

Comunicaciones Breves

Evaluación de factores involucrados en el desencadenamiento de la apoptosis en *Chlamydomonas* sp

RECIBIDO: 10/6/06

ACEPTADO: 22/9/06

Márquez V. E. • Beccaria A. J.

Laboratorio de Fermentaciones. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje el Pozo. CC 242. S3000ZAA Santa Fe. Argentina - Tel.: +54 (0) 342 4575 506/209/215 int. 131 - Fax: +54 (0) 342 4575 221. e-mail: abeccari@fbcbl.unl.edu.ar

RESUMEN: Se evaluó la incidencia de algunos parámetros de cultivo sobre el desencadenamiento de la apoptosis en una cepa de *Chlamydomonas* sp. Para esto, se aplicó una técnica de tinción con un fluorocromo y observación microscópica. La metodología se implementó para determinar la influencia de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de iluminación; así como también de la adición de especies reactivas del oxígeno. Se pudo establecer que la formulación del medio de cultivo incidió apreciablemente sobre el desencadenamiento del proceso apoptótico en la cepa empleada. Esto se verificó cuando se utilizó una iluminación artificial moderada, o la incorporación de peróxido de hidrógeno. La incubación de los cultivos en condiciones de oscuridad, no incidió apreciablemente sobre la aparición de un fenotipo apoptótico.

Los resultados obtenidos permitieron caracterizar algunos factores involucrados en la muerte celular por apoptosis, un aspecto poco estudiado en este microorganismo modelo.

PALABRAS CLAVE: *Chlamydomonas*, cultivos batch, apoptosis, tinción fluorescente.

SUMMARY: Evaluation of factors involved in the process of apoptotic cell death in *Chlamydomonas* sp

Márquez, V. E.; Beccaria, A. J.

The incidence of some culture parameters on apoptosis manifestation in a strain of *Chlamydomonas* sp. was evaluated. These parameters included not only culture medium composition and illumination conditions but also reactive oxygen species addition. To count apoptotic cells, a fluorescent reagent for DNA stain and microscopic observation were used.

On the strain used, the formulation of culture medium had a strong influence on the cell death by apoptosis, especially when moderated artificial illumination or hydrogen peroxide were applied. On the other hand, apoptosis was not induced by darkness in phototrophic cultures.

It was possible to characterize some factors that promoted the cell death by apoptosis. This is a phenomenon scarcely studied in *Chlamydomonas*, a model microorganism.

KEY WORDS: *Chlamydomonas*, batch cultures, apoptosis, fluorescent stain.

Introducción

Las microalgas son un grupo extremadamente heterogéneo de organismos unicelulares que pueden ser procariotas o eucariotas. Según sus características nutricionales se las clasifica como fotoautotróficas o heterotróficas, aunque algunas pueden comportarse como mixotróficas (1). Entre sus propiedades ecológicas se destacan las de ser los eslabones primarios en la mayor parte de las cadenas tróficas (1). También son las responsables de los episodios de *blooms*, fenómeno con impactos sanitarios y económicos negativos (2).

Por otra parte, una gran cantidad de especies de microalgas son cada vez más empleadas como fuentes de productos biotecnológicos, aplicables fundamentalmente en las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica (3). Además, recibe cada vez más interés el desarrollo de tecnologías que emplean microalgas para la biorremediación de ambientes contaminados (4).

Dentro del grupo de las microalgas, el género *Chlamydomonas* se consolidó como un microorganismo modelo para el estudio de diferentes aspectos biológicos (5). Este logro se debió a su fácil cultivo, inocuidad y la posibilidad de desarrollarse autotrófica o heterotróficamente. Además, en la especie *C. reinhardtii*, el cromosoma de su cloroplasto está completamente secuenciado (6) y continúa el avance de su proyecto genoma (<http://www.chlamy.org/>).

Desde un punto de vista biotecnológico, la aplicación de cultivos de *Chlamydomonas* va cobrando importancia en la producción de glicerol (7), hidrógeno (8) y proteínas recombinantes (9-11).

El gran desarrollo del conocimiento de la biología de *Chlamydomonas*, contrasta con el desconocimiento de otros aspectos, como sus procesos de muerte celular. Esta carencia es extrapolable a las microalgas en general (12).

En los sistemas celulares, se considera que existen dos tipos de muerte: la necrosis y la apoptosis. La primera, se produce como consecuencia de una injuria severa, que daña componentes celulares de una manera incompatible con la consecución de los procesos vitales. Es por este mecanismo que se la clasifica como muerte celular pasiva. En la apoptosis, en cambio, el estímulo nocivo desencadena una serie de eventos moleculares. Éstos inducen a la misma célula a participar de los procesos que la llevarán a su propia aniquilación. En la apoptosis se expresan genes conservados, por lo cual se considera una forma de muerte activa (12).

En algunos géneros de microalgas, se describió la muerte celular por apoptosis, caracterizando algunos de los factores desencadenantes del proceso (12-16). En *Chlamydomonas*, en cambio, si bien están caracterizados los daños relacionados al estrés oxidativo en cultivos fotoautotróficos (17), existe escasa asociación con los mecanismos de muerte celular. Sólo recientemente, se realizó un aporte significativo al respecto, al ser demostrada la incidencia de la radiación UV en el desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis en esta microalga (18).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la incidencia de algunos parámetros de cultivo sobre el desencadenamiento de la apoptosis en una cepa de *Chlamydomonas* sp.

Materiales y métodos

Cepa y condiciones de cultivo

Se empleó una cepa de *Chlamydomonas* sp. La misma fue gentilmente cedida por la Prof. Isabel Albarracín (FCN. UNPSJB. Trelew, Argentina). La cepa fue reaislada y mantenida por repiques periódicos, en medio Chu N° 10 modificado (ver Tabla 1). Las incubaciones se realizaron en condiciones de temperatura ambiente e iluminación natural.

En los ensayos realizados, se emplearon dos medios de cultivo: el medio Chu N° 10 y el medio CR-M2, ambos reformulados. La composición de los mismos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición de los medios de cultivo para microalgas dulciacuicolas, utilizados en este trabajo.

Componente	Concentración ($\times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	Medio Chu N° 10 mod.	Medio CR M2 mod.
Na_2CO_3	20	--
KNO_3	40	--
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	10	300
MgSO_4	13	150
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,80	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	40	53
Citrato de sodio $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	--	500
NH_4Cl	--	26
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	--	0,25
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	--	0,40
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	--	0,050
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	--	0,18
ZnSO_4	--	0,70

Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidad, empleando 5 mL de medio.

Para evaluar la incidencia de la condición de iluminación sobre la aparición y magnitud del fenómeno apoptótico, se realizaron 12 cultivos de la microalga, seis en cada uno de los medios indicados. Todos ellos se incubaron en forma estática, a temperatura ambiente e iluminación natural. Cuando los cultivos completaron su fase de crecimiento exponencial, fueron separados en tres grupos los que se incubaron en diferentes condiciones de iluminación: natural, artificial y oscuridad. La primera de las condiciones correspondió a la que se empleó durante el inicio de los cultivos, posterior a su inoculación. La condición de iluminación artificial se consiguió rodeando al lote de cultivos con 6 lámparas fluorescentes de 15 W cada

una, consiguiendo así una irradiación promedio sobre la superficie de los mismos de $66 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Finalmente, la condición de oscuridad se produjo envolviendo con papel de aluminio a los frascos empleados para estos cultivos.

Por otra parte, se evaluó la incidencia del agregado de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a los cultivos. Para esto se realizaron 4 cultivos en medio CR-M2 mod. en condiciones similares a las descritas anteriormente. Transcurridas 31 h del momento de la inoculación, se adicionó a dos de ellos 1 μL de una solución 2,5 M de H_2O_2 . Luego de esta adición, uno de los cultivos continuó en condiciones de iluminación natural, mientras que al restante se lo incubó en condiciones de iluminación artificial, como se describió precedentemente. Luego de un lapso de 72 h se realizó a cada uno de

estos cultivos un nuevo agregado de la solución de H_2O_2 , que correspondió a un volumen de 10 μ L. A uno de los cultivos restantes, en los que no se adicionó H_2O_2 , se lo dejó en incubación en condiciones de iluminación natural. Al segundo, se lo incubó en condiciones de iluminación artificial a partir de las 31 h post-inoculación.

Finalmente se realizaron 16 cultivos de la microalga en el medio CR-M2 mod. Cuando éstos completaron su fase de crecimiento exponencial, se les adicionó H_2O_2 (concentración final en el cultivo 5 mM) y se incubaron en condiciones de iluminación artificial, según el procedimiento recién descrito. A las 140 h de cultivo, se cosecharon las células mediante centrifugación (1000 x g, 5 minutos) y se procedió a extraer el ADN. Para esto, se empleó el protocolo descrito por Newman *et al.* (19). El material extraído fue resuelto en geles de agarosa, según la técnica descrita en Maniatis *et al.* (20).

De cada cultivo realizado se tomaron muestras diarias, las que se emplearon para realizar las determinaciones que se indican a continuación.

Cuantificación de células apoptóticas y no apoptóticas

Para la determinación de las células apoptóticas y normales presentes en los diferentes cultivos, se utilizó el protocolo descrito por Mercille y Massie (21). De esta forma, se procedió a mezclar 100 μ L de la suspensión celular con 4 μ L de una solución de 100 μ g \cdot mL⁻¹ de naranja de acridina (Sigma, EE. UU.), preparado en *buffer* PBS, pH 7,3. Posteriormente, se realizó un preparado entre porta y cubreobjetos y se observó con una magnificación de 400 X, en un microscopio de epifluorescencia (Olympus, Japón) equipado con un sistema de filtros de excitación / emisión para fluoresceína. Se contaron entre 100

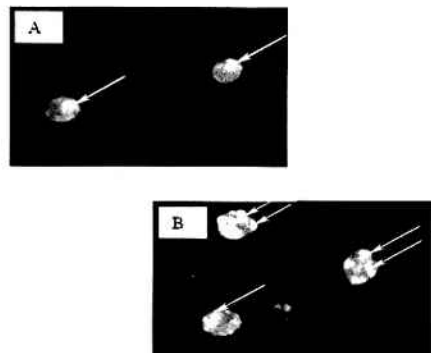
y 200 elementos celulares por muestra, siendo cada uno de ellos clasificados como células apoptóticas o no apoptóticas.

Por otra parte, se determinó la concentración de células totales empleando una cámara de Neubauer.

Resultados y discusión

En la evaluación de células apoptóticas mediante el empleo del fluorocromo naranja de acridina, el compuesto es incorporado por células viables y no viables. Cuando se intercala entre las hebras del ADN doble cadena, es capaz de emitir fluorescencia de color verde al ser excitado con una frecuencia de radiación específica. Esta propiedad se aprovecha para evaluar microscópicamente la disposición del material genético (21). En la Fig. 1 se muestran microfotografías obtenidas de preparados de muestras de *Chlamydomonas* sp., las que fueron procesadas según la técnica de tinción fluorescente.

Figura 1: Microfotografías de fluorescencia de células de *Chlamydomonas* sp. A) Células con fenotipo normal. Las flechas señalan la estructura organizada del material genético, compuesto por ADN doble cadena. B) Células con fenotipo apoptótico. Las flechas señalan fragmentos del material genético.

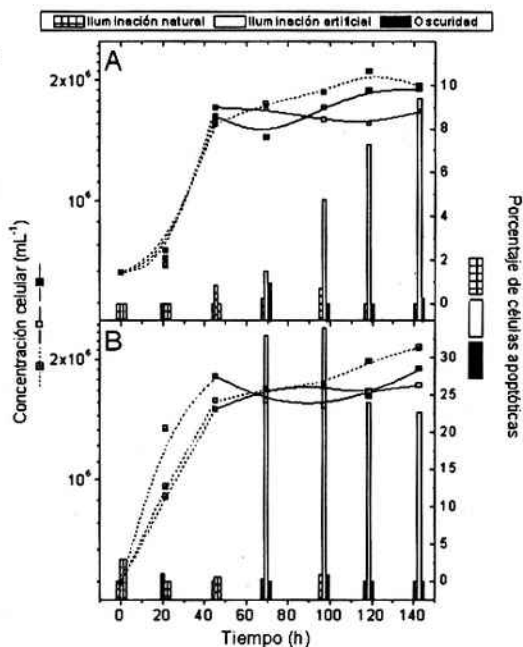


Mediante la aplicación del procedimiento de extracción del ADN y posterior electroforesis en gel de agarosa, no fue posible establecer el perfil característico que se describe para ciertos tipos de células en las que cursan procesos apoptóticos. Este perfil, se caracteriza por la aparición de bandas de ADN cuyas masas moleculares son múltiples entre sí (22). En cambio, en el caso de la electroforesis realizada a la muestra de ADN extraído desde cultivos de *Chlamydomonas* sp., se observó una degradación inespecífica del material genético. Resultados negativos de esta aplicación también fueron obtenidos cuando se empleó en la evaluación de células de insecto cultivadas, tanto en nuestro laboratorio (resultados no publicados), como por otros grupos de trabajo (23).

En la Fig. 2 se muestra la evolución de la concentración celular y del porcentaje de células apoptóticas en los cultivos realizados con la cepa de *Chlamydomonas* sp.

Como se puede observar en cada gráfica representada en la figura, durante los 2 primeros días se produce un incremento de la concentración celular en cada cultivo. Al final de este período, el valor de dicha concentración es entre 2,5 y 3 veces la correspondiente al inóculo. Posteriormente, se inicia una fase de crecimiento estacionario. La mayor concentración de células con un fenotipo apoptótico se encontró en los cultivos que fueron iluminados artificialmente, una vez iniciada la fase de crecimiento estacionario (barras blancas). Si bien este resultado fue independiente del medio de cultivo utilizado, en aquellos desarrollados en el medio Chu N° 10 mod. (Fig. 2A), el mayor porcentaje alcanzado de células tipo apoptóticas fue de 9,4%; mientras que en el medio CR-M2 mod. (Fig. 2B), éste máximo fue de 34%. Además, en este último medio, la concentración de células con fenotipo apoptótico se incrementó abruptamente luego

Figura 2: Evolución de la densidad celular y del porcentaje de células apoptóticas en cultivos sometidos a diferentes condiciones de iluminación, desde que completaron su fase de crecimiento exponencial. A) Cultivos en el medio Chu N° 10 mod. B) Cultivos en el medio CR M2 mod. Los datos graficados corresponden al valor promedio obtenido del procesamiento de dos cultivos independientes. En todos los casos el coeficiente de variación no superó el 8 %.

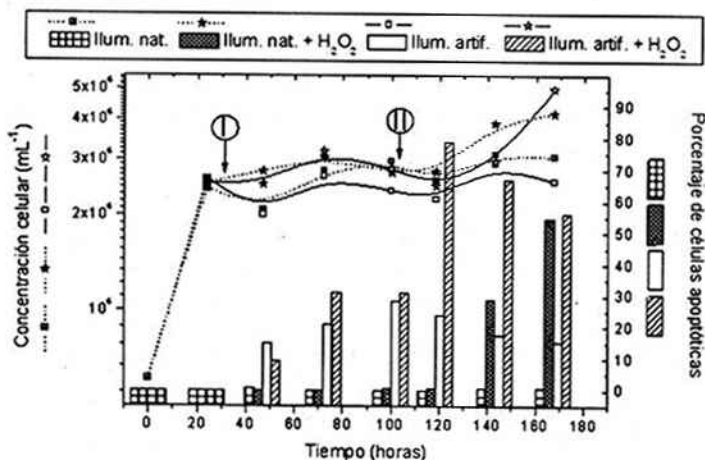


de introducir a los cultivos en las condiciones de iluminación artificial. En cambio, en el medio Chu N° 10 mod., el incremento de esta concentración se produjo gradualmente luego del cambio de la condición de iluminación. Estos resultados pueden ser atribuidos a las diferencias de diseño y formulación de cada medio de cultivo. Así, considerando a los macronutrientes, resalta la ausencia de la fuente de carbono en la composición del medio CR-M2 mod. (ver Tabla 1). En este medio de cultivo, el carbono asimilable es provisto exclusivamente por disolución del dióxido de carbono atmosférico. El citrato incluido, no es empleado por este microorganismo para la síntesis de compuestos carbonados, actuando en el medio de cultivo como agente quelante, evitando la precipitación de compuestos férricos (24). Una estrecha relación entre la carencia de carbono inorgánico y el desencadenamiento de la apoptosis, pudo establecerse en cultivos de la microalga *Peridinium gatunense* (14).

También se puede observar en la Fig. 2, que en aquellos cultivos que continuaron con iluminación natural o en los incubados en oscuridad, no se detectó apreciablemente la aparición de un fenotipo apoptótico, dentro del lapso y condiciones del ensayo. Está descrito que la ausencia de luz, provoca la muerte celular por apoptosis en las microalgas *Amphidinium carterae* (12) y *Dunaliella tertiolecta* (15), aunque no en la especie *Thalassiosira weissflogii* (15).

Por otra parte, está bien establecido que en los organismos fotosintéticos expuestos a un exceso de iluminación, se excede la capacidad de fotooxidación, desencadenando la generación de especies reactivas del oxígeno –ROS– (17, 25-28). Para evaluar la posible acción de las ROS sobre la aparición del fenotipo apoptótico, se realizaron cultivos en el medio CR-M2 mod., a los que se les adicionó H_2O_2 . Los resultados de este ensayo se muestran en la Fig. 3.

Figura 3: Efecto de la adición de H_2O_2 (flechas) y de la condición de iluminación, sobre la evolución de la densidad celular y del porcentaje de células apoptóticas en cultivos de *Chlamydomonas* sp. La concentración final de H_2O_2 en los cultivos fue de 0,5 mM y 5 mM, luego de las adiciones "I" y "II", respectivamente.



Como se puede observar en la figura, sólo luego de la segunda adición de H_2O_2 (concentración final 5 mM), se logró incrementar abruptamente el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos correspondientes. Este fenómeno se manifestó no sólo en el cultivo que se incubó con iluminación artificial, sino también en aquel expuesto a iluminación natural. Además, el máximo porcentaje de células apoptóticas se alcanza previamente en el cultivo artificialmente iluminado, respecto del naturalmente iluminado. De esta manera, la adición de H_2O_2 potencia el desencadenamiento del proceso apoptótico causado por una iluminación artificial moderada. Esta acción puede ser directa o indirecta. En el primer caso, es el H_2O_2 el que oxida diferentes moléculas celulares. En el segundo, este compuesto se descompone en presencia del catión ferroso presente en el medio de cultivo, y genera el radical hidroxilo ($\cdot OH$). La célula puede descomponer el H_2O_2 enzimáticamente, mediante catalasas. Pero el radical hidroxilo no puede ser detoxificado. De esta forma, la descomposición del H_2O_2 en presencia del catión ferroso, podría ser otro mecanismo por el cual se generan mayor cantidad de células apoptóticas en los cultivos realizados en medio CR-M2 mod. (ver Fig. 2). En efecto, como puede observarse en la Tabla 1, la concentración de aquel ión es 12,5 veces superior en este medio de cultivo.

Conclusiones

Mediante la aplicación de la técnica de tinción del ADN con un colorante fluorescente, fue posible realizar una evaluación de la apoptosis en cultivos de *Chlamydomonas* sp.

Durante el lapso de evaluación de los cultivos empleados en este trabajo, la privación de iluminación no tuvo efectos sobre el desencadenamiento del proceso de muerte celular por apoptosis en *Chlamydomonas* sp. Además,

esta situación no produjo una disminución en la densidad celular de los cultivos de la microalga. Sin embargo, la exposición relativamente breve de cultivos de *Chlamydomonas* sp. a condiciones de iluminación artificial moderada, desencadenó el fenómeno de muerte celular con características de apoptosis. La cepa empleada mostró susceptibilidades diferentes según el medio de cultivo utilizado.

Finalmente, se pudo establecer que la combinación de iluminación artificial moderada y H_2O_2 exógeno, magnifican la aparición de un fenotipo apoptótico en células de *Chlamydomonas* sp.

Es posible que el conocimiento de eventos y mecanismos relacionados con la muerte celular en microalgas, permita establecer nuevos caminos en al menos dos campos de estudio. Por un lado, en el área de la ecología, aplicado a la investigación y control de los episodios de *bloom*. Por otra parte, también encontrarían aplicación en la optimización de aquellos procesos tecnológicos donde estos microorganismos son de interés para la obtención de bioproductos. El empleo de las microalgas en estos procesos, requieren del desarrollo de cultivos en óptimas condiciones.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con recursos del Proyecto CAI+D 2002, N° 18 121, subsidiado por la UNL; y con aportes de la empresa LESSEL SH.

Nota

Parte de la información incluida en este trabajo fue presentada en el III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de Comunicaciones Técnico Científicas, evento desarrollado en la ciudad de Santa Fe, durante el mes de junio de 2005.

Bibliografía

1. Lee, R. 1980. "Phycology". Cambridge University Press (Cambridge). 478-479.
2. Sellner, K. G., Doucette, G. J. y Kirkpatrick, G. J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 7: 383-406.
3. Apt, K. y Behrens, P. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.* **35**, 2: 215-226.
4. Travieso, L., Cañizares, R., Borja, R., Benítez, F., Domínguez, A., Dupeyrón, R. y Valiente, V. 1999. Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**, 2: 144-151.
5. Harris, E. H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 363-406.
6. Maul, J. E., Lilly, J. W., Cui, L., de Pamphilis, C. W., Miller, W., Harris, E. H., Stern, D. B. 2002. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: island of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* **14**: 2659-2679.
7. León Bañares, R. M. y Galván Cejudo, F. 1999. Interaction between saline stress and photoinhibition of photosynthesis in freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Implications for glycerol photoproduction. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 7-8: 623- 628.
8. Polle, J. E. W., Kanakagiri, S., Jin, E. S., Masuda, T. y Melis, A. 2002. Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems- a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 11-12: 1257-1264.
9. Franklin, S. E. y Mayfield, S. P. 2005. Recent development in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Op. Biol. Therapy.* **5**, 2: 225-235.
10. Walker, T. L., Collet, C. y Purton, S. 2005. Algal transgenics in the genomic era. *J. Phycol.* **41**, 6: 1077-1093.
11. León Bañares, R. M., González Ballester, D., Galván, A. y Fernández, E. 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol.* **22**, 1: 45-52.
12. Franklin, D. J. y Berges, J. A. 2004. Mortality in cultures of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* during culture senescence and darkness. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **271**, 1553: 2099-2107.
13. Segovia M., Haramaty, L., Berges, J. y Falkowski, P. 2003. Cell death in the unicellular Chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans. *Plant Physiol.* **132**, 1: 99-105.
14. Vardi A., Berman-Frank, I., Rozenber, T., Hadas, O., Kaplan, A. y Levine, A. 1999. Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Curr. Biol.* **9**, 18: 1061-1064.
15. Berges, J. y Falkowski, P. 1998. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 1: 129-135.
16. Scheuerlein, R., Tremel, S., Thar, B., Tirlapur, U. y Häder, D. 1995. Evidence for UV-B-induced DNA degradation in *Euglena gracilis* mediated by activation of metal-dependent nucleases. *J. Photochem. Photobiol. B.* **31**, 3: 113-123.
17. Förster, B., Osmond, C. B. y Pogson, B. J. 2005. Improved survival of very high light and oxidative stress is conferred by spontaneous gain-of-function mutations in *Chlamydomonas*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1709**, 1: 45-57.
18. Moharikar, S., D'Souza, J. S., Kulkarni, A. B. y Rao, B. J. 2006. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analyses. *J. Phycol.* **42**, 2: 423-433.
19. Newman, S. M., Boynton, J. E., Gillham, N. W., Randolph-Anderson, B. L., Johnson, A. M. y

- Harris, E. H. 1990. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*, **126**, 4: 875-888.
20. Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory (New York). 150-185.
21. Mercille, S. y Massie, B. 1994. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 9: 1140-1154.
22. Sgonc, R. y Gruber, J. 1998. Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol.* **33**, 6: 525-533.
23. Meneses-Acosta, A., Mendonça, R. Z., Merchant, H., Covarrubias, L. y Ramírez, O. T. 2001. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma culture. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 4: 441-457.
24. Harris, E. H. 1989. "The *Chlamydomonas* sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use". Academic Press, Inc. (New York). 1-24.
25. Baroli, I., Gutman, B. L., Ledford, H. K., Shin, J. W., Chin, B. L., Havaux, M. y Nigoyi, K. K. 2004. Photo-oxidative stress in a xanthophylls-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* **279**, 8: 6337-6344.
26. Ip, P. y Chen, F. 2005. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic cultures. *Process Biochem.* **40**, 11: 3491-3496.
27. Ledford, H. K. y Niyogi, K. K. 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.* **28**, 8: 1037-1045.
28. Hirayama, S., Ueda, R. y Sugata, K. 1995. Effect of hydroxyl radical on intact microalgal photosynthesis. *Energy Convers. Mgmt.* **36**, 6-9: 685-688.