



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estrès oxidatiu en algues epifitades per espècies d'algues invasores

José Carlos Montañés Domínguez

Grau de bioquímica

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 43460217S

Treball tutelat per Antoni Sureda Gomila

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball: ROS, algues, *Padina pavonica*, *Lophocladia lallemandii*, espècies invasores, Mar Mediterrani.

Índice

Resumen.....	2
Introducción	3
Especies reactivas y mecanismos de defensa antioxidante.....	3
Biomarcadores	6
Especies invasoras.....	6
Objetivo.....	8
Métodos y técnicas	9
Lugar de muestreo	9
Procesado de las muestras.....	9
Determinaciones enzimáticas	10
Catalasa	10
Superóxido dismutasa	10
Glutatión reductasa.....	10
Glutatión peroxidasa	10
Glutatión S-transferasa	11
Marcador de peroxidación lipídica.....	11
Análisis de las muestras	11
Resultados.....	12
Enzimas antioxidantes.....	12
Actividad GST	13
Daño oxidativo	13
Discusión	15
Conclusión.....	17
Bibliografía	18

Resumen

El número de especies invasoras presentes en el Mar Mediterráneo es cada vez mayor. Entre las principales causas de la llegada de nuevas especies no nativas destacan el aumento del transporte marítimo, la acuicultura i el comercio de especies de acuario. Además, el Mar Mediterráneo por tratarse de un mar semi-cerrado es especialmente sensible al ataque de especies invasoras, comparado con otros ambientes. El objetivo de este estudio ha sido determinar mediante el uso de biomarcadores el grado de estrés que es capaz de producir la presencia de un alga con carácter invasivo, como es *Lophocladia lallemandii* y una alga autóctona del Mediterráneo, en este caso *Cystoseira spp.*, sobre el alga autóctona *P. pavonica*. Para conseguir este objetivo hemos utilizado diversos biomarcadores de estrés oxidativo como enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa), además de una enzima con función detoxificante como es la glutatión S-transferasa y del malondialdehído (MDA) como marcador de daño oxidativo. Los resultados de estas determinaciones han mostrado diferencias significativas entre la *P. pavonica* sin competir con otra especie (control) respecto *P. pavonica* siendo epifitada por *L. lallemandii*. En el caso de *P. pavonica* en competición con *Cystoseira spp.* únicamente se observaron diferencias significativas respecto al control en el caso de la actividad de las enzimas antioxidantes. El conjunto de estos resultados nos indica que el epifitismo del alga invasora *L. lallemandii* induce una mayor grado de estrés sobre *P. pavonica* que el estado de competición por nutrientes y espacio que sufre por parte del alga autóctona *Cystoseira spp.*

Introducción

Especies reactivas y mecanismos de defensa antioxidante

El metabolismo oxidativo de los seres aerobios es una fuente natural de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la propia utilización de oxígeno como sustrato¹. Estas ROS son moléculas derivadas del oxígeno con gran capacidad reactiva (como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno) y son capaces de interactuar con diferentes componentes celulares incluyendo lípidos, proteínas e incluso DNA afectando a sus estructuras y funcionalidad. A nivel lipídico, la acción de las especies reactivas puede conducir a una situación de peroxidación lipídica lo que produce alteraciones en las estructuras formadas mayoritariamente por lípidos, como la membrana celular, lo que podría afectar a su permeabilidad y podría promover la muerte celular². A nivel proteico los radicales libres producen la oxidación de aminoácidos concretos, los cuales al ser oxidados podrán alterar la estructura proteica al presentar más facilidad para unirse con otro aminoácidos por regiones que no son las habituales, además, de ver alterada su función, sobretodo en proteínas con capacidad catalítica². En cuanto al DNA, las ROS se ha visto que pueden tanto romper el esqueleto de desoxirribosa que forma el DNA como, modificar las bases nitrogenadas uniéndose a éstas o estableciendo uniones covalentes entre las dos hebras de DNA³.

Los orgánulos que utilizan la molécula de oxígeno en mayor grado, como las mitocondrias y los cloroplastos, son los mayores responsables de la formación de ROS. La mitocondria produce ROS, principalmente, a nivel de los complejos I y III que se encuentran asociados a su membrana interna⁴. Además, existen toda una serie de enzimas específicas que los forman como la NADPH oxidasa (NOX) o la xantina oxidasa⁵. También es destacable la producción de ROS por parte de las células de sistema inmunitario (principalmente neutrófilos y macrófagos) cuando se activan para hacer frente a agentes potencialmente patógenos.

A pesar de que la formación de ROS es una acción habitual en las células también, éstas han desarrollado un complejo mecanismo de defensas que permiten la desactivación de estas ROS mediante enzimas y moléculas antioxidantes que se

encuentran tanto en el citosol como en orgánulos celulares. Dentro de los principales enzimas antioxidantes podemos destacar:

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima con función antioxidante la cual la podemos encontrar en el caso de los humanos poseemos un total de 3 isoformas distintas. Una isoforma citoplasmática y otra extracelular, las cuales presentan cobre y zinc, respectivamente, como grupos protéticos y otra isoforma mitocondrial con manganeso como grupo prostético. Esta enzima se encarga de catalizar la reacción desde anión superóxido hasta peróxido de hidrogeno, una ROS menos reactiva al ser no radicalaria⁶.

Otra enzima con función antioxidante es la catalasa (CAT) que normalmente se encuentra en los peroxisomas de las células. Esta enzima cataliza una reacción en la cual se degradan dos moléculas de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en dos moléculas de agua y otra de oxígeno⁷.

La familia de enzimas glutatión peroxidasa (GPX) son un grupo de seleno-proteínas que también se encargan de mantener el balance de ROS y antioxidantes actuando tanto en el citoplasma como la mitocondria. La reacción catalizada por este grupo de enzima se basa en la utilización de H_2O_2 y 2 moléculas de glutatión reducido para formar una molécula de glutatión disulfuro y otras dos de agua⁸. Además, la GPX tiene la capacidad de actuar sobre los hidroperóxidos lipídicos participando en la contención del proceso de peroxidación lipídica².

Finalmente otra enzima de la que vamos a hablar en este trabajo con función antioxidante es la glutatión reductasa (GR). Esta enzima, se encarga de catalizar la reacción responsable de recuperar glutatión reducido que, como hemos mencionado antes, es un importante sustrato de la GPX para la eliminación de H_2O_2 ⁹.

La acción global del daño que puede realizar las ROS y su eliminación la podemos ver en la figura 1.

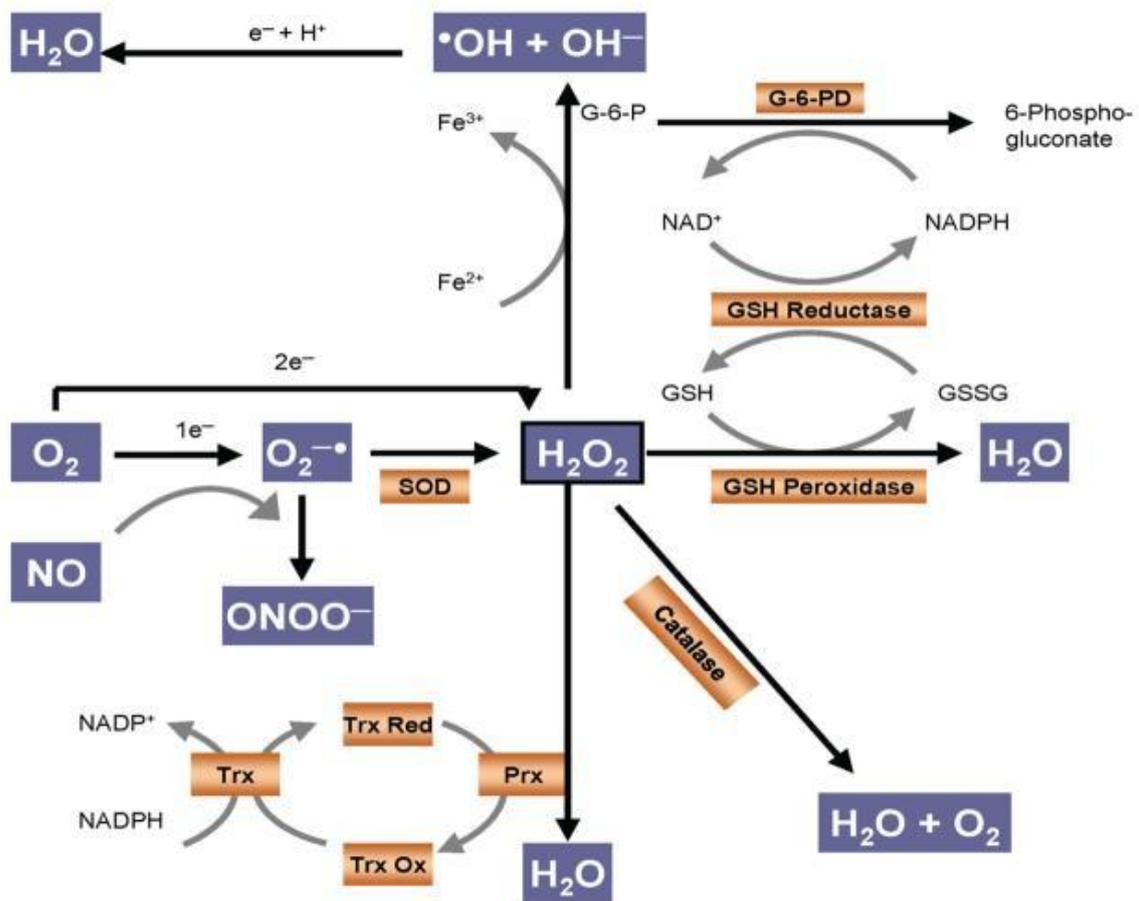


Figura 1. Esquema de la formación de formación de ROS así como sus vías de eliminación¹⁰.

Cuando el balance entre las defensas antioxidantes y las sustancias oxidantes se inclina a favor de estas últimas, se produce el fenómeno conocido como estrés oxidativo, el cual se asocia a multitud de patologías como la diabetes^{11,12}.

Además de las ROS, existen multitud de tóxicos, como contaminantes ambientales y compuestos producidos por otros organismos, que pueden afectar negativamente a las células. Para hacer frente a estos tóxicos, las células poseen mecanismos de detoxificación dirigidos a reducir su toxicidad y a favorecer su eliminación, aunque durante este proceso se pueden generar ROS. Estos procesos de detoxificación normalmente se realizan en dos fases: en primer lugar una fase de activación de estos xenobióticos mediante la formación de grupos hidrofílicos (fase I) y, en segundo lugar, la conjugación con una molécula hidrofílica para así facilitar la excreción del xenobiótico del organismo (fase II)¹³. Una enzima que participa de forma activa en el proceso de detoxificación de xenobióticos es la glutatión S-transferasa (GST)(fig. 2) que

es una enzima que pertenece a la superfamilia de enzimas detoxificadoras de clase II, que se caracteriza por conjugar una molécula de glutatión al xenobiótico¹⁴.



Figura 2. Reacción catalizada por la enzima GST en donde R-X es un xenobiótico y GSH es glutatión reducido. En la reacción podemos ver como el glutatión reducido se une al xenobiótico.

Biomarcadores

Los biomarcadores son parámetros biológicos que se pueden medir y cuantificar y que permiten conocer el estado fisiológico de un organismo. El análisis de biomarcadores puede ser útil, por ejemplo, para conocer si procesos metabólicos en un organismo se están desarrollando correctamente, para conocer la predisposición a padecer una patología o para evaluar el grado de afección frente a una situación estresante como son la competencia entre especies o presencia de contaminantes¹⁵. Además, la determinación de los biomarcadores es relativamente sencilla y bastante más económica que determinar los agentes inductores de la situación de estrés ya que se suelen utilizar reacciones enzimáticas o indicadores de daño celular¹⁶⁻¹⁸. Además, los biomarcadores, son indicadores que varían con el grado de estrés por lo que son muy adecuados para estudios de monitorización. Estos biomarcadores nos pueden ayudar, además, a conocer el grado de contaminación de una zona determinada e incluso también, a conocer las adaptaciones que se están dando en los organismos que se encuentran en ese hábitat^{16,19}.

Las enzimas antes descritas así como las estructuras que se pueden ver alteradas por las ROS pueden ser utilizadas como biomarcadores para detectar el estrés oxidativo que está sufriendo un organismo.

Especies invasoras

Las especies invasoras son organismos que se han introducido en un ambiente que no es el suyo propio y, que son capaces de producir cambios importantes en los ecosistemas. Normalmente estas especies suelen afectar negativamente al ecosistema empobreciendo la biodiversidad de esa zona²⁰. El Mar Mediterráneo en los últimos años ha sufrido la entrada de múltiples especies invasoras por diversas actividades humanas como el transporte marítimo y la apertura de canales y, se ha visto que

afectan de manera negativa sobre las especies autóctonas produciendo un cambio en la biodiversidad de estas aguas²¹.

Una especie invasoras que lleva invadiendo el mar Mediterráneo desde hace varios años es el alga roja *Lophocladia lallemandii*. *L. lallemandii* es un macroalga roja filamentosa (fig. 3) la cual lleva invadiendo las costas mediterráneas desde la obertura del canal de Suez ya que esta alga pertenece originalmente a la zona del Mar Rojo²². Esta especie ya ha demostrado que es capaz de adherirse a diversas superficies como rocas e incluso algas haciendo largas extensiones por encima de estas últimas y provocando cierto grado de estrés en algunas especies (proceso conocido como epifitismo). Además del estrés que puede producir esta alga al realizar el epifitismo sobre especies autóctonas *L. lallemandii* produce una sustancia llamada lofocladina el cual es un alcaloide con capacidad citotóxica lo que puede producir un aumento del estrés del alga epifitada^{20,23}.

Esta alga roja antes descrita ha estado epifitando hace varios años a un alga autóctona conocida como *Padina pavonica* (fig. 3). *P. pavonica* es un alga parda autóctona del Mar Mediterráneo aunque también la podemos encontrar en zonas muy alejadas de este mar como son el golfo de México o incluso en desembocaduras de ríos en Estados Unidos ²⁴. Su situación normal en el agua es por debajo de los 20 metros de profundidad en donde se encuentra preferentemente unido a rocas ²⁵.

Otra alga autóctona es el género *Cystoseira spp.* (Fig. 3). Este género de alga parda al tratarse de una alga muy frondosa y de rápido crecimiento puede comprometer el acceso de la luz solar a las algas circundantes por lo que puede generar una situación de estrés a otras algas que se encuentren por debajo de ésta.

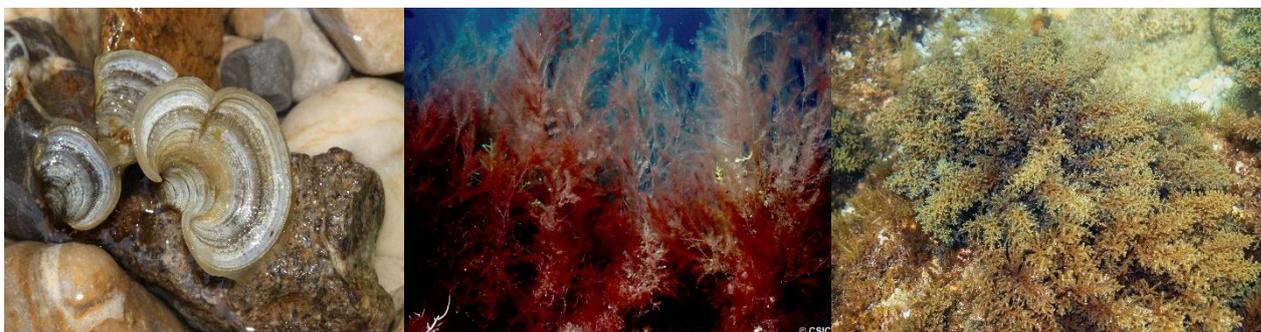


Figura 3. Fotografías de las algas *Padina pavonica*, *Lophocladia lallemandii* y *Cystoseira spp.* respectivamente de izquierda a derecha.

Objetivo

El uso de biomarcadores ha demostrado una gran utilidad a la hora de evidenciar variaciones en el estado prooxidante/antioxidantes de los organismos y evidenciar la presencia de estrés oxidativo. La presencia de cada vez una mayor número de especies invasoras en el Mar Mediterráneo puede suponer un estrés añadido a las algas autóctonas que ya de por sí deben competir por el sustrato y acceso a la luz solar. Así, el objetivo principal de este estudio es evaluar el grado de estrés al que se ve sometida el alga autóctona *P. pavonica* cuando es epifitada por un alga invasora y muy agresiva y por un alga autóctona mediante la determinación de diversos biomarcadores bioquímicos.

Métodos y técnicas

Lugar de muestreo

La recolección de las muestras fue realizada en la playa de Illetas, Mallorca (fig. 4) el mes de agosto de 2014 debido que en esas fechas es cuando hay mayor biomasa del alga *Lophocladia lallemandii*. Se recogieron muestras de *Padina pavonica* sin prácticamente ningún alga epifitándola y sin evidencia de competencia, *P. pavonica* epifitada por el alga roja *L. lallemandii* y *P. pavonica* en competencia directa con algas del género *Cystoseira spp.* Las muestras se recogieron por buceadores en apnea a una profundidad de entre 0.5-1 metros y en la misma zona para evitar variaciones debido a las condiciones ambientales. Las muestras después de su recogida fueron almacenadas en viales y rápidamente congeladas en nitrógeno líquido. Una vez en el laboratorio las muestras fueron almacenadas en un congelador a - 75°C hasta su utilización.

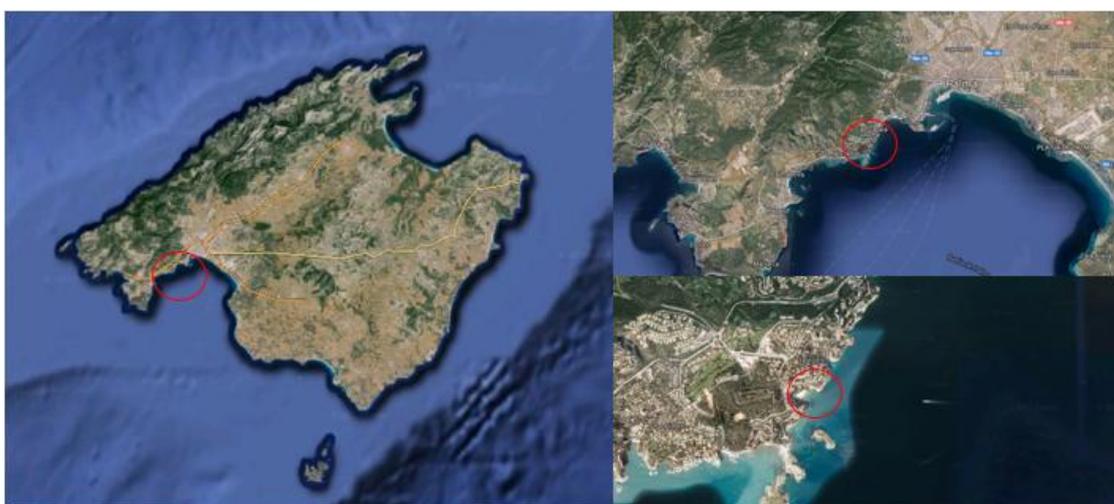


Figura 4. Mapa de la isla de Mallorca donde se remarca la ubicación de la playa de Illetas.

Procesado de las muestras

Las muestras de *Padina pavonica* fueron meticulosamente separadas de los epífitos que contenían antes de ser pesadas y homogenizadas. Se homogenizaron un total de 7 muestras para cada uno grupo de los 3 grupos de experimentación en una proporción 1:10 con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Cuando las muestras fueron correctamente homogenizadas se centrifugaron a 9000 g, 10 minutos a 4°C y se recogió el

sobrenadante descartando así restos celulares y núcleos que se hallaban en el precipitado.

Determinaciones enzimáticas

Todas las determinaciones enzimáticas fueron realizadas con el espectrofotómetro Shimadzu UV-2100 a 25 °C. Además fueron referenciadas con el contenido total de proteína (kit Biorad®, Protein Assay) utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Catalasa

Para la detección de la catalasa se utilizó el método de Aebi²⁶. Este método consiste en medir los cambios en la absorbancia a 240 nm debidos al descenso de H₂O₂ (por la acción de la catalasa de la muestra) en tampón fosfato 50 mM, pH 7.0.

Superóxido dismutasa

En el caso de la enzima SOD se utilizó el método de McCord y Fridovich²⁷. Este método consiste en la utilización del sistema xantina/xantina oxidasa para producir radicales superóxido que reducirán la proteína citocromo c. La enzima superóxido dismutasa, procedente de la muestra de *P. pavonica*, eliminará las moléculas de O₂⁻ disminuyendo la reducción de citocromo c. La reducción del citocromo c la pudimos monitorizar a 550 nm.

Glutación reductasa

La actividad de este enzima fue determinada mediante el método de Goldberg y Spooner²⁸. Este método consiste en la detección del NADPH que se va consumiendo para formar glutación reducido a partir de glutación disulfuro. Se monitorizaron los cambios de NADPH en el tiempo a 339 nm.

Glutación peroxidasa

Se utilizó el método de Flohé y Gunzler para la detección de la actividad de la enzima glutación peroxidasa²⁹. Se determinó su actividad mediante la utilización de glutación reducido, glutación reductasa y NADPH. La medición se realizó a 339 nm de longitud de onda.

Glutación S-transferasa

El método de Habig fue utilizado para medir la actividad de la enzima glutación S-transferasa³⁰. Para este método se utilizó glutación reducido y 1-cloro-2,4-dinitrobencono (CDNB) en tampón fosfato 100 mM para que la reacción catalizada por la enzima GST se llevara a cabo. La variación de la absorbancia se determinó a 340 nm para comprobar la variación de CDBN.

Marcador de peroxidación lipídica

Como marcador de peroxidación lipídica se utilizó el malondialdehido (MDA). Fue detectada mediante la utilización de un kit colorimétrico específico para MDA (Calbiochem®, San Diego, CA, USA). Las muestras y el patrón se introdujeron en tubos de cristal que contenían 1-metil-2-fenilindol que estaba diluido en acetonitrilo y metanol (3:1). A estas muestras se les añadió HCl 12 N y se incubaron a 45 °C durante 1 hora. Después de la espera se procedió a la lectura a 586 nm. Para calcular la proporción de MDA que contenían las muestras se utilizó un patrón con una concentración conocida de MDA.

Análisis de las muestras

Para el análisis estadístico de las muestras se utilizó el programa SPSS v.21 para Windows®. La diferencia significativa de los resultados se realizó mediante la técnica del análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) teniendo en cuenta los tres grupos de muestras. Previamente se realizó es test de la homogeneidad de la varianza (test de Levene) para determinar la normalidad de los datos. Los valores se presentan como la media más el error estándar.

Resultados

Se seleccionaron 3 grupos distintos para realizar el estudio: control, lophocladia y cystoseira. El grupo control consiste en el alga autóctona (*Padina pavonica*) sin sufrir epifitación por ninguna otra alga, el grupo lophocladia consiste en el alga autóctona epifitada por el alga invasora *Lophocladia lallemandii* propia del Océano Índico y el grupo cystoseira consiste en la alga autóctona sufriendo una competencia por los nutrientes por otra alga autóctona propia del Mar Mediterráneo (*Cystoseira spp.*).

Enzimas antioxidantes

Las actividades de las enzimas antioxidantes aparecen representadas en la figura 5. Los resultados obtenidos evidencian que en todas las enzimas determinadas la especie *P. pavonica* del grupo control presenta valores de actividad menores de todas las enzimas antioxidantes respecto a los otros dos grupos ($p < 0.05$). Los valores de actividad fueron entre 2 y hasta casi 4 veces mayores en los grupos distintos al control respecto al mismo. No se observan diferencias significativas entre *P. pavonica* epifitada por la especie invasora (*Lophocladia lallemandii*) y la misma alga en competición con la alga autóctona (*Cystoseira spp.*).

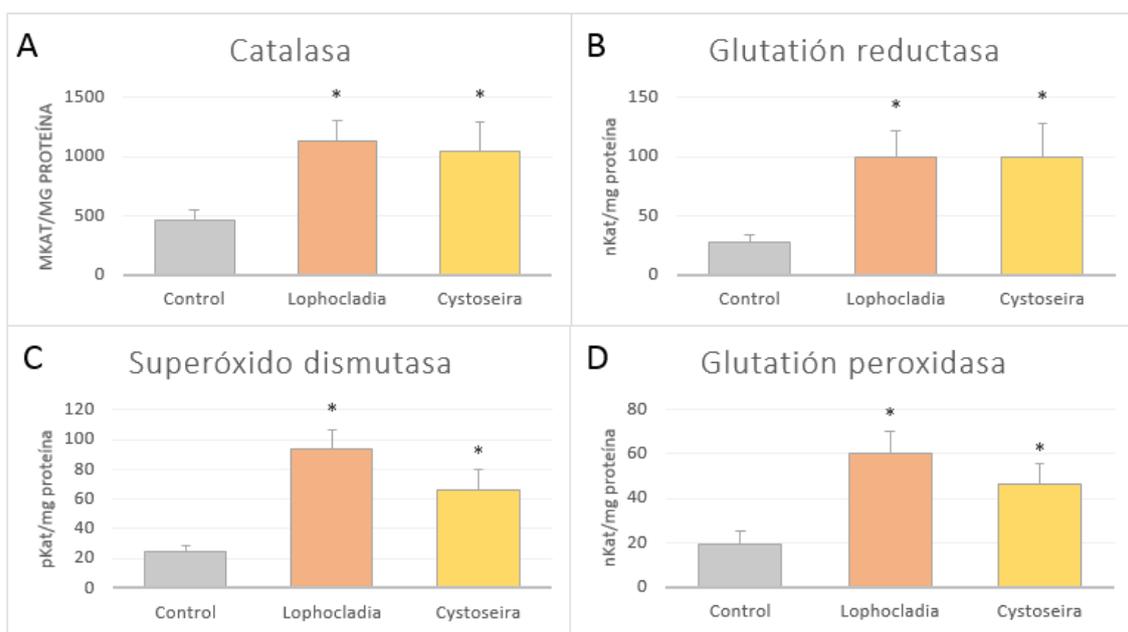


Figura 5. Actividad de las enzimas catalasa (A), GR (B), SOD (C) y GPX (D) en los grupos control, lophocladia y cystoseira. (*) Representa diferencias significativas entre el grupo control y el grupo que contiene el símbolo (ANOVA, $P < 0.05$).

Actividad GST

Se ha utilizado la actividad de la enzima GST como indicador del proceso de detoxificación. Estos valores aparecen representados en la figura 6. Observamos cómo esta actividad varía respecto la de los enzimas antioxidantes ya que solo hay diferencias significativas entre el grupo control y el grupo lophocladia ($p < 0.05$) no así entre el grupo control y cystoseira ($p = 0.134$). También podemos apreciar diferencias significativas entre el grupo lophocladia y el grupo cystoseira ($p < 0.05$).

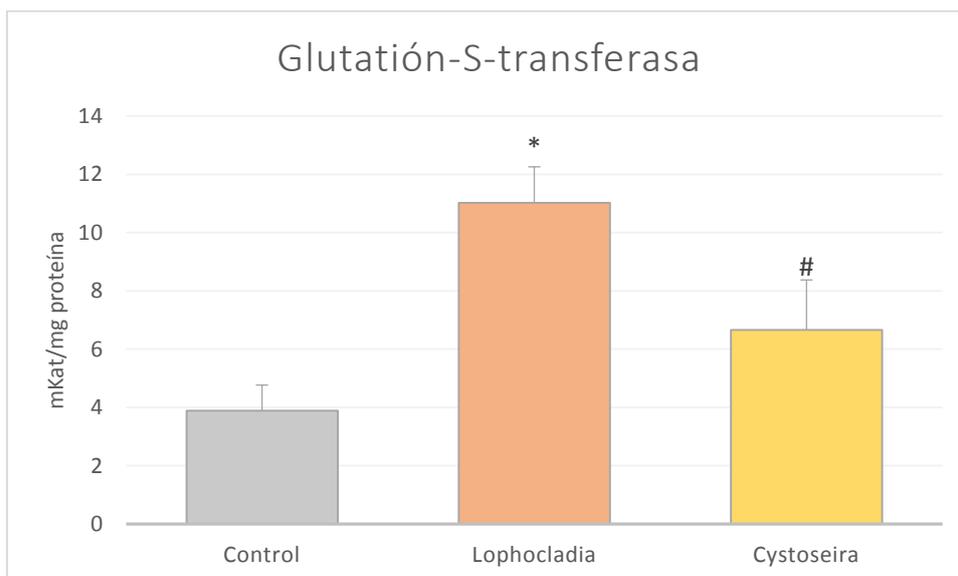


Figura 6. Actividad enzimática de la enzima GST en los grupos control lophocladia y cystoseira. (*) Representa diferencias significativas entre el grupo control y el grupo que contiene el símbolo (ANOVA, $p < 0.05$). (#) Representa diferencias significativas entre el grupo lophocladia y el que con tiene el símbolo (ANOVA, $p < 0.05$).

Daño oxidativo

Como marcador de peroxidación lipídica en el alga diana se ha utilizado el MDA del cual podemos ver los resultados obtenidos en la figura 7. En la gráfica antes citada se pueden observar diferencias significativas entre el grupo control el grupo lophocladia ($p < 0.05$). Aunque el grupo cystoseira presenta niveles más elevados que el grupo control, éstos no llegan a ser significativos ($p = 0.072$). Los niveles observados en el grupo de lophocladia son significativamente más elevados que los obtenidos en cystoseira ($p < 0.05$).

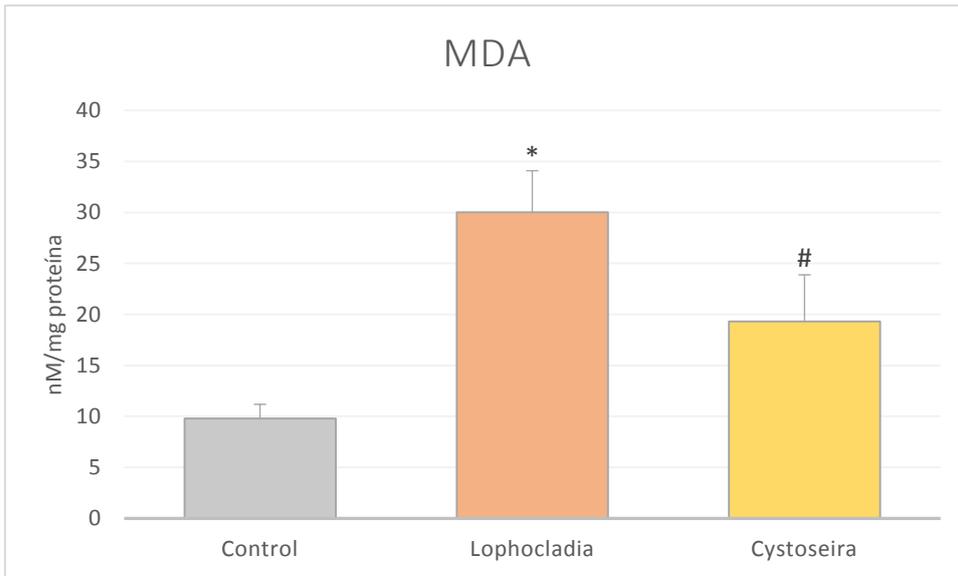


Figura 7. Concentración de MDA en los grupos control, lophocladia y cystoseira. (*) Representa diferencias significativas entre el grupo que tiene el símbolo y el grupo control (ANOVA, $p < 0.05$). (#) Representa diferencias significativas entre el grupo que contiene el símbolo y el grupo lophocladia (ANOVA, $p < 0.05$)

Discusión

La presencia de especies invasoras supone un gran problema para los ecosistemas a lo largo de todo el mundo. En el caso del Mar Mediterráneo este problema se ve agravado al tratarse de un mar relativamente pequeño y semi-cerrado. La presencia de especies invasoras puede provocar importantes cambios en los ecosistemas marinos modificando su estructura y composición. De hecho, estudios previos realizados en aguas de Mallorca han evidenciado como una especie invasora, como *L. lallemandii*, es capaz de alterar el ecosistema marina afectando no solo a algas sino también a otras especies³¹.

El alga *Padina pavonica* fue recogida de la zona de Illetas en la isla de Mallorca en 3 situaciones distintas: sin ningún signo de competencia o epifito, con evidencias de epifito por parte del alga roja *Lophocladia lallemandii* y en estado de competencia directa con algas de la familia *Cystoseira spp.* En el presente estudio hemos podido visualizar resultados muy similares teniendo un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes en *P. pavonica* cuando estaba siendo epifitada y cuando estaba en competición directa con otra alga (fig. 4). El aumento de enzimas antioxidantes podría estar relacionado con un aumento de la producción de ROS. La producción de ROS se ha demostrado que tiene una contribución significativa para la supervivencia de las algas frente a los herbívoros y epífitos o en situaciones de competencia directa con otras especies de algas³². Esto es posible debido a que los ROS de vida media más larga, como el H_2O_2 , son capaces de desplazarse lejos de su lugar de síntesis e incluso, atravesar membranas biológicas²⁰. De hecho se ha visto en otros estudios que otras especies de algas que sufrían los efectos de epífitos sufrían un mayor estrés oxidativo además de tener una sufrir una pérdida de densidad en la zona afectada^{20,33}. En el caso de *P. pavonica* en competición directa con *Cystoseira spp.*, su aumento puede ser debido al mismo motivo que para *Lophocladia*, un aumento en la producción de ROS. En estudios de Cavas y Yurdakoc (2005), con *P. pavonica* vieron como esta alga tiene mayores defensas antioxidantes frente al peróxido de hidrógeno que una especie de alga del género *Cystoseira*³⁴. Todo esto nos lleva a pensar que efectivamente el aumento de defensas antioxidantes es un mecanismo compensatorio por el aumento

de ROS producido por *P. pavonica* para defenderse frente a otras especies que la afectan negativamente.

Aunque los resultados nos muestren una actividad superior de las enzimas antioxidantes de *P. pavonica*, cuando está en competición con otras algas, podemos observar como solamente en el caso de epifitismo por *L. lallemandii* se aprecia un aumento significativo de los niveles de MDA (fig. 6). El MDA es un biomarcador del daño celular producido por los ROS, y sirve para cuantificar el grado peroxidación lipídica que la célula ha sufrido. Esta elevación de la peroxidación lipídica respecto el control se ha visto, también, en otros estudios en donde también participaba el alga roja *L. lallemandii*^{16,20}. Una posible explicación para la elevación del MDA podría ser la producción de lofocladinas, por parte del alga roja, moléculas que se han visto que tienen capacidad citotóxica y que podría provocar un aumento del estrés por parte de la célula epifitada. Por tanto, a la vista de los resultados, podemos ver como *P. pavonica* no es capaz de mitigar totalmente la elevación de ROS, aunque se eleven las actividades de las enzimas antioxidantes, y éstos son capaces de producir daños a las células²³. En presencia de *Cystoseira spp.* se observa que el MDA no aumenta lo que sugiere que la *P. pavonica* es capaz de mantener su estado oxidativo en niveles normales. Estudios anteriores han evidenciado la capacidad de adaptación de las defensas antioxidante frente a situaciones distintas de estrés, evidenciando aumentos de los niveles antioxidantes pero sin evidencia de daño oxidativo. En un estudio se ha observado como el pez *Coris julis* viviendo sobre el alga invasora *Caulerpa taxifolia* presentaba actividades elevadas de los enzimas antioxidantes pero no mostraba evidencias de daño oxidativo³⁵. En otro estudio realizado con mejillones, *Mytilus galloprovinciales*, recogidos en diferentes zonas de las Islas Baleares caracterizadas por el grado de contaminación, las defensas antioxidantes demostraron una gran capacidad de adaptación evitando la aparición de daño oxidativo¹⁶. Así, la competencia natural con la especie autóctona existe, pero *P. pavonica* es capaz de responder y adaptarse a esta situación.

La subida de la actividad de la enzima GST (fig. 5) en el grupo lophocladia se podría justificar, también, por la acción de las lofocladinas de *L. lallemandii*, ya que la enzima participa en la vía de detoxificación de las células. La GST se caracteriza por catalizar la

conjugación de glutatión con xenobióticos haciendo que éstos sean más fácilmente expulsables de la célula u organismo. Por esto no se observa un aumento significativo de la enzima GST cuando está en junto a *Cystoseira spp.* ya que esta alga no produce ningún compuesto potencialmente citotóxico. Estos resultados también se ha visto en otros estudios en donde se analizaba el daño que podía realizar *L. lallemandii* sobre otros organismos como bivalvos o equinodermos^{36,37}.

Conclusión

Los resultados obtenidos evidencian la existencia de estrés oxidativo cuando la alga autóctona *P. pavonica* entra en competencia directa con otras algas. No obstante, el estrés producido por la competición con el alga *Cystoseira spp.*, propia del Mar Mediterráneo, no llega al nivel de cuando está siendo epifitada por *L. lallemandii* una alga invasora que, además de competir por recursos como la luz, libera sustancias citotóxicas que afectan de manera negativa a *P. pavonica*. Este aumento del estrés de *P. pavonica* debería estudiarse en más profundidad para ver si es capaz de disminuir el número de ejemplares totales en las aguas del mediterráneo.

Bibliografía

1. Tripathy, B. C. & Oelmüller, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* **7**, 1621–33 (2012).
2. Venereo Gutiérrez, J. R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cuba. Med. Mil.* **31**, 126–133 (2002).
3. Zorrilla García, A. E., Eirez Izquierdo, M. & Izquierdo Expósito, M. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas* **23**, 51–57 (2004).
4. Addabbo, F., Montagnani, M. & Goligorsky, M. S. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension* **53**, 885–92 (2009).
5. Steffens, B., Steffen-Heins, A. & Sauter, M. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Front. Plant Sci.* **4**, 179 (2013).
6. Holley, A. K., Bakthavatchalu, V., Velez-Roman, J. M. & St Clair, D. K. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 7114–62 (2011).
7. Información sobre la enzima catalasa en la sección ‘gene’ de la página NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/847>>
8. Información sobre la enzima glutatión peroxidasa en la sección ‘gene’ de la página NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2876>>
9. Información sobre la enzima glutatión reductasa en la sección ‘gene’ de la página NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2936>>
10. Lubos, E., Handy, D. E. & Loscalzo, J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front. Biosci.* **13**, 5323–44 (2008).
11. Definición de estrés oxidativo del buscador MeSH de la página NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68018384>>
12. Tangvarasittichai, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* **6**, 456–80 (2015).
13. Coleman, J., Blake-Kalff, M. & Davies, E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* **2**, 144–151 (1997).
14. Edwards, R., Dixon, D. P. & Walbot, V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **5**, 193–8 (2000).

15. Definición de biomarcador del buscador MeSH de la página NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=biomarker>>
16. Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A. & Deudero, S. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **146**, 531–9 (2007).
17. Lima, T. M. de *et al.* pH in exhaled breath condensate and nasal lavage as a biomarker of air pollution-related inflammation in street traffic-controllers and office-workers. *Clinics (Sao Paulo)*. **68**, 1488–94 (2013).
18. Da Costa, A. G. *et al.* The robust and modulated biomarker network elicited by the *Plasmodium vivax* infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. *J. Immunol. Res.* **2014**, 318250 (2014).
19. Livingstone, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 656–66 (2001).
20. Sureda, A., Box, A., Terrados, J., Deudero, S. & Pons, A. Antioxidant response of the seagrass *Posidonia oceanica* when epiphytized by the invasive macroalgae *Lophocladia lallemandii*. *Mar. Environ. Res.* **66**, 359–63 (2008).
21. Katsanevakis, S. *et al.* Invading the Mediterranean Sea: biodiversity patterns shaped by human activities. *Front. Mar. Sci.* **1**, (2014).
22. Página del ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente, sección de catálogo español de especies exóticas invasoras. at <http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/Lophocladia_lallemandii_2013_tcm7-306904.pdf>
23. Gross, H. *et al.* Lophocladines, bioactive alkaloids from the red alga *Lophocladia* spp. *J. Nat. Prod.* **69**, 640–4 (2006).
24. M.^a Carme Barceló, Amelia Gómez Garreta, M. . A. R. & J. R. L. Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica e Islas Baleares. XI. *Lobophora variegata* (Lamour.) Womersley, *Padina pavonica* (L.) Thivy y *Zonaria tournefortii* (Lamour.) Mont. (Dictyotales, Fucophyceae). 8 (1998). at <<http://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/view/BOCM9898110179A/6446>>
25. Página oficial de la estación marina Smithsonian, información sobre la especie *Padina pavonica*. at <http://www.sms.si.edu/irlspec/Padina_pavoni.htm>
26. Aebi, H. *Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology* **105**, (Elsevier, 1984).

27. McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–55 (1969).
28. Goldberg, D. M. & Spooner, R. J. *Methods in enzymatic analysis.* (1984).
29. Flohé, L. & Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114–21 (1984).
30. Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–9 (1974).
31. Rodríguez, C., Box, A. & Deudero, S. Amfípodes associats a comunitats algals i detritus amb presència de l'alga invasora *Lophocladia lallemandii* al Parc Natural de sa Dragonera (Illes Balears). *Bolletí la Soc. d'Història Nat. les Balear.* **52**, 203–220 (2009).
32. Choo, K., Snoeijs, P. & Pedersén, M. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlfneriana*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **298**, 111–123 (2004).
33. Ozimek, T., Pieczyńska, E. & Hankiewicz, A. Effects of filamentous algae on submerged macrophyte growth: a laboratory experiment. *Aquat. Bot.* **41**, 309–315 (1991).
34. Cavas, L. & Yurdakoc, K. A comparative study: Assessment of the antioxidant system in the invasive green alga *Caulerpa racemosa* and some macrophytes from the Mediterranean. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **321**, 35–41 (2005).
35. Sureda, A. *et al.* Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpenyne. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **144**, 191–6 (2006).
36. Box, A., Sureda, A. & Deudero, S. Antioxidant response of the bivalve *Pinna nobilis* colonised by invasive red macroalgae *Lophocladia lallemandii*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **149**, 456–60 (2009).
37. Tejada, S., Deudero, S., Box, A. & Sureda, A. Physiological response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* fed with the seagrass *Posidonia oceanica* and the alien algae *Caulerpa racemosa* and *Lophocladia lallemandii*. *Mar. Environ. Res.* **83**, 48–53 (2013).