp.* y *Chlorella sp.*, tanto en condiciones autótrofas como mixotróficas, generó una alta concentración de lípidos, incluyendo ácidos grasos (AG) esenciales como los ácidos palmítico, linoleico y esteárico.

Dentro de los carotenoides característicos de *H. pluvialis* se encuentra la astaxantina (Ren et al., 2021). En relación a esto, se ha observado que este pigmento y los (TAG) comparten precursores metabólicos que, bajo las mismas condiciones de estrés, aumentan su concentración celular de forma simultánea (Ren et al., 2021; Scodelaro et al., 2016). Estudios previos realizados por Azaman y colaboradores (2017), así como por Castillo y su equipo (2021), revelaron que entre los principales pigmentos producidos por *Chlorella sp.* se encuentran las clorofilas a y b, además de carotenos. El tipo de carotenos varía según la especie, en *C. sorokiniana* se encuentra principalmente luteína, mientras que en *C. zofingiensis* la astaxantina es el carotenoide preponderante (Azaman et al., 2017). La cuantificación espectrofotométrica de carotenoides, evidenció que el co-cultivo H:C (1:1) mostró el mayor valor de carotenoides en relación al resto de las proporciones ensayadas. Yan y colaboradores

(2021) obtuvieron resultados similares a estos, al estudiar el cultivo conjunto de *H. pluvialis* con el hongo *Simplicillium lanosoniveum*. Estos autores encontraron que el contenido de astaxantina no solo estaba relacionado con el contenido de lípidos, sino que también era mayor en el cultivo mixto en comparación con el monocultivo de *H. pluvialis*. Contrariamente a nuestros resultados, Oncel y colaboradores (2010) encontraron que el contenido total de carotenoides en el co-cultivo de *H. pluvialis* y *C. zoofingiensis* fue similar al contenido demostrado en los monocultivos. Sin embargo, al añadir una fuente externa de carbono, estos pigmentos mostraron un valor mucho mayor al del cultivo de cada especie de forma individual.

Existe una relación directa entre el contenido de carotenoides y la capacidad antioxidante de las microalgas (Ren et al., 2021), que en nuestro caso, fue expresada como porcentaje de actividad anti-radicalaria (% ARA). Los resultados mostrados en la presente Tesis son similares a aquellos reportados por Pistelli y colaboradores (2021). En su investigación, estos autores encontraron que al cultivar *Cyclotella cryptica* y *Nannochloropsis oceanica* en conjunto, el contenido total de carotenoides aumentó un 10%, resultando en un incremento significativo en la capacidad antioxidante de la biomasa.

Investigaciones previas han señalado que *Chlorella* sp. y *H. pluvialis* exhiben propiedades antioxidantes, lo que las posiciona como potenciales agentes terapéuticos para la protección contra el estrés oxidativo (Lin et al., 2014; Lin et al., 2020). Particularmente Lin y colaboradores observaron un efecto protector de *Chlorella* sp. sobre células  $\beta$  pancreáticas luego de inducirles estrés oxidativo con  $H_2O_2$  (Lin et al., 2014). A la luz de estos antecedentes, nos propusimos evaluar el efecto protector de los extractos totales de *Chlorella* sp. y *H. pluvialis* en células del epitelio pigmentado de la retina (EPR). En primer lugar, observamos que al replicar las concentraciones utilizadas por Lin y colaboradores (300  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$ ), los extractos producían alteraciones en la morfología celular, siendo esto indicio de que eran tóxicas para los cultivos epiteliales. Por el contrario, extractos de *Chlorella* sp. y *H. pluvialis* en concentraciones menores (25  $\mu\text{g/ml}$  y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) no indujeron cambios compatibles con estrés celular, por lo que fueron las concentraciones elegidas. Nuestros hallazgos en los cultivos epiteliales sugieren que la administración del extracto total puede no ser la forma más adecuada para las células del EPR, planteando la posibilidad de utilizar sólo la fracción lipídica del extracto como alternativa.

A continuación, nos propusimos evaluar si las microalgas ofrecían efecto protector frente al estrés oxidativo y al daño morfológico causado por la ausencia de la esfingosina-1- fosfato (S1P). Si bien pudimos poner a punto el daño inducido por ambos tratamientos - que se evidenció como presencia de vacuolas, morfología más ahusada y pérdida de la integridad de la monocapa de las células del EPR-, lamentablemente no pudimos comprobar nuestra hipótesis. Dificultades técnicas en el laboratorio de Neurobiología y limitaciones de tiempo impidieron llegar a resultados concluyentes, por lo que estos ensayos quedan pendientes para futuras investigaciones.

## CONCLUSIONES

- La estrategia de cultivo conjunto de microalgas, especialmente de *H. pluviialis* y *Chlorella* sp. resultó adecuada para estimular la producción de biomasa y biomoléculas. En particular, la proporción H:C (1:1) fue la que mostró los valores más altos en el contenido de lípidos, entre ellos se destacaron los triglicéridos y esteroides, y de carotenoides.
- Se observó un aumento en la actividad antiradicalaria en el co-cultivo con proporción H:C (1:1), relacionado con su alto contenido de carotenoides.
- La composición bioquímica de *Chlorella* sp. y *Haematococcus pluviialis*, las convierte en prometedoras candidatas con función protectora frente al estrés oxidativo. Resta aún determinar la forma más adecuada de administración de las mismas, particularmente en células epiteliales de retina.
- Los extractos totales en concentraciones de 25 µg/ml y 50 µg/ml no indujeron cambios morfológicos compatibles con toxicidad en las células del epitelio pigmentario de retina (EPR), por lo que serían las concentraciones recomendadas para evaluar la protección frente al estrés oxidativo, tarea que queda pendiente para futuros ensayos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, *11*, 1-10.
- Almeyda, M. D., Scodelaro Bilbao, P. G., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2020). Enhancement of polyunsaturated fatty acid production under low-temperature stress in *Cylindrotheca closterium*. *Journal of applied phycology*, *32*, 989-1001.
- Arkronrat, W., Deemark, P., & Oniam, V. (2016). Growth performance and proximate composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. & *Tetraselmis* sp.) with monocultures. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *38*(1), 1-5.
- Azaman, S. N. A., Nagao, N., Yusoff, F. M., Tan, S. W., & Yeap, S. K. (2017). A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ*, *5*, e3473.
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., & Aggelis, G. (2014). Bioquímica de lípidos de microalgas y perspectivas biotecnológicas. *Avances de la biotecnología*, *32*(8), 1476-1493.
- Bilbao, P. G. S., Garelli, A., Díaz, M., Salvador, G. A., & Leonardi, P. I. (2020). Crosstalk between sterol and neutral lipid metabolism in the alga *Haematococcus pluvialis* exposed to light stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1865*(10), 158767.
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., & Kovar, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, *91*, 31-46.
- Castillo, T., Ramos, D., García-Beltrán, T., Brito-Bazan, M., & Galindo, E. (2021). Mixotrophic cultivation of microalgae: an alternative to produce high-value metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, *176*, 108183.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of microbiological methods*, *77*(1), 41-47.
- Chiba, C. (2013). The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration. *Experimental eye research*, *123*, 107-114.
- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., & Gonzalez-Hernandez, J. C. (2020). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*, *42*, e37320.
- Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource technology*, *101*(11), 3801-3807.

- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Hernández Morales, K. J., Pérez Morales, M. E., Jáuregui Romo, C., Alcántara Jurado, L. A., & Hurtado Ayala, L. A. (2015). Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(1), 7-16.
- Hu, X., Liu, B., Deng, Y., Bao, X., Yang, A., & Zhou, J. (2019). A novel two-stage culture strategy used to cultivate *Chlorella vulgaris* for increasing the lipid productivity. *Separation and Purification Technology*, 211, 816-822.
- Indrayani, I., Moheimani, N. R., & Borowitzka, M. A. (2019). Long-term reliable culture of a halophilic diatom, *Amphora* sp. MUR258, in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology*, 31, 2771-2778.
- Jeffrey, S. T., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und physiologie der pflanzen*, 167(2), 191-194.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, 17, 1-21.
- Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 288, 121606.
- Kim, K. H., Choi, I. S., Kim, H. M., Wi, S. G., & Bae, H. J. (2015). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 153, 47-54.
- Lauritano, C., & Ianora, A. (2016). Marine organisms with anti-diabetes properties. *Marine drugs*, 14(12), 220.
- Lin, C. Y., Huang, P. J., & Chao, C. Y. (2014). *Chlorella* protects against hydrogen peroxide-induced pancreatic  $\beta$ -cell damage. *Journal of medicinal food*, 17(12), 1273-1280.
- Lin, W. N., Kapupara, K., Wen, Y. T., Chen, Y. H., Pan, I. H., & Tsai, R. K. (2020). *Haematococcus pluvialis*-derived astaxanthin is a potential neuroprotective agent against optic nerve ischemia. *Marine drugs*, 18(2), 85.
- Lovicu, F., & Shu, D. (2017). Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis.
- Mehariya, S., Sharma, N., Iovine, A., Casella, P., Marino, T., Larocca, V., ... & Musmarra, D. (2020). An integrated strategy for nutraceuticals from *Haematococcus pluvialis*: From cultivation to extraction. *Antioxidants*, 9(9), 825.
- Miranda, G. E., Abrahan, C. E., Politi, L. E., & Rotstein, N. P. (2009). Sphingosine-1-phosphate is a key regulator of proliferation and differentiation in retina photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(9), 4416-4428.

- Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. *Marine drugs*, *18*(9), 459.
- Oncel, S. S., Imamoglu, E., Gunerken, E., & Sukan, F. V. (2011). Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *86*(3), 414-420.
- Padmaperuma, G., Kapoore, R. V., Gilmour, D. J., & Vaidyanathan, S. (2018). Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. *Critical reviews in biotechnology*, *38*(5), 690-703.
- Pistelli, L., Mondo, A. D., Smerilli, A., Corato, F., Piscitelli, C., Pellone, P., ... & Brunet, C. (2021). Microalgal co-cultivation prospecting to modulate vitamin and bioactive compounds production. *Antioxidants*, *10*(9), 1360.
- Ponnalagu, M., Subramani, M., Jayadev, C., Shetty, R., & Das, D. (2017). Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective. *Cytokine*, *95*, 126-135.shu
- Rashid, N., Ryu, A. J., Jeong, K. J., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019). Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, *196*, 640-648.
- Ren, Y., Deng, J., Huang, J., Wu, Z., Yi, L., Bi, Y., & Chen, F. (2021). Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: Advances and outlook. *Bioresource Technology*, *340*, 125736.
- Rosero-Chasoy, G., Rodríguez-Jasso, R. M., Aguilar, C. N., Buitrón, G., Chairez, I., & Ruiz, H. A. (2021). Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation—an overview. *Bioresource technology*, *321*, 124458.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, *35*, 265-278.
- Scodelaro Bilbao, P. G., Damiani, C., Salvador, G. A., & Leonardi, P. (2016). *Haematococcus pluvialis* as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications. *Journal of applied phycology*, *28*, 3283-3294.
- Scodelaro Bilbao, P. G., Martín, L. A., Popovich, C. A., Almeyda, M. D., Chamorro, V., & Leonardi, P. I. (2020). Assessment of *Halamphora coffeaeformis* growth and biochemical composition for aquaculture purposes. *Journal of Marine Science and Engineering*, *8*(4), 282.
- Sendra, Á. P. S. (2019). *Efectos del carotenoide astaxantina en la salud humana, según la ciencia*. RCA Grupo Editor.
- Simon, M. V., Basu, S. K., Qaladize, B., Grambergs, R., Rotstein, N. P., & Mandal, N. (2021). Sphingolipids as critical players in retinal physiology and pathology. *Journal of lipid research*, *62*.

- Simón, M. V., Vera, M. S., Tenconi, P. E., Soto, T., Spalm, F. H. P., Torlaschi, C., ... & Rotstein, N. P. (2022). Sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate promote migration, pro-inflammatory and pro-fibrotic responses in retinal pigment epithelium cells. *Experimental Eye Research*, 224, 109222.
- Spiegel, S., & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(5), 397-407.
- Torlaschi, C., Gutierrez Jofré, G. M., Rotstein, N. P., & Simon, M. V. (2023). Sphingosine-1-phosphate signaling is essential for preserving morphology and focal adhesions of retina pigment epithelial cells.
- Simón, M. V., Spalm, F. H. P., Politi, L. E., & Rotstein, N. P. (2015). Sphingosine-1-phosphate is a crucial signal for migration of retina Müller glial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(10), 5808-5815.
- Wang, X., Ding, S., Wang, M., Ma, X., Li, H., Zhang, Y., ... & Lu, J. (2022). Effects of light source and inter-species mixed culture on the growth of microalgae and bacteria for nutrient recycling and microalgae harvesting using black odorous water as the medium. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(52), 78542-78554.
- Yan, R., Xing, X. Y., Dong, Q. L., Yu, X. Y., & Shi, K. L. (2021). Enhancing Algal Biomass, Lipid and Astaxanthin Production by Mix-Cultivation of *Haematococcus Pluvialis* With *Simplicillium Lanosoniveum* DT06.
- Zhu, L. (2015). Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. *Renewable and sustainable energy reviews*, 41, 1376-1384.
- Zhu, L., Li, S., Hu, T., Nugroho, Y. K., Yin, Z., Hu, D., ... & Hiltunen, E. (2019). Effects of nitrogen source heterogeneity on nutrient removal and biodiesel production of mono-and mix-cultured microalgae. *Energy Conversion and Management*, 201, 112144.
- Zhu, L., Nugroho, Y. K., Shakeel, S. R., Li, Z., Martinkauppi, B., & Hiltunen, E. (2017). Using microalgae to produce liquid transportation biodiesel: what is next?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 391-400.