



**Universidad
de La Laguna**

Trabajo de Fin de Grado

Peroxidasas del género Artemisia. Inducción y detección de actividad peroxidasa excretada en raíces “in vivo”



Itahisa Méndez Perdomo

5º Grado en Farmacia

Curso 2018-2019

Tutor:

Dr. Ignacio Frías Viera

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Molecular y Genética

Área de conocimiento: Bioquímica y Biología Molecular

AGRADECIMIENTOS

Hoy no podría estar defendiendo este trabajo sin la ayuda que me ha brindado mi tutor Ignacio Frías Viera, al que quiero agradecer su implicación en el desarrollo de este proyecto. Gracias por servirme de soporte, por aclararme cualquier tipo de duda que me surgiera, por la claridad de las explicaciones y por enseñarme un mundo tan nuevo y diferente del que había conocido durante estos años del grado, al abrirme el mundo experimental con tanta pasión.

También quiero darle las gracias a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermano, por aguantarme cuando ya no podía más y ayudarme a levantar pero sobre todo por toda la ayuda y amor que me han brindado y por servirme de apoyo a lo largo de estos años.

Por último, quiero darle las gracias a mi pareja, Denis, la persona que me ha soportado todos los días y que ha vivido a mi lado este largo proceso del desarrollo del Trabajo Final de Grado y este año académico tan intenso, pero gracias, sobre todo, por animarme y no dejar que me rindiera cuando todo parecía imposible a lo largo de la carrera.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. El significado de Artemisia en la Farmacia	3
1.2. Especies de Artemisia en Canarias	3
1.3. Metabolismo secundario de Artemisia: Terpenoides en Artemisia. La Artemisinina	4
1.4. El uso de los terpenoides de Artemisia en la malaria	4
1.4.1. Perspectivas futuras para la artemisinina	5
1.5. Las Peroxidasas en las rutas de síntesis y degradación de la Artemisinina	5
1.5.1. Peroxidasas. Generalidades	5
1.5.2. Peroxidasas presentes en Artemisia	6
1.5.2.1. Clase I: Peroxidasas de procedencia evolutiva procariota	6
1.5.2.2. Clase III: Peroxidasas de secreción en plantas	7
1.5.3. Papel de las peroxidasas en el metabolismo secundario de Artemisia	7
1.6. Efecto del estrés sobre el metabolismo secundario de Artemisia ...	7
1.6.1. Efecto del estrés UVB sobre la producción de metabolitos secundarios en Artemisia	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Metodología exposición a luz UVB	11
3.2. Extracción de enzimas	12
3.3. Determinación de la concentración de proteínas en las muestras vegetales	12
3.4. Determinación de la actividad peroxidasa	12
3.5. Ensayos histológicos de la presencia de Peroxidasas en raíz	13

3.5.1. Obtención del material vegetal	13
3.5.2. Obtención y observación de las fotomicrografías	14
3.5.3. Tinción específica para peroxidasas	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Determinación de guaiacol peroxidasa y ascorbato peroxidasa	15
4.2. Ensayos histológicos de la presencia de peroxidasas en raíz	16
5. DISCUSIÓN	19
6. CONCLUSIONES.....	20
7. BIBLIOGRAFÍA	21

ABSTRACT

The genus *Artemisia* contains an important number of species that shown secondary compounds with demonstrated biotechnological and pharmaceutical interest as the terpenoids artemisinin of *A. annua*. Different forms of cytoplasmic peroxidases enzymes are involved in the synthesis and degradation pathways; in a balance regulated both by external factors and by metabolic routes bellowing to growth and maturation. The principal task of this work is to detect in roots of *Artemisia thuscula*, the peroxidase activity both kinetic and histological in conditions of induction of the secondary metabolism. Under our experimental conditions, we have developed protocols for the detection and quantification of the enzymes guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase by spectrophotometric assay from root extracts of control plants and from induced plants generated by the exposure to 285 nm UVB light. In addition, we have developed protocols for the detection in root slices of the products generated by both enzymes. Our results show the relative increase of ascorbate peroxidase activity and the decrease in guaiacol peroxidase activity in plants induced by UVB light compared to controls. These results are consistent with the accepted concept in reference to the induction of secondary metabolism in plants, that type I and III peroxidases respectively play.

Keywords: guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, *Artemisia*, root, UVB.

RESUMEN

El género *Artemisia* contiene un importante número de especies que poseen compuestos secundarios con demostrado interés biotecnológico y farmacéutico como la artemisinina destacado terpenoide de *A. annua*. Diferentes formas de peroxidases citoplásmicas forman parte de vías de síntesis y degradación; en un equilibrio regulado tanto por factores externos como de las propias rutas metabólicas de crecimiento y maduración. El objetivo del presente trabajo es detectar la actividad peroxidasa tanto cinética como en cortes de raíces de *Artemisia thuscula* (*A. thuscula*). En las condiciones de nuestros ensayos, hemos puesto a punto los protocolos para la detección y cuantificación de las enzimas guaiacol peroxidasa y ascorbato peroxidasa, mediante espectrofotometría, a partir de extractos de raíces de plantas control y plantas inducidas por exposición a luz UVB de 285 nm. Además, hemos desarrollado protocolos para la detección en cortes de raíz de los productos generados por ambas enzimas. Nuestros resultados muestran el incremento relativo de la actividad ascorbato peroxidasa y la disminución de la actividad guaiacol peroxidasa en plantas inducidas por luz UVB respecto de los controles. Estos resultados están en consonancia con el significado que para la inducción del metabolismo secundario en plantas representan las peroxidases tipo I y III respectivamente.

Palabras clave: guaiacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa, *Artemisia*, raíces, UVB.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El significado de Artemisia en la Farmacia

En el género *Artemisia*, varias especies poseen interés farmacológico. En oriente y desde la antigüedad, *Artemisia annua* ha sido utilizada, en forma de infusión, para el tratamiento de la fiebre y problemas intestinales.⁽¹⁾

Hoy sabemos que *Artemisia* produce un metabolito secundario con una excelente capacidad antimalárica, la artemisinina, pero las propiedades medicinales de diferentes especies de este género son múltiples como por ejemplo su uso como agente antitumoral, debido a sus efectos antiproliferativos contra una amplia gama de líneas celulares de cáncer.⁽²⁾

1.2. Especies de Artemisia en Canarias

Clasificación botánica
Reino: <i>Plantae</i>
División: <i>Magnoliophyta</i>
Clase: <i>Magnoliopsida</i>
Orden: <i>Asterales</i>
Familia <i>Asteraceae</i>
Género: <i>Artemisia</i>

Tabla 1. Clasificación botánica de las especies de *Artemisia*.

Tres especies son endémicas de las islas Canarias: *Artemisia ramosa*, *Artemisia reptans* y *Artemisia thuscula*. Las tres especies se localizan en las Islas mayores del Archipiélago y normalmente en localizaciones costeras hasta los 600 m.⁽³⁾



Figura 1. *Artemisia ramosa* C. Sm. in Buch arbusto perenne y aromático, conocida como **incienso morisco**.⁽³⁾



Figura 2. *Artemisia reptans* C. Sm. in Buch clasificada como de interés para los ecosistemas canarios, posee un porte rastroso característico, conocida como **incienso menudo**.^{(3),(4)}



Figura 3. *Artemisia thuscula* Cav.: frecuente en suelos removidos, arbusto muy ramificado y con capítulos amarillos, conocida como **incienso canario**.⁽³⁾

1.3. Metabolismo secundario de Artemisia: Terpenoides en Artemisia. La Artemisinina

Han sido aislados en diferentes especies de Artemisia, numerosos metabolitos secundarios,⁽⁵⁾ entre los que destaca un tipo de lactona sesquiterpénica, la artemisinina y sus derivados, los cuales constituyen los compuestos de mayor interés por sus propiedades antipalúdicas.

El extracto de artemisinina fue aislado por primera vez por la científica china **Tu Youyou** y su equipo científico en 1972. En 1978 caracterizaron su estructura tridimensional, la cual reveló que se trataba de una lactona sesquiterpénica con un grupo peróxido;⁽⁶⁾ estudios posteriores demostraron que esta porción es esencial para su efecto letal sobre el parásito.⁽⁷⁾

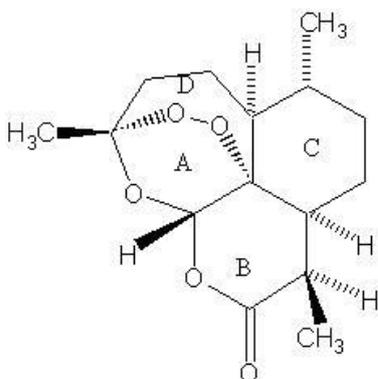


Figura 4. Estructura química de la artemisinina: lactona sesquiterpénica que pertenece al grupo de los terpenoides (o isoprenoides), en la cual se distingue un anillo tiroxánico (A) que contiene un enlace peroxídico, una lactona (B), un ciclohexano (C) y un oxacicloheptano (D).⁽¹⁾

1.4. El uso de los terpenoides de Artemisia en la malaria

La recomendación de la OMS para el tratamiento de la malaria en zonas endémicas se basa en el uso de terapias combinadas con artemisinina (TCA).⁽⁸⁾

Estos tratamientos combinan dos principios activos con diferentes mecanismos de acción y actualmente suponen el tratamiento de primera línea en la lucha contra la malaria.

1.4.1. Perspectivas futuras para la artemisinina

En los últimos años, el acceso a los TCA se ha ampliado de manera sustancial. Un estimado de 2.74 mil millones de tratamientos de TCA fueron adquiridos por los países durante el período 2010-2017, con un pico de ventas en 2016.⁽⁸⁾

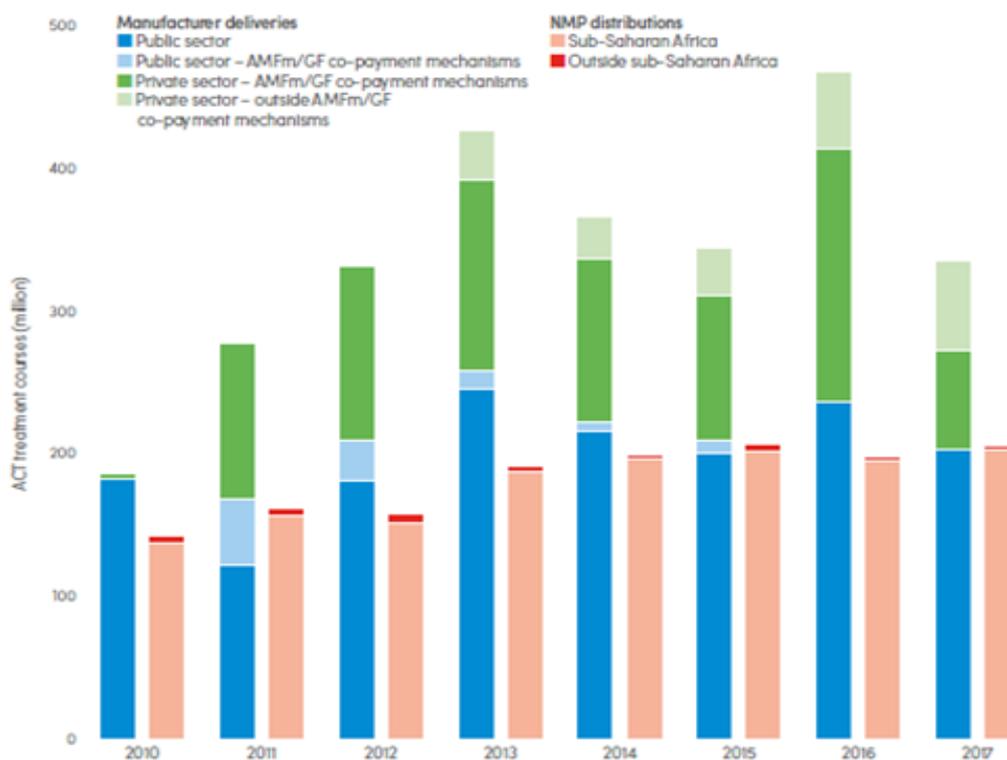


Figura 5. Número de cursos de tratamiento TCA administrados por fabricantes y distribuidos por NMP a pacientes, 2010–2017.⁽⁸⁾

Debido al incremento en el uso de TCA como tratamiento de primera línea en la lucha contra la malaria y de la escasez de artemisinina y de su alta demanda a nivel mundial, es importante encontrar nuevos métodos que nos permitan obtener grandes cantidades de artemisinina sin que el costo económico suponga una barrera infranqueable, ya sea mejorando la síntesis química o bien estableciendo condiciones que favorezcan el aumento de artemisinina en varias etapas de la vida vegetativa de la planta.⁽⁹⁾

1.5. Las peroxidasas en las rutas de síntesis y degradación de la Artemisinina

1.5.1. Peroxidasas. Generalidades

Las peroxidasas son hemoproteínas que se encuentran dentro del grupo de las enzimas oxidorreductasas, presentan el código enzimático EC.1.11.1.⁽¹⁰⁾

Número EC	Nombre recomendado	Abreviación
EC 1.11.1.1	Peroxidasa NADH	NadPrx
EC 1.11.1.2	Peroxidasa NADPH	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.3	Peroxidasa de ácidos grasos	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.11 (antes EC 1.11.1.4)	Triptófano 2,3-dioxigenasa	Ya no se considera como una peroxidasa
EC 1.11.1.5	Citocromo-c Peroxidasa	CcP, DiHCcP
EC 1.11.1.6	Catalasa	CAT
EC 1.11.1.7	Peroxidasa	Hemo peroxidasa
EC 1.11.1.8	Yoduro peroxidasa	TPO
EC 1.11.1.9	Glutación peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.10	Cloruro peroxidasa	HalPrx, HalNPrx, HalVPrx
EC 1.11.1.11	L-Ascorbato peroxidasa	APx
EC 1.11.1.12	Glutación hidroperóxido fosfolipídico peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.13	Manganeso peroxidasa	MnP
EC 1.11.1.14	Lignina peroxidasa	LiP
EC 1.11.1.15	Peroxiredoxina	1CysPrx, 2CysPrx, PrxII/IV/PrxGrx, PrxQ/BCP
EC 1.11.1.16	Peroxidasa versátil	VP

Figura 6. Clasificación de las peroxidasa según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular; actualmente hay catalogados 16 códigos enzimáticos (EC) diferentes para las peroxidasa.⁽¹⁰⁾

En Plantas superiores, las peroxidasa predominantes son las EC.1.11.1.7, oxidorreductasa donadora de H₂O₂ que se encuentran ampliamente distribuidas⁽¹¹⁾ y que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos diferentes, en un ciclo catalítico de tres pasos.⁽¹²⁾ Estas enzimas, presentan una actividad catalítica en la que los productos resultantes suelen ser compuestos coloreados.

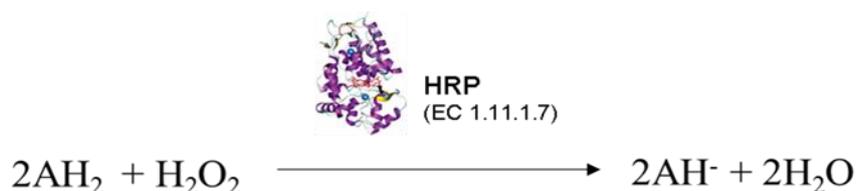


Figura 7. Esquema global de la reacción llevada a cabo por las peroxidasa. En este proceso intervienen dos sustratos, un oxidante (H₂O₂) y un reductor (AH₂).

1.5.2. Peroxidasa presentes en Artemisia

Dos Clases de peroxidasa, atendiendo a su origen, sustratos y funciones destacan.

1.5.2.1. Clase I: Peroxidasa de procedencia evolutiva procariota

Estas enzimas están implicadas en la detoxificación de la planta. Dentro de este grupo se incluyen peroxidasa intracelulares, entre las que se encuentra la

ascorbato peroxidasa (APX), responsable de la eliminación del H₂O₂ en cloroplasto y citosol de plantas superiores.⁽¹³⁾ De forma generalizada, muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico, y son consideradas enzimas muy termolábiles.

1.5.2.2. Clase III: Peroxidasas de secreción en plantas

Estas proteínas, localizadas en vacuolas y paredes vegetales celulares, muestran una baja especificidad de sustrato, pero presentan una notable afinidad por el guaiacol, de ahí su denominación genérica como **Guaiacol Peroxidasas (GPX)**.⁽¹⁴⁾ Además, estas enzimas presentan una inusual estabilidad térmica.⁽¹⁰⁾

1.5.3. Papel de las peroxidadas en el metabolismo secundario de Artemisia

El análisis proteómico de *A. annua* ha dilucidado las rutas biosintéticas y de degradación de importantes metabolitos secundarios presentes en la raíz de esta planta, principalmente la artemisinina.⁽¹⁵⁾

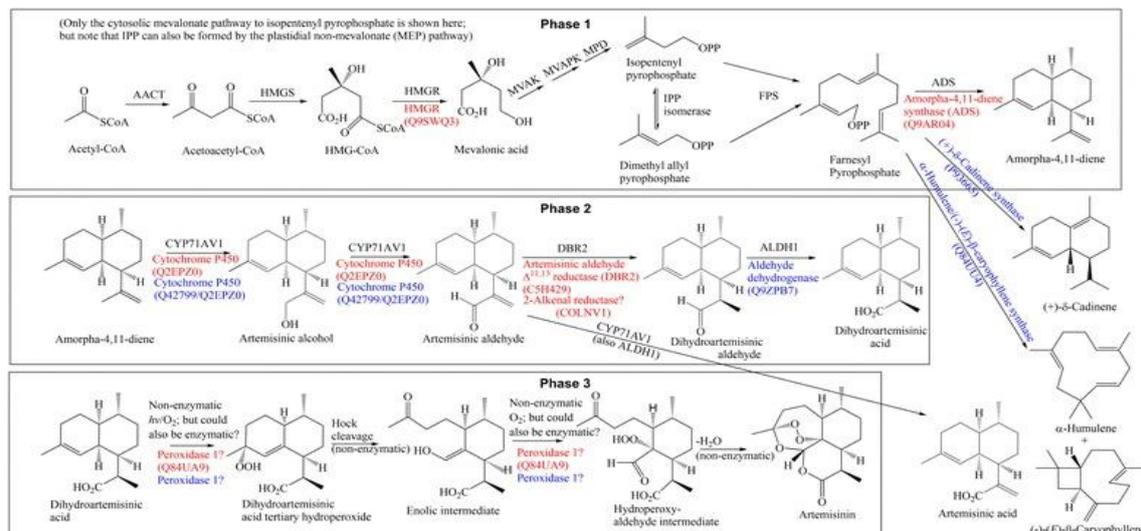


Figura 8. Ruta biosintética de artemisinina descrita en tres fases, donde se indica la presencia e inducción de las dos diferentes formas de peroxidadas citadas en la síntesis y en los procesos de degradación.⁽¹⁵⁾

Las peroxidadas de la raíz de Artemisia se han relacionado con la concentración de metabolitos secundarios, conocemos el papel de la inducción del metabolismo secundario de las plantas donde participan peroxidadas de Clase III. De la misma manera se ha relacionado los niveles de peroxidadas de Clase I en la degradación de las reservas de artemisinina en *A. annua* en presencia de ciertos estímulos.

1.6. Efecto del estrés sobre el metabolismo secundario de Artemisia

A. annua ha sido empleada como especie modelo para estudiar el efecto de diferentes inductores del metabolismo secundario. El estrés abiótico como una

moderada carencia de agua incrementa la producción de artemisinina en un proceso mediado por los niveles de expresión de la Ascorbato peroxidasa y otras enzimas de la ruta biosintética.^{(16),(17)} El aluminio, mediado por peroxidasa y catalasas, afecta a la producción de metabolitos secundarios.⁽¹⁸⁾ Cabe señalar que las especies reactivas de oxígeno actuando sobre los tricomas inducen en raíces la acumulación de artemisinina.⁽¹⁹⁾ El arsénico, induce un efecto de inducción en *A. annua* creciendo en condiciones hidropónicas al tiempo que se inducen las peroxidasa tipo III (GPX).⁽²⁰⁾

1.6.1. Efecto del estrés UVB sobre la producción de metabolitos secundarios en Artemisia

La radiación ultravioleta (UV) representa solamente una pequeña porción de la radiación solar que llega a la superficie terrestre.⁽²¹⁾ Sin embargo, su impacto en los procesos biológicos es considerado de gran importancia.^{(22),(23)}

La región ultravioleta está comprendida entre longitudes de onda que van desde los 400 a los 100nm. A lo largo de esta región, podemos diferenciar tres tipos de radiación UV en función de las longitudes de ondas y de los efectos que son capaces de producir en los seres vivos: radiación UV-C (100-280nm), radiación UV-B (280-315nm) y radiación UV-A (315-400nm).⁽²⁴⁾

En general, los rayos UVB cargados altamente de energía, resultan nocivos para la vida, al producir efectos negativos en la mayoría de los seres vivos.^{(25),(26),(27),(28)} Este efecto se incrementa en organismos sésiles que no pueden escapar de su acción, como es el caso de las plantas, la cuales han desarrollado diferentes formas de respuesta a la exposición a este tipo específico de radiación.^{(29),(30),(31)}

Especialmente interesante, desde el punto de vista de este trabajo es el efecto ejercido sobre los terpenoides. Los estudios llevados a cabo indican que la radiación UVB induce el aumento del contenido de terpenos en hojas de varias especies.⁽³²⁾

Hay que tener en cuenta, que en función de la intensidad de la radiación UVB, las alteraciones que se producen en la planta son diferentes: a baja incidencia de UVB, se estimulan algunos genes que están involucrados en procesos de protección frente a la radiación UVB;⁽³³⁾ a alta incidencia de UVB, esta radiación actúa causando daño en las biomoléculas por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).^{(34),(35),(36)} Bajo estas condiciones y para defenderse de las ROS, la planta produce sustancias antioxidantes como son el ácido ascórbico y el alfa-tocoferol^{(35),(36)} y aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la dismutasa superóxido, la ascorbato peroxidasa, la reductasa glutatión y la peroxidasa guaiacol. ^{(35),(37)}



Figura 9. Alteraciones moleculares, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos inducidos por la radiación UVB en las plantas. ⁽³⁸⁾

Se deduce que el efecto de la administración de luz UV, especialmente del tipo B, sobre las plantas representa una de las formas más apropiadas para los experimentos de inducción de metabolitos secundarios en *Artemisia*. Por otro lado, la complejidad del estudio nos limita a estudiar la presencia de las dos principales formas de peroxidasa (Clase I y Clase III) presentes en las raíces de *Artemisia thuscula*.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es determinar y cuantificar la presencia de actividad peroxidasa en raíces “in vivo” de *Artemisia thuscula* y demostrar como mediante un estrés inducido con luz UVB se ve incrementada dicha actividad. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificar espectrofotométricamente la presencia de la Ascorbato peroxidasa (APX) así como de Guaiacol Peroxidasa (GPX) en raíces de *A. thuscula* tanto en tejidos control como irradiados con luz UVB.
- Poner en evidencia la presencia de las actividades de dichas peroxidases en las raíces de *A. thuscula*, tanto en tejidos control como irradiados con luz UVB.
- Demostrar, que las variaciones en las actividades de peroxidasa generadas por la exposición a luz UVB permite el objetivo biotecnológico de optimizar la obtención de compuestos con interés farmacológico en *A. thuscula*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Metodología exposición a luz UVB

Los experimentos de estrés lumínico se realizaron dentro de una cámara de incubación en condiciones de oscuridad, donde la temperatura foliar se mantuvo por debajo de los 22°C en todos los ensayos llevados a cabo. Las plantas se sitúan a una distancia foliar entre 15-25 cm de la fuente de emisión de radiación en una plataforma giratoria. Los tiempos y las intensidades se ajustaron a los valores finales de exposición descrito en el experimento. 5 plantas adultas se expusieron a la luz UV y Blanca de baja emisión UV y 3 planta idénticas se mantuvieron bajo luz blanca como control en las mismas condiciones restantes. Se llevaron a cabo periodos de exposición de 1 hora de luz y 1 hora de oscuridad durante 8 horas repetido en 2 ciclos de 24 horas totales. Posteriormente se mantuvieron en las condiciones de reposo durante 24 horas en un ciclo de 12/12 antes de extraer las raíces y emplearlas en los experimentos.



FIGURA 10. Plantas adultas de *A. thauscula* utilizadas para llevar a cabo los experimentos de estrés lumínico.

Fuente de Luz UVB y Blanca de baja emisión:

Se empleó una lámpara de luz fluorescente blanca solar (Silvania T-Reference, con espectro solar limitado con un máximo a 500nm y baja emisión de UVB (UVB <2%) acoplada a una lámpara de luz UV (Philips TL-D 18W BLB 1SL).



Figura 11. Fuentes de luz ultravioleta de los ensayos utilizados: Lámpara de luz blanca acoplada a una lámpara de luz UV (Philips TL-D 18W1SL).

3.2. Extracción de enzimas

Las raíces libres de sustrato se lavaron exhaustivamente en agua corriente fría a 0°C y se dejaron limpias y libres de sustancias extrañas como partículas de polvo, se secaron con papel absorbente. A continuación, las muestras vegetales se pesaron y se mezclaron con PBS en una proporción 1:4 (p/v), y se sometieron a rotura mecánica dentro de bolsas de extracción de la casa comercial BIOREBA (Extraction bags “Universal” 12x15cm). Este sistema de homogenizado es ideal para la extracción de tejidos, y permite una óptima filtración a través de la malla, todo el proceso de rotura de las muestras vegetales dentro de la bolsa de extracción, se realizó sobre una placa fría.



Figura 12. Imagen de raíces de *A. thussula*.

El homogenizado líquido obtenido, se transfirió (mediante una micropipeta) a tubos de polipropileno de fondo redondo y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min en una Centrifuga Superspeed Sorvall RC-5B (a una temperatura entre 2-4°C). La fracción sobrenadante (conteniendo la actividad peroxidasa soluble), se transfirió mediante una pipeta Pasteur desechable a tubos Eppendorf para su congelación.

3.3. Determinación de la concentración de proteínas en las muestras vegetales

Mediante el método de Bradford (Bradford Reagent B6919)⁽³⁹⁾ empleando Albúmina Bovina (SAB) como estándar.

3.4. Determinación de la actividad peroxidasa

Los ensayos espectrofotométricos, realizados para obtener las medidas de absorbancia, se llevaron a cabo a λ donde se exhibía sus valores de absorptividad (A) máximos, aquí expresados como ϵ máximos. De esta forma se ensayó a $\lambda=460\text{nm}$ para el sustrato reductor guaiacol (ϵ tetraguaiacol = $26.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$),

$\lambda=290\text{nm}$ para el sustrato reductor ascorbato ($\epsilon = 11.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción se llevó a cabo en cubetas semi-micro de polipropileno resistentes a los fenoles para el guaiacol, con un volumen máximo de 1.5ml o bien de cuarzo y con el mismo volumen para los ensayos de ascorbato, a las que se les añadió secuencialmente tampón fosfato potásico 100mM, pH 6.5, suficiente para obtener un volumen final de 1000 μl , una alícuota del sustrato reductor (guaiacol) de 20 μl , 100 μl del sobrenadante del extracto crudo de raíces conteniendo las enzimas de peroxidasa a ensayar. La mezcla se equilibra a 25°C antes de disparar la reacción con 10 μl de H_2O_2 (iniciador de la reacción). Este medio de reacción se agitó por succión y se ensayó en el espectrofotómetro empleando un tiempo máximo desde la mezcla hasta obtener el primer dato, de 5 segundos. La duración del experimento entre 1 y 3 minutos asumiendo velocidad inicial. La velocidad se expresó en principio como unidades de absortividad $\times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ y luego se transformó en UI (moles $\times \text{s}^{-1} \times \text{K}^{-1}$) expresadas como $\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$).

3.5. Ensayos histológicos de la presencia de Peroxidasas en raíz.

3.5.1. Obtención del material vegetal

Para el estudio al microscopio óptico, se utilizaron raíces limpias de los ejemplares control y expuestos a luz UVB. Para ello, procedimos a la disección del cuerpo vegetativo de las plantas con ayuda de un bisturí y obtuvimos segmentos transversales de entre 1-2mm de longitud de las raíces que posteriormente se disgregaron en bolsas Bioreba de extracción generando fragmentos de grosor entre 100 y 500 micras, adecuado material para el análisis.



Figura 13. Material vegetal antes de ser preparado para realizar los ensayos histológicos y tras disgregar en bolsas de extracción.

3.5.2. Obtención y observación de las fotomicrografías

Las fotomicrografías se observaron y obtuvieron con un microscopio Optika B-350, con un sistema de captura de imagen por ordenador Motic Images Plus 2.0 ML. Las imágenes se digitalizaron sólo haciendo adaptaciones de contraste.

3.5.3. Tinción específica para peroxidasas

Las muestras vegetales se incubaron en las mismas condiciones que para el ensayo enzimático (tampón fosfato 100 mM pH 6,9, Guaiacol o ascorbato y H₂O₂) excepto que se empleó 5x la concentración de peróxido debido a la acusada reactividad de los componentes de la pared que actúan como reductores de este sustrato. Los ensayos para la guaiacol peroxidasa se observan directamente al presentar el producto de la reacción un marcado e insoluble color marrón.

Los ensayos para ascorbato peroxidasa requieren emplear un ensayo en “negativo” para poder visualizar en el visible la presencia de la enzima, para ello se emplea el siguiente protocolo basado en Mittler and Zilinskas (1993).⁽⁴⁰⁾

Los fragmentos de raíz se incuban durante 20 min en tampón fosfato 100 mM, pH 6,9, en presencia de 20 mM de H₂O₂ y 5 mM ascorbato sódico. Posteriormente se lavan las muestras en el mismo tampón sin los sustratos durante 2 min y se añaden 3 mM NBT y 25 mM TEMED disueltos en H₂O. Las zonas donde hay presencia de actividad ascorbato-peroxidasa aparecen como zonas blancas sobre un fondo púrpura generado por la reacción del NBT con el ascorbato residual que queda en las zonas donde no hay peroxidasa.

4. RESULTADOS

Hemos empleado a *A. thuscula* como planta modelo para llevar a cabo un protocolo de inducción empleando UVB (MM 3.1.). Obtuvimos cinco plantas irradiadas con luz UVB y tres que utilizamos como controles de luz blanca baja en radiación UV, por tanto no sometidas a estrés. Todas las plantas fueron analizadas para determinar la presencia de actividad peroxidasa de las clases I y III empleando los sustratos guaiacol y ascorbato como sustratos reductores y H₂O₂ como sustrato oxidante. Igualmente ensayamos estas mismas reacciones sobre fragmentos de raíces a fin de detectar la presencia e identificar diferencias apreciables en ambos tipos de plantas control e irradiadas.

4.1. Determinación de guaiacol peroxidasa y ascorbato peroxidasa

La actividad de las enzimas peroxidasa se determinaron sobre extractos crudos de las raíces de plantas control y tratadas (MM 3.2). Algunos resultados representativos se muestran en la **figura 14**. Las cinéticas responden a velocidades iniciales durante al menos 120 s para las condiciones ensayadas y muestran cinéticas lineales que se expresaron como Unidades Internacionales, UI (M⁻¹K⁻¹).

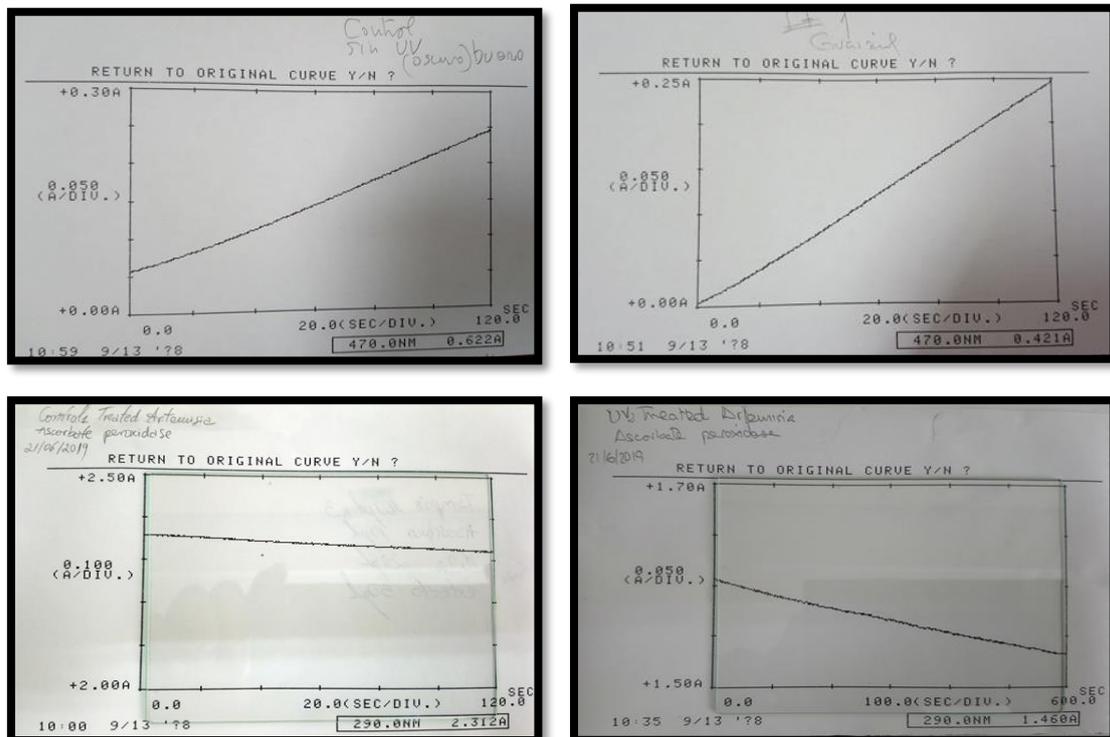


Figura 14. Cinéticas de reacción de los extractos de raíces de *A. thuscula*, tanto de los controles como de las irradiadas con luz UV, para la guaiacol peroxidasa y para la ascorbato peroxidasa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 15**.

Actividad peroxidasa en *Artemisia thuscula* en respuesta a UVB

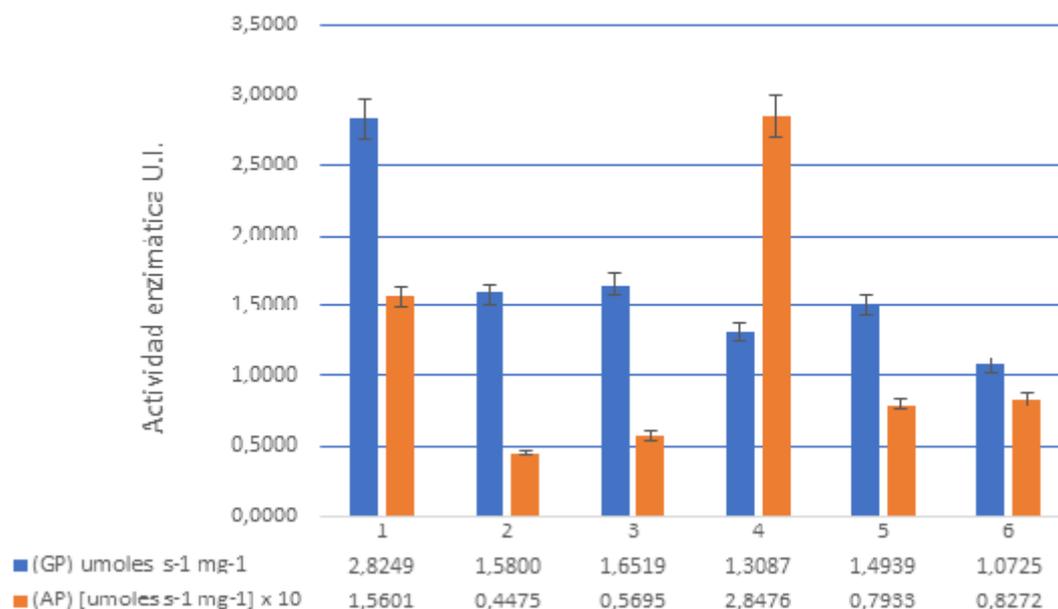


Figura 15. Actividad peroxidasa en extractos de raíces de *A. thuscula*. En azul se observa la actividad de la guaiacol peroxidasa en raíces de *A. thuscula* y en naranja la actividad de la ascorbato peroxidasa en raíces de *A. thuscula*. Se indica el porcentaje de desviación de los datos. Los datos entre muestras tratadas y controles para ambas enzimas son estadísticamente significativos ($P > 0,05$).

La guaiacol peroxidasa posee los mayores niveles enzimáticos. La exposición a la UVB genera a las 24 horas una disminución de su actividad en las raíces ($0,6 \pm 0,3$; excluyendo muestra 2). Lo contrario ocurre con la ascorbato peroxidasa que incrementa sus valores significativamente tras ser tratadas ($1,6 \pm 0,2$).

4.2. Ensayos histológicos de la presencia de peroxidasa en raíz

Las muestras de raíces de *A. thuscula* expuestas a los reactivos guaiacol y H_2O_2 reaccionan instantáneamente formando el característico precipitado marrón observado también en las reacciones espectrofotométricas. El análisis óptico de la densidad de color se puede llevar a cabo a partir de las fotografías obtenidas para cuantificar la enzima y la literatura explica protocolos para llevarlo a cabo, aunque no se realizó en este trabajo, donde nuestro objetivo era más identificar cambios cualitativos que cuantitativos. Estos cambios pueden observarse en las figuras 16 y 17:

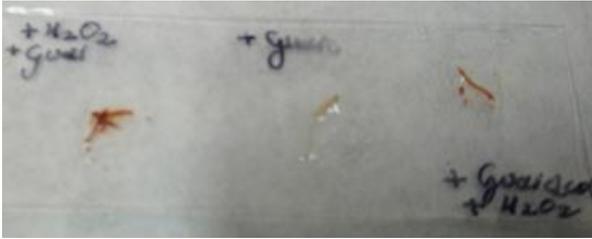


Figura 16. Fotomicrografía de cortes de raíz de *A. thuscula*, control e incubadas con guaiacol y H_2O_2 para revelar la presencia de la enzima guaiacol peroxidasa. En el centro de la imagen se observa un corte de raíz, a la que no se le ha añadido H_2O_2 , iniciador de la reacción, y por tanto no se observa la reacción típica de la peroxidasa.



Figura 17. Detalle a un aumento de 100x. mostrando la localización de la enzima en los haces conductores.



Figura 18. Fotomicrografía de corte de raíz de *A. thuscula* expuesta a UVB donde se observa la misma reacción que en los controles (aumento 40X) La presencia de la Guaiacol peroxidasa es manifiesta en los tejidos conductores (xilema y floema) y alrededor de los grandes vasos además de en la epidermis. La distribución es la misma que en las plantas control.

Las muestras de raíces de *A. thuscula* expuestas a los reactivos ascorbato y H_2O_2 requieren incubar previamente los cortes para agotar el ascorbato en las regiones donde se localiza la enzima para luego revelar en negativo mediante una reacción entre el NBT y el ascorbato residual en presencia de un reductor. Las figuras 19, 20, 21 muestran las imágenes obtenidas tanto en plantas control como tratadas con luz UVB:

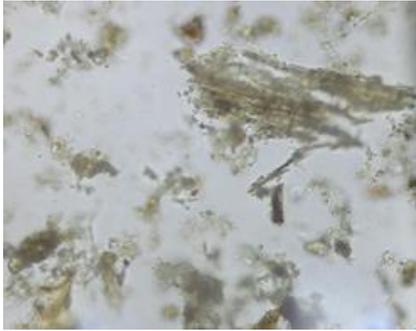
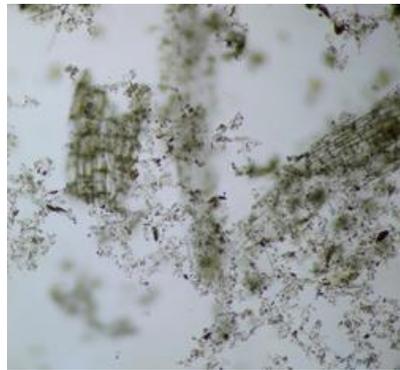


Figura 19. Fotomicrografía de cortes de raíz de *A. thuscula*, control a las que se les aplica el protocolo de revelado de ascorbato peroxidasa que incluyen ascorbato, H_2O_2 y NBT. (40x). La presencia de coloración dependiente de ascorbato es tenue durante los primeros 30 min de la reacción.



Figuras 20 y 21. Fotomicrografía de cortes de raíz de *A. thuscula*, control a las que se les aplica el protocolo de revelado de ascorbato peroxidasa que incluyen ascorbato H_2O_2 y NBT. Fotomicrografías de corte histológico de raíz (a) y de extracto (b.) de *A. thuscula* (40x) mostrando la coloración dependiente de la actividad ascorbato peroxidasa a los 5 min de la reacción.

5. DISCUSIÓN

Las diferentes especies de *Artemisia*, representan objetivos biotecnológicos y farmacológicos interesantes. *A. annua* es la especie modelo para el estudio del metabolismo secundario de artemisia, incluyendo la biotecnología de la producción de artemisinina. En esta especie están descritas la inducción de diferentes enzimas entre las que se encuentran las que hemos sometido a estudio: la guaiacol peroxidasa y la ascorbato peroxidasa, que responden al estrés generado por luz UV, formando parte de vías de acumulación o degradación del principal metabolito encontrado en raíces, la artemisinina.^{(35),(36), (37)} *A. thuscula* presenta ventajas locales por su abundancia y adaptación al medio. El estudio del metabolismo secundario de esta especie lo hemos abordado poniendo a punto los protocolos para las enzimas de peroxidasa y su respuesta al estrés por luz UVB.^{(41),(42),(43)} La actividad de peroxidasa de las Clase I y III en extractos de raíces de *A. thuscula*, ponen de manifiesto la presencia en esta especie de las enzimas que participan en la síntesis y la degradación de terpenoides en *A. annua*.^{(44),(45)} Por otro lado, en condiciones de inducción de estos metabolitos mediante luz del tipo UVB las raíces de esta planta reaccionan a tiempos cortos (24h) con una detectable disminución de la guaiacol peroxidasa (Clase I) lo que ha sido asociado con la degradación de metabolitos secundarios finales⁽¹⁵⁾ y con un incremento en la actividad de la Ascorbato peroxidasa (Clase III), lo que se correlaciona con un incremento en las peroxidasa de síntesis. Estos resultados nos sugieren un procedimiento que genere una mayor cantidad de compuestos con interés biotecnológico, especialmente terpenoides. Este trabajo indica lo interesante de someter a *A. thuscula* a mayores dosis de estimulación que no comprometieran la integridad de la planta y observar la evolución de estos parámetros a mayor plazo. Por otro lado, hemos desarrollado los protocolos para la identificación de estas actividades en cortes de tejido de raíz lo cual permitirá identificar cambios a nivel estructural asociados con la exposición a luz UVB como los descritos por otros autores⁽³⁸⁾ todo lo cual contribuye a un mejor conocimiento de los mecanismos de síntesis de terpenos en diferentes especies de *Artemisia*.

6. CONCLUSIONES

1. *A. thuscula* puede emplearse como modelo para explorar la producción de metabolitos secundarios con interés biotecnológico.
2. Los extractos de raíces de *A. thuscula* expresan las enzimas guaiacol peroxidasa (0,025 +/- 0,006 UI) y ascorbato peroxidasa (0,002 +/- 0,003 UI) determinadas espectrofotométricamente.
- 3.- La luz UVB en cortos periodos inducen cambios detectables en la raíz de *A. thuscula* en estas enzimas. La guaiacol peroxidasa disminuye (0,6 +/- 0,3). La Ascorbato peroxidasa se incrementa (1,6 +/- 0,2).

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Nisi, R. (2010). Coture cellulare di *Artemisia annua* L. per lo studio della via biosintetica e la produzione dell'antimalarico artemisinina (tesi dottorale). Università degli studi de Parma, Parma, 10-12.
- (2) O'Neill, P. M., Barton, V. E., & Ward, S. A. (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(3), 1705–1721.
- (3) Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" [Sede Web]. Gran Canaria [consultado el 24 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.jardincanario.org/>
- (4) Gil, M.L. Flora de Canarias [Internet]. Canarias: Manuel L. Gil González. [acualizado 27 de agosto 2018] [consultado el 26 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.floradecanarias.com/>
- (5) Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª ed. Zaragoza: Acribia.
- (6) Chang, Z. (2016). The discovery of Qinghaosu (artemisinin) as an effective anti-malaria drug: A unique China story. *Sci China Life Sci* 59, 81–88.
- (7) Ortiz, J.M. (2011). El Premio Lasker, la Medicina tradicional china y el descubrimiento de la Artemisina. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 77(4): 13-15.
- (8) World Health Organization. World Malaria Report 2018. Geneva: WHO; 2018. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf>
- (9) Baraldi, R., Isacchi, B., Predieri, S., Marconi, G., Vincieri, F.F., Bilia, A.R. (2007). Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 340-348.
- (10) Passardi, F., Theiler, G., Zamocky M., Cosio C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C. (2007). PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry* 68: 1605-1611.
- (11) Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase- A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235- 241.
- (12) Poulos, T. L., Freer, S. T., Alden, R. A., Edwards, S. L., Skogland, U., Takio, K., Eriksson, B., Xuong, N., Yonetani, T., and Kraut, J. (1980). The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 255, 575-580, 8199-8205.

- (13) Dalton, D. A., Post, C. J., & Langeberg, L. (1991). Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root nodules. *Plant physiology*, 96 (3): 812–818.
- (14) Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24:255–265.
- (15) Bryant, L., Flatley, B., Patole, C., Brown, G.D., Cramer, R. (2015). Proteomic analysis of *Artemisia annua* - towards elucidating the biosynthetic pathways of the antimalarial pro-drug artemisinin. *BMC Plant Biol* 15:175.
- (16) Qureshi, M.I., Abdin, M.Z., Javed, A. and Iqbal, M. (2013). Effect of long-term salinity on cellular antioxidants, compatible solute and fatty acid profile of Sweet Annie (*A. annua* L.). *Phytochemistry* 95: 215–223.
- (17) Soni, P., Abdin, M.Z. (2017). Water deficit-induced oxidative stress affects artemisinin content and expression of proline metabolic genes in *Artemisia annua* L. *FEBS Open Bio.*7(3):367-381.
- (18) Cakmak, I. and Horst, J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant* 83: 463–468.
- (19) Nguyen, K.T., Arsenault, P.R., Weathers, P.J. (2011). Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 47: 329-338.
- (20) Rai, R., Pandey, S., Rai, S.P. (2011). Arsenic-induced changes in morphological, physiological, and biochemical attributes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, an antimalarial plant. *Ecotoxicology*. 20(8):1900-13.
- (21) Frohnmeyer, H. & Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol* 133 (4): 1420-1428.
- (22) Björn, L.O., Widell, S. & Wang, T. (2002). Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Advances in Space Research* 30: 1557-1562.
- (23) Jordan, B. R. (2002). Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Funct Plant Biol* 29: 909-916.
- (24) Carrasco-Ríos, L. (2009). Effect of ultraviolet-b radiation in plants. *IDESIA (Chile)*. 27, (3): 59-76.
- (25) Day, T.A. & Neale, P.J. (2002). Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33: 371-396.

- (26) Pakkala, M., Laurila, A. & Merila, J. (2002). Effects of ultraviolet-B radiation on common frog *Rana temporaria* embryos from along a latitudinal gradient. *Oecologia*, 133 (4): 458-465.
- (27) Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K. & Hohn, B. (2000). Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature*, 406 (6791): 98-101.
- (28) Roleda, M.Y., van de Poll, W.H., Hanelt, D. & Wiencke, C. (2004). PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. *Mar. Ecol.- Prog. Ser.*, 281: 37-50.
- (29) Tevini, M. & Teramura, A.H. (1989). UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem Photobiol*, 50 (4): 479-487.
- (30) Frohnmeyer, H. & Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol*, 133 (4): 1420-1428.
- (31) Stratmann J. (2003). Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends in Plant Science*, 8: 526–533.
- (32) Maffei, M. & Scannerini, S. (2000). UV-B Effect on Photomorphogenesis and Essential Oil Composition in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 12:5, 523-529.
- (33) Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J. & Jenkins G.I. (2005). A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18225–18230.
- (34) Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.
- (35) Jain, K., Kataria, S. & Guruprasad, K.N. (2003). Changes in antioxidant defenses of cucumber cotyledons in response to UV-B and to the free radical generating compound AAPH. *Plant Sci.* 165: 551-557.
- (36) Kliebenstein, D.J., Lim, J.E., Landry, L.G. & Last, R.L. (2002). Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatic condensation 1. *Plant Physiol.*130: 234-243.
- (37) Kataria, S., Jain, K. & Guruprasad, K.N. (2007). UV-B induced changes in antioxidant enzymes and their isoforms in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Indian J. Biochem. Biophys.* 44: 31-37.

- (38) Kataria, S., Jajoo, A. & Guruprasad, K.N. (2014). Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137: 55-66.
- (39) Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- (40) Mittler, R. and Zilinskas, B. (1993). *Analytical biochemistry*, 212: 540-546.
- (41) Reddy, K.R., Singh, S.K., Koti, S., Kakani, V.G., Zhao, D., Gao, W. & Reddy, V.R. (2013). Quantifying of effects of corn growth and physiological responses to ultraviolet-B radiation for modeling. *Agro. J.*, 105: 1367-1377.
- (42) Meijkamp, B.B., Doodeman, G. & Rozema, J. (2001). The response of *Vicia faba* to enhanced UV-B radiation under low and near ambient PAR levels. *Plant Ecol.*, 154: 135-146.
- (43) Li, Y.A. & Yangun, Z. (2010). Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in endogenous hormones and photosynthetic characteristic of 10 wheat cultivars grown under field conditions. *South Afr. J. Bot.*, 76: 493-498.
- (44) Zhang Y-S, Liu B-Y, Li Z-Q, Ye H-C, Wang H, Li G-F, Han J-L (2004) Molecular cloning of a classical plant peroxidase from *Artemisia annua* and its effect on the biosynthesis of artemisinin *in vitro*. *Acta Bot Sin*, 46:1338–1346.
- (45) Nair P, Shasany AK, Khan F, Shukla AK (2018) Differentially expressed peroxidases from *Artemisia annua* and their responses to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol Report*, 36:295–309.