

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MECANISMOS DE TOLERANCIA AL ARSÉNICO EN *JUSTICIA PECTORALIS*  
VAR. *PECTORALIS* (*ACANTHACEAE*): CAPTACIÓN, REDUCCIÓN Y  
DESINTOXICACIÓN

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en  
Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología

JACQUELINE MARÍA CAMACHO LEANDRO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

## **Dedicatoria**

A mis papas: Guillermo y Sara

A mis hermanos: Christian, Christopher y Aaron

A mis sobrinos: Raúl y Enzo

¡Los amo!

“Lo esencial es invisible a los ojos”

Antoine de Saint-Exupéry

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por haberme ayudado durante estos años, por su guía a lo largo de este trabajo, el sacrificio ha sido grande pero siempre me dio la fuerza para continuar y lograrlo, por brindarme momentos llenos de aprendizaje, experiencias y sobre todo felicidad.

Mi principal agradecimiento es a mis papás (Sara y Guillermo) por su cariño, apoyo e infinita confianza en mí, además de sus buenos consejos. A mis hermanos por apoyarme y ayudarme de todas las formas posibles. Esto no hubiera sido posible sin todos ustedes.

Además, la realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y apoyo de muchas personas, a las cuales me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento.

A mi tutora Rosaura M. Romero Chacón por abrirme las puertas del CIPRONA y aceptar ser mi guía a pesar de ser una desconocida. Profe, muchísimas gracias por su ayuda, apoyo, dedicación y paciencia, pero ante todo, por la confianza depositada en mí durante estos años.

A todo el personal del CIPRONA que siempre estuvieron ahí para brindarme su ayuda, apoyo, consejos, gracias por los momentos de risas, los llevaré siempre en mi corazón.

A Gerardo Ávalos que me guió con los análisis estadísticos.

A Max Chavarría y Emamnuel Araya por su ayuda y abrirme las puertas del CENIBiot cuando lo necesité.

A todas las demás personas que de una u otra forma aportaron un granito de arena para la culminación de este proyecto.

Por último agradezco a mis amigos, que siempre estuvieron ahí para brindarme un consejo, apoyarme, animarme, de verdad que se convirtieron en esa familia que uno elige.

¡A todos muchas gracias!

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Maestría Académica en Biología.”




---

Dr. Jorge A. Lobo Segura  
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**



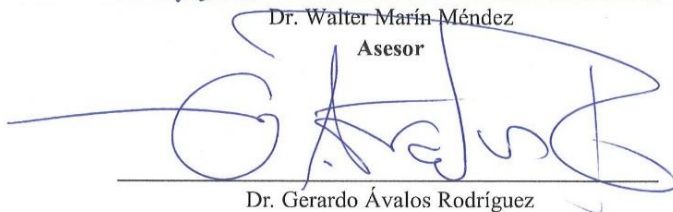
---

Dra. Rosaura M. Romero Chacón  
**Directora de Tesis**



---

Dr. Walter Marín Méndez  
**Asesor**



---

Dr. Gerardo Ávalos Rodríguez  
**Asesor**



---

Dr. Eduardo Chacón Madrigal  
**Representante del Director del  
Programa de Posgrado en Biología**



---

Jacqueline María Camacho Leandro  
**Candidata**

## Índice

Portada .....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Resumen .....	vi
Lista de cuadros .....	vii
Capítulo II.....	vii
Información Suplementaria.....	vii
Lista de figuras .....	viii
Capítulo II.....	viii
Información Suplementaria.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
CAPÍTULO I. Introducción General.....	1
Referencias .....	8
CAPÍTULO II: Mecanismo de tolerancia al arsénico en <i>Justicia pectoralis</i> var. <i>Pectoralis</i> ( <i>Acanthaceae</i> ).....	14
Resumen.....	15
Introducción .....	16
Materiales y métodos .....	18
Material biológico .....	18
Mecanismos de captación de arsénico .....	20
Determinación de la presencia y actividad de la arsenato reductasa.....	21
Péptidos involucrados en la desintoxicación de As .....	24
Análisis estadísticos .....	25
Resultados y discusión.....	26
Mecanismos de captación de arsénico .....	26
Presencia y actividad de la arsenato reductasa.....	33
Agente quelante involucrado en la desintoxicación de arsénico.....	38
Referencias.....	43
Capítulo III. Conclusiones.....	53

## Resumen

El arsénico es uno de los elementos más tóxicos liberados al ambiente, lo que lo convierte en una amenaza para los ecosistemas y la salud humana. *Justicia pectoralis* es una planta herbácea de rápido crecimiento y tolerante al arsénico, lo que la convierte en una buena candidata para ser usada en fitorremediación. Sin embargo, los mecanismos que le permiten disminuir los efectos fitotóxicos aún no han sido identificados. El objetivo de esta tesis fue determinar los mecanismos de captación y desintoxicación de arsénico. Los ensayos experimentales indican que en *J. pectoralis* la captación de arsenato se da por medio de transportadores de fosfato debido a la similitud química que existe entre ambos y que en la del arsenito están implicadas las acuagliceroporinas, canales por los cuales ingresa el glicerol, molécula que tiene similitud química con esta especie de arsénico. No se logró determinar la presencia del gen que codifica para la enzima arsenato reductasa ni tampoco actividad enzimática relacionada en extractos de la raíz. Sin embargo, la reducción del arsenato a arsenito se detectó en extractos de la raíz sin desalinizar en presencia o ausencia de glutatión. Por otro lado, la síntesis de glutatión, fitoquelatinas y la formación de complejos arsénico(III)-fitoquelatina se indujeron en la planta por la presencia de arsenato en el medio de cultivo como parte de los mecanismos de desintoxicación. Estos resultados evidencian los mecanismos implicados en la tolerancia a arsénico en *J. pectoralis* para ser utilizada en procesos de fitorremediación.

## Lista de cuadros

### Capítulo II

**Cuadro 1.** Análisis de la varianza de dos factores (ANOVA) de la concentración total de arsénico absorbido en las raíces de *Justicia pectoralis* expuestas a As(V) y P.....33

**Cuadro 2.** Análisis de la varianza de dos factores (ANOVA) de la concentración total de fósforo absorbido en las raíces de *Justicia pectoralis* expuestas a As(V) y P.....34

**Cuadro 3.** Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) del efecto del nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(III) durante una hora.....36

**Cuadro 4.** Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) del efecto del nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(III) durante dos horas .....37

**Cuadro 5.** Imprimadores utilizados para la amplificación del gen de la arsenato reductasa.....41

**Cuadro 6.** Cambio en absorbancia a 880 nm en extractos proteicos desalinizados o no de raíces de *J. pectoralis* en presencia o ausencia de glutatión.....43

**Cuadro 7.** Cambio en absorbancia a 880 nm en extractos proteicos de raíces de *J. pectoralis*, previamente concentrados con acetona .....43

**Cuadro 8.** Compuestos identificados mediante cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo en extractos de raíces de *Justicia pectoralis* expuestas a As(V).....46

### Información Suplementaria

**Cuadro S1.** Secuencias depositadas en el GenBank utilizadas para el alineamiento múltiple del gen codificante para la arsenato reductasa en plantas.....65

## Lista de figuras

### Capítulo II

**Figura 1.** Tilo (*Justicia pectoralis* var *Pectoralis*). Fotografía de la planta completa (A), de la flor (B), raíz (C) y un acercamiento de la raíz (D).

**Figura 2.** Efecto de diferentes concentraciones de arsenato y fosfato sobre la concentración total de As en las raíces de plantas de *J. pectoralis* cultivadas en medio hidropónico.....34

**Figura 3.** Efecto de diferentes concentraciones de arsenato y fosfato sobre la concentración total de P en las raíces de plantas de *J. pectoralis* cultivadas en medio hidropónico.....35

**Figura 4.** Efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(III) durante una hora.....37

**Figura 5.** Efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* después expuestas a As(III) durante dos horas.....38

**Figura 6.** Efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(V) durante una hora.....40

**Figura 7.** Reducción de arsenato por la vía enzimática. El arsenato (As(V)) se reduce mediante la acción de la arsenato reductasa y glutatión (GSH) para producir arsenito (As(III)) y disulfuro de glutatión (GSSG). La glutaredoxina (GRX) y la glutatión reductasa (GR) mantienen el ciclo redox del glutatión..... 44

**Figura 8.** Reducción de arsenato por la vía no enzimática. El arsenato (As(V)) se reduce mediante glutatión (GSH) para producir arsenito (As(III)) y disulfuro de glutatión (GSSG). .....45

**Figura 9.** Cromatograma y espectro representativo que muestra la separación UPLC y la detección ESI-MS/MS-Qtof del compuesto GSH en raíces de *J. pectoralis* expuestas a AsV durante cuatro días.....47

**Figura 10.** Cromatograma representativo que muestra la separación mediante UPL de la  $\text{PC}_2$  oxidada en raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(V) durante cuatro días.....48



**Figura 11.** Cromatograma y espectro representativo que muestra la separación mediante UPLC y la detección ESI-MS/MS-Qtof del complejo As(III)-PC<sub>3</sub> en raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(V) durante cuatro días.....49

Información Suplementaria

**Figura S1** Alineación de múltiples secuencias de genes que codifican para la enzima arsenato reductasa en 93 especies de plantas para el diseño de oligonucleótidos. Las secuencias están alineadas mediante un algoritmo de *alineación progresiva*, y los nucleótidos idénticos y similares se encuentran enmarcados. **A.** Oligonucleótido ARcenibiotF1. **B.** Oligonucleótido ARcenibiotR1. **C.** Oligonucleótido ARcenibiotF2. **D.** Oligonucleótido ARcenibiotR2...69

**Figura S2.** Amplificación del gen de la arsenato reductasa en *Arabidopsis thaliana* y *Justicia pectoralis* con los cebadores específicos para *Arabidopsis thaliana*. **Arriba**, carril 1: Marcador de peso molecular 1kb; carril 2-4: *Justicia pectoralis*; carril 5-7: *Arabidopsis thaliana*; carril 8-10: *Justicia pectoralis*; carril 11-13: *Arabidopsis thaliana*; carril 14-16: *Justicia pectoralis*; 17-19: *Arabidopsis thaliana*; carril 20-22: *Justicia pectoralis*; carril 23-25: *Arabidopsis thaliana*; carril 26: Marcador de peso molecular 100 bp. **Abajo**, carril 1: marcador de peso molecular 1kb, carril 2 carril 2-4: *Justicia pectoralis*; carril 5-7: *Arabidopsis thaliana*; carril 8-10: *Justicia pectoralis*; carril 11-13: *Arabidopsis thaliana*; carril 14-16: controles negativos; carril 17: Marcador de peso molecular 100 bp.....70

**Figura S3.** Amplificación del gen de la arsenato reductasa en *Justicia pectoralis* utilizando los imprimadores específicos para *Arabidopsis thaliana* así como los diseñados a partir del alineamiento de secuencias. MP: marcador peso molecular 100 bp; M1: imprimadores específicos para *A. thaliana*; M2: ARcenibiotF1 + ARcenibiotR1; M3: ARcenibiotF1 + ARcenibiotR2; M4: ARcenibiotF2 + ARcenibiotR1; M5: ARcenibiotF2 + ARcenibiotR2; carril 14-16: control negativo para cada una las combinaciones de imprimadores.....71

**Figura S4.** Amplificación del gen de la arsenato reductasa en *Justicia pectoralis* utilizando los imprimadores específicos para *Arabidopsis thaliana* así como los diseñados a partir del alineamiento de secuencias. Carril 1: marcador peso molecular 100 bp; M1: imprimadores específicos para *A. thaliana*; M2: ARcenibiotF1 + ARcenibiotR1; M3: ARcenibiotF1 + ARcenibiotR2; M4: ARcenibiotF2 + ARcenibiotR1; M5: ARcenibiotF2 + ARcenibiotR2; C-M1/M5: control negativo para cada una las combinaciones de imprimadores.....72

## Lista de abreviaturas

Ag	Plata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
ANOVA	Análisis de varianza, por sus siglas en inglés
AR	Arsenato reductasa
As	Arsénico
As(III)	Arsenito
As-PC	Arsénico-fitoquelatina
As(III)-PC <sub>3</sub>	Arsenito-fitoquelatina 3
As(V)	Arsenato
CIPRONA	Centro de Investigaciones en Productos Naturales
ESI-MS/MS-Qtof	Ionización por Electro Spray - Espectrometría de Masas - Cuadrupolo - Tiempo de Vuelo, por sus siglas en inglés
GSH	Glutación
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, por sus siglas en inglés
LC-MS	Cromatografía líquida - espectrometría de masas, por sus siglas en inglés
[M-H] <sup>+</sup>	Ion molecular cargado positivamente
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
P	Fósforo
PC <sub>2</sub>	Fitoquelatina 2
PC's	Fitoquelatinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés
UPLC	Cromatografía de ultra alta eficiencia, por sus siglas en inglés



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Jacqueline María Camacho Leandro, con cédula de identidad 1 1379 0578, en mi condición de autor del TFG titulado Mecanismos de tolerancia al arsénico en Justicia pectoralis var. Pectoralis (Acanthaceae): captación, reducción y desintoxicación.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## **CAPÍTULO I. Introducción General**

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales más importantes a nivel mundial debido a sus afectaciones ambientales, ecológicas, nutricionales y ecotoxicológicas (Ali et al., 2019; de Vries et al., 2007). Los metales pesados representan un grupo de metales y semimetales (metaloides) con masa atómica relativamente alta, una densidad cinco veces mayor que la del agua, y que desde una perspectiva biológica, pueden inducir toxicidad para plantas, animales y seres humanos (Li et al., 2019; Rascio & Navari-Izzo, 2011; Su et al., 2014). Estos elementos se encuentran naturalmente en la corteza terrestre, aunque también es posible encontrarlos por causas antropogénicas, y pueden depositarse en cuerpos de agua, suelos y aire.

La problemática de estos elementos radica en su liberación en exceso al ambiente, ya que a diferencia de las sustancias orgánicas, no son biodegradables, y se acumulan en los tejidos de los organismos vivos (bioacumulación), y sus concentraciones aumentan a medida que avanzan a través de los niveles tróficos (biomagnificación) (Ali et al., 2013; Singh et al., 2016; Verma & Sharma, 2017). En los últimos años, ha habido una creciente preocupación ecológica y de salud pública asociada a la contaminación por metales pesados. Esta situación ha ocasionado que la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) clasifique a elementos como el arsénico, plomo, mercurio y cadmio, entre los primeros diez lugares en orden de prioridad de la lista de sustancias que representan una amenaza potencial para la salud humana (<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>)

El arsénico (As) pertenece al grupo V de la tabla periódica, y sus propiedades se encuentran entre las de los metales y los no metales, por lo que es considerado un elemento semimetálico. El As es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre y su liberación en ambientes terrestres y acuáticos se debe a procesos naturales tales como la meteorización de rocas, la actividad biológica, y las emisiones y descargas volcánicas, pero también es liberado debido a actividades antropogénicas. Estas están relacionadas con la actividad minera, el uso de combustibles fósiles y agroquímicos, y sustancias que preservan la madera (Sandhi et al., 2018; Smedley & Kinniburgh, 2002).

Los estados de oxidación del metaloide en la naturaleza son variables (-3, 0, +3 y +5), así como su forma química dado que puede formar compuestos orgánicos como inorgánicos. Las formas orgánicas son metabolitos metilados tales como el ácido monometilarsónico

(MMA), el ácido dimetilarsínico (DMA) y el óxido de trimetilarsina y las formas inorgánicas son las más abundantes y suelen presentarse como oxianiones en disolución (arsenito trivalente (As(III)) o arsenato pentavalente (As(V)) (Bissen & Frimmel, 2003; Smedley & Kinniburgh, 2002). Además, las especies de As intercambian estados de oxidación influenciados por factores abióticos como el potencial de oxidación-reducción (redox) y el pH, y factores bióticos como la metilación mediada por microorganismos (Basu et al., 2014; Li et al., 2017).

La contaminación de los cuerpos de agua con arsénico es bien conocida a nivel mundial, y el agua potable representa la principal ruta de exposición para la mayoría de poblaciones, lo que la convierte en una grave amenaza para la salud pública (Basu et al., 2014; Chung et al., 2014). Este metaloide es altamente tóxico en cantidades mínimas para plantas y animales, incluyendo a la especie humana. La toxicidad de este elemento depende de su concentración, la forma química y el estado de oxidación en que se encuentre, pero en general las especies de As inorgánico son más tóxicas que las formas orgánicas (Mandal & Suzuki, 2002; Sharma & Sohn, 2009). La química del arsénico en los sistemas acuáticos es compleja y consiste en oxidación-reducción, precipitación, adsorción e intercambio de ligandos (Banerjee et al., 2008). Este se encuentra principalmente en sus formas inorgánicas en aguas naturales, por lo tanto la distribución de sus especies depende principalmente del potencial redox y las condiciones de pH del agua, así como de la presencia de la materia orgánica disuelta y de adsorbentes, sustancias húmicas y arcilla (Favas et al., 2012; Herath et al., 2016; Jain & Singh, 2012).

El metaloide puede ingresar al cuerpo humano mediante vía dérmica, inhalación e ingesta de sus compuestos, y al ser acumulativo, la exposición se ha asociado con una amplia gama de efectos agudos y crónicos sobre la salud humana. Quansah et al., (2015) mencionan que concentraciones de 50 µg/L de arsénico inorgánico se han asociado con numerosos padecimientos, entre los cuales se encuentran enfermedades cardiovasculares, respiratorias, neurodegenerativas, entre otras. Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo clasifica como carcinógeno humano del Grupo I ya que está asociado con cáncer de piel, vejiga y pulmón. Debido a estas afectaciones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que la concentración máxima de arsénico permitida en aguas para

consumo humano es de 10 µg/L (Garbinski et al., 2019; Kalita et al., 2018; Rosas-Castor et al., 2014).

El arsénico es considerado no esencial para plantas. Algunas investigaciones han indicado sus efectos nocivos ya que la raíces presentan la capacidad de absorberlo rápidamente del medio externo (Finnegan & Chen, 2012; Gusman et al., 2013). Dentro de las plantas, produce efectos adversos que afectan el crecimiento y la productividad, ya que ocasiona una gran cantidad de alteraciones morfológicas (p.ej., proliferación y nodulación de raíces, reducción en el número de hojas, senescencia), fisiológicas (p.ej., reducción en el crecimiento de tallos y raíces, degradación de la clorofila, afectación de la captación de nutrientes y de la conductancia estomática), bioquímicas y moleculares (p.ej., sobreproducción de especies reactivas de oxígeno -ROS-, que provocan daños a carbohidratos, proteínas y ADN) (Abbas et al., 2018; Chandrakar et al., 2018).

Debido a la alta toxicidad del As, es necesario desarrollar estrategias de remediación para reducir sus efectos. Varias tecnologías están disponibles para la eliminación de As en aguas, las más comunes se basan en procesos fisicoquímicos, aplicados simultáneamente o secuencialmente tales como oxidación/reducción, coagulación/filtración, precipitación química, adsorción, intercambio de iones, y tecnologías de membrana (Dadwal & Mishra, 2017; Lata & Samadder, 2016; Litter et al., 2010). La mayoría de estas metodologías son eficientes cuando el elemento está presente en el estado pentavalente, ya que si el As se encuentra en el estado trivalente, es necesario un paso de oxidación previo para lograr una exitosa remoción. Sin embargo, el uso de reactivos químicos no se recomienda en el tratamiento de agua potable ya que también pueden causar problemas secundarios que surgen principalmente por la presencia de subproductos indeseables (Jain & Singh, 2012).

A pesar de que los métodos convencionales han sido exitosos, los altos requerimientos químicos y energéticos no los hacen económicamente viables en zonas de bajos recursos (Shakoor et al., 2015). Ante este panorama una alternativa a estas técnicas es el uso de sistemas biológicos, entre ellos la fitorremediación, la cual hace uso de plantas para extraer, secuestrar, y/o desintoxicar diversos tipos de contaminantes en suelos, sedimentos y aguas (Mkandawire et al., 2004; Tangahu et al., 2011). Esta tecnología es prometedora,

rentable y respetuosa con el ambiente en comparación con otros métodos tradicionales de remediación (Vangronsveld et al., 2009; J. Y. Xu et al., 2016).

El arsénico no puede ser degradado pero se puede retirar, extraer o inmovilizar del medio en el que se encuentra. Diversas investigaciones han revelado que algunas especies de plantas han desarrollado mecanismos que no solo les permiten tolerar altos niveles de As, sino que presentan la capacidad de captarlos y acumularlos en sus tejidos sin manifestar efectos fitotóxicos (Callahan et al., 2006). Las plantas captan el As debido a que la rizodermis posee cargas negativas en sus células, lo que genera una atracción de los iones de arsénico con carga positiva, por lo que una vez que entran en contacto, su absorción es bastante rápida. El As compite de manera eficiente por los mismos transportadores que utilizan los elementos esenciales, por ejemplo el fósforo, principalmente si estos guardan similitudes químicas (Maestri et al., 2010).

Las plantas presentan diversos mecanismos para la captación de arsénico. La principal vía de absorción de As(V) en las raíces es mediante transportadores de fosfato ya que actúa como un análogo de fosfato. Una vez dentro de la células de la raíz, éste interfiere con el metabolismo dependiente del fosfato al reemplazarlo en las principales reacciones en las que está implicado este macronutriente (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002; Wang et al., 2002). El As(III) a su vez, se transporta a través de acuagliceroporinas (una subfamilia de la superfamilia acuaporina) y su toxicidad se debe a su capacidad de reaccionar con grupos tiol de enzimas y proteínas al alterar su estructura y función (Souri, Karimi, & Sandalio, 2017; Zhao et al., 2009).

Para combatir la toxicidad del As, las plantas adoptan una serie de estrategias. Una vez que es absorbido por las raíces y transportado a través del córtex extracelular (vía apoplástica) o intracelularmente (vía simplástica), la mayor parte del As(V) se reduce a As(III) gracias a la acción de la arsenato reductasa (Ellis et al., 2006). El mecanismo posterior de desintoxicación está relacionado con la síntesis de quelantes específicos tales como glutatión (GSH) y fitoquelatinas (PC's) (Tripathi et al., 2007; Verbruggen et al., 2009). Posteriormente se da la formación de complejos metal-ligando que son menos tóxicos y que posteriormente son desplazados a las vacuolas lo que permite que el daño no sea tan grave



(Rascio & Navari-Izzo, 2011). Estos mecanismos le permiten a las plantas almacenar, al menos por un tiempo el metaloide sin sufrir daños graves.

Si bien, existen investigaciones sobre fitorremediación utilizando plantas no acuáticas (Moogouei, 2017), su selección no es una tarea fácil. Se recomienda usar plantas nativas con alta eficiencia de eliminación de metales debido a menor competencia en condiciones ambientales locales y menor riesgo de convertirse en invasoras (Saxena et al., 2019). Además, la planta debe tener un denso sistema radicular de rápido crecimiento con la capacidad de absorber metales de la disolución durante un período prolongado (Chatterjee et al., 2013; Kumar et al., 2018). Otras características básicas para las especies son la alta tolerancia a metales, resistencia a plagas y otras enfermedades, no atraer animales (evitar avanzar en cadena trófica), ser fácil de cosechar, tener bajo costo de mantenimiento, y presentar una producción mínima de residuos secundarios (Ali et al., 2013; Sharma et al., 2014).

*Justicia pectoralis* (Acanthaceae), comúnmente llamada Tilo, presenta la capacidad de acumular arsénico en las raíces al estar en ambientes hidropónicos (Espinoza, 2018). Además, presentar limitaciones para movilizar el arsénico absorbido hasta los órganos aéreos. Estas condiciones la clasifican como una especie excluidora de metales. Sin embargo, el tilo posee características claves en especies acumuladoras de metales tales como una absorción eficiente de la raíz y tolerancia al metaloide dentro de las células vegetales (Ali et al., 2013). Esta respuesta fisiológica le permite a la planta desarrollarse en ambientes enriquecidos con este metaloide y por lo tanto podrían permitir su empleo en la remoción de este contaminante. Tras observar esta importante característica en esta especie vegetal es necesario conocer los mecanismos involucrados en la acumulación del metaloide y de esta forma contribuir para la optimización del uso de la especie en procesos de fitorremediación.

En este contexto, el objetivo de este trabajo se centró en comprender los mecanismos que controlan la absorción y desintoxicación del metaloide en las raíces de la planta. Ya que el conocimiento de los mecanismos implicados en el metabolismo del metal en la planta permite optimizar los sistemas de fitorremediación y que estos sean más eficientes.



**Figura 1.** Tilo (*Justicia pectoralis* var *Pectoralis*). Fotografía de la planta completa (A), de la flor (B), raíz (C) y un acercamiento de la raíz (D).

## Referencias

- Abbas, G., Murtaza, B., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N. K., Khan, M. I., Amjad, M., Hussain, M., & Natasha. (2018). Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(59), 1–45. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010059>
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Banerjee, K., Amy, G. L., Prevost, M., Nour, S., Jekel, M., Gallagher, P. M., & Blumenschein, C. D. (2008). Kinetic and thermodynamic aspects of adsorption of arsenic onto granular ferric hydroxide (GFH). *Water Research*, 42(13), 3371–3378. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.019>
- Basu, A., Saha, D., Saha, R., Ghosh, T., & Saha, B. (2014). A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. *Research on Chemical Intermediates*, 40(2), 447–485. <https://doi.org/10.1007/s11164-012-1000-4>
- Bissen, M., & Frimmel, F. (2003). Arsenic – a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31, 9–18.
- Callahan, D. L., Baker, A. J. M., Kolev, S. D., & Wedd, A. G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(1), 2–12. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0056-7>
- Chandrakar, V., Pandey, N., & Keshavkant, S. (2018). Plant responses to arsenic toxicity: morphology and physiology. In Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (eds) *Mechanisms of Arsenic Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 27–48). Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1292-2>
- Chatterjee, S., Mitra, A., Datta, S., & Veer, V. (2013). Phytoremediation protocols: an

- overview. In Gupta D. (eds) *Plant-Based Remediation Processes. Soil Biology* (vol 35, pp. 1–18). Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-35564-6>
- Chung, J. Y., Yu, S. Do, & Hong, Y. S. (2014). Environmental source of arsenic exposure. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 47(5), 253–257. <https://doi.org/10.3961/jpmp.14.036>
- Dadwal, A., & Mishra, V. (2017). Review on biosorption of arsenic from contaminated water. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 45(7), 1–20. <https://doi.org/10.1002/clen.201600364>
- de Vries, W., Lofts, S., Tipping, E., Meili, M., Groenenberg, J. E., & Schütze, G. (2007). Impact of soil properties on critical concentrations of cadmium, lead, copper, zinc, and mercury in soil and soil solution in view of ecotoxicological effects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 191, 47–89. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-69163-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-69163-3_3)
- Ellis, D. R., Gumaelius, L., Indriolo, E., Pickering, I. J., Banks, J. A., & Salt, D. E. (2006). A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiology*, 141(4), 1544–1554. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084079>
- Espinoza, J. (2018). *Análisis del uso potencial de la especie Justicia pectoralis L. para la remediación de fuentes naturales de agua contaminadas por arsénico(V)*. [Tesis de Maestría no publicada]. Universidad de Costa Rica.
- Favas, P. J. C., Pratas, J., & Prasad, M. N. V. (2012). Accumulation of arsenic by aquatic plants in large-scale field conditions: Opportunities for phytoremediation and bioindication. *Science of the Total Environment*, 433, 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.091>
- Finnegan, P. M., & Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, 3, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>
- Garbinski, L. D., Rosen, B. P., & Chen, J. (2019). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environment International*, 126(2019), 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>
- Gusman, G. S., Oliveira, J. A., Farnese, F. S., & Cambraia, J. (2013). Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiologiae*

*Plantarum*, 35(4), 1201–1209. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1159-8>

- Herath, I., Vithanage, M., Bundschuh, J., Maity, J. P., & Bhattacharya, P. (2016). Natural arsenic in global groundwaters: distribution and geochemical triggers for mobilization. *Current Pollution Reports*, 2(1), 68–89. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0028-2>
- Jain, C. K., & Singh, R. D. (2012). Technological options for the removal of arsenic with special reference to South East Asia. *Journal of Environmental Management*, 107, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.016>
- Kalita, J., Pradhan, A. K., Shandilya, Z. M., & Tanti, B. (2018). Arsenic stress responses and tolerance in rice: physiological, cellular and molecular approaches. *Rice Science*, 25(5), 235–249. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.06.007>
- Kumar, V., Shahi, S. K., & Singh, S. (2018). Bioremediation: an eco-sustainable approach for restoration of contaminated Sites. In J. Singh et al. (eds.) *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development* (pp. 115–136). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0>
- Lata, S., & Samadder, S. R. (2016). Removal of arsenic from water using nano adsorbents and challenges: A review. *Journal of Environmental Management*, 166, 387–406. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.039>
- Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., & Han, W. (2019). A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques. *Soil and Sediment Contamination*, 28(4), 380–394. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1592108>
- Li, J. S., Beiyuan, J., Tsang, D. C., Wang, L., Poon, C. S., Li, X. D., & Fendorf, S. (2017). Arsenic-containing soil from geogenic source in Hong Kong: leaching characteristics and stabilization/solidification. *Chemosphere*, 182, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.019>
- Litter, M. I., Morgada, M. E., & Bundschuh, J. (2010). Possible treatments for arsenic removal in Latin American waters for human consumption. *Environmental Pollution*, 158(5), 1105–1118. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.01.028>
- Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G., & Marmiroli, N. (2010). Metal tolerance and

- hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.10.011>
- Mandal, B., & Suzuki, K. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1), 201–2035. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)70013-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)70013-0)
- Meharg, Andrew A., & Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 154(1), 29–43. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00363.x>
- Mkandawire, M., Lyubun, Y. V., Kosterin, P. V., & Dudel, E. G. (2004). Toxicity of arsenic species to *Lemna gibba* L. and the influence of phosphate on arsenic bioavailability. *Environmental Toxicology*, 19(1), 26–34. <https://doi.org/10.1002/tox.10148>
- Moogouei, R. (2018). Use of terrestrial plants for phytoremediation of pollutants from solutions. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 42(4), 1753–1759. <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0356-0>
- Parmar, S., & Singh, V. (2015). Phytoremediation approaches for heavy metal pollution: a review. *Journal of Plant Science & Research*, 2(2), 1–8.
- Quansah, R., Armah, F. A., Essumang, D. K., Luginaah, I., Clarke, E., Marfoh, K., Cobbina, S. J., Nketiah-Amponsah, E., Namujju, P. B., Obiri, S., & Dzodzomenyo, M. (2015). Association of arsenic with adverse pregnancy outcomes/infant mortality: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 123(5), 412–422.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Rosas-Castor, J. M., Guzmán-Mar, J. L., Hernández-Ramírez, A., Garza-González, M. T., & Hinojosa-Reyes, L. (2014). Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): a review. *Science of the Total Environment*, 488–489(1), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.075>
- Sandhi, A., Landberg, T., & Greger, M. (2018). Phytofiltration of arsenic by aquatic moss (*Warnstorfia fluitans*). *Environmental Pollution*, 237, 1098–1105.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.038>

- Saxena, G., Purchase, D., Mulla, S. I., Saratale, G. D., & Bharagava, R. N. (2019). Phytoremediation of heavy metal-contaminated sites: eco-environmental concerns, field studies, sustainability issues, and future prospects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 249(February), 71–131. <https://doi.org/10.1007/398>
- Shakoor, M. B., Niazi, N. K., Bibi, I., Murtaza, G., Kunhikrishnan, A., Seshadri, B., Shahid, M., Ali, S., Bolan, N. S., Ok, Y. S., Abid, M., & Ali, F. (2015). Remediation of arsenic-contaminated water using agricultural wastes as biosorbents. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(5), 467–499. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1109910>
- Sharma, S., Singh, B., & Manchanda, V. K. (2014). Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 946–962. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3635-8>
- Sharma, V., & Sohn, M. (2009). Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*, 35(4), 743–759. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.005>
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB2016), 1–36. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517–568. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
- Souri, Z., Karimi, N., & Sandalio, L. M. (2017). Arsenic hyperaccumulation strategies: an overview. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(67), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00067>
- Su, C., Jiang, L., & Zhang, W. (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics*, 3(2), 24–38.

- Tangahu, B. V., Abdullah, S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2011/939161>
- Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., & Maathuis, F. J. M. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology*, 25(4), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003>
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van Der Lelie, D., & Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(7), 765–794. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0213-6>
- Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.001>
- Verma, N., & Sharma, R. (2017). Bioremediation of toxic heavy metals: a patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 11(3). <https://doi.org/10.2174/1872208311666170111111631>
- Wang, J., Zhao, F. J., Meharg, A. A., Raab, A., Feldmann, J., & McGrath, S. P. (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology*, 130(3), 1552–1561. <https://doi.org/10.1104/pp.008185>
- Xu, J. Y., Han, Y. H., Chen, Y., Zhu, L. J., Ma, L., & Q. (2016). Arsenic transformation and plant growth promotion characteristics of As-resistant endophytic bacteria from As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere*, 144(October 2015), 1233–1240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.102>
- Zhao, F. J., Meharg, A. A., & McGrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181, 777–794.



**CAPÍTULO II:** Mecanismo de tolerancia al arsénico en *Justicia pectoralis* var. *Pectoralis*  
(*Acanthaceae*)

**Resumen:** La contaminación ambiental por arsénico (As) se ha convertido en una preocupación a nivel mundial debido a que la concentración de este metaloide es cada vez mayor en suelos así como en aguas para el consumo humano. La planta de tilo, *Justicia pectoralis*, presenta la capacidad de acumular arsénico, pero hasta ahora no se han investigado los mecanismos implicados en su tolerancia. El objetivo principal de este estudio fue determinar los mecanismos involucrados en la absorción, reducción y desintoxicación de arsénico en el tilo. Primero evalué los mecanismos de captación de arsenato y arsenito mediante la interacción entre el arsenato (As(V)) y el fosfato (P) en la absorción de As(V) y P, y el efecto del inhibidor de acuaporina por  $\text{AgNO}_3$  en la captación de arsenito (As(III)) y As(V). Realicé un análisis molecular y enzimático para determinar la presencia de la arsenato reductasa en las raíces. Finalmente, mediante un análisis mediante UPLC-ESI-Q-ToF/MS identifiqué los compuestos involucrados en la fitoquelación de arsénico. Utilicé plantas de *J. pectoralis* en cultivo hidropónico para todos los experimentos. El suministro de fosfato produjo una disminución en la absorción de As(V), y a su vez el aumento en la concentración de As(V) disminuyó la concentración de P en las raíces. La presencia de  $\text{AgNO}_3$  provocó una disminución en la captación de As(III), contrario a lo que sucedió con la absorción de As(V) ya que esta no se vio afectada. No logré determinar la presencia y actividad de la arsenato reductasa en las raíces de tilo, sin embargo, detecté la reducción de As(V) a As(III) mediada por glutatión (GSH). La fitoquelatina 2 oxidada, así como el complejo formado por arsenito y la fitoquelatina 3 (PC<sub>2</sub> ox y As(III)-PC<sub>3</sub>, respectivamente), fueron detectados en las plantas expuestas al metaloide. Estos resultados evidencian que en *J. pectoralis* el arsenato es absorbido a través de los transportadores de fosfato, y el arsenito es absorbido mediante acuaporinas, y que una vez dentro de las células de la raíz, el As(V) es probablemente reducido a As(III) por la acción del GSH, y que esta especie de arsénico a su vez forma complejos con fitoquelatinas. Estos hallazgos evidencian los mecanismos por los cuales *Justicia pectoralis* es capaz de acumular y tolerar arsénico. La comprensión de estos mecanismos es vital para su empleo en procesos de fitorremediación en medios contaminados con el metaloide.

Palabras clave: arsénico, transportadores de fosfato, acuaporinas, arsenato reductasa, glutatión, fitoquelatinas, tilo

## Introducción

El arsénico (As) es un metaloide que es abundante en el ambiente y se considera tóxico para todas las formas de vida. La contaminación por este elemento es reconocida como un problema a nivel mundial desde el punto de vista ambiental y de salud humana (Biswas et al., 2020). El arsénico está presente en ambientes terrestres y acuáticos naturalmente, aunque la actividad antropogénica también lo genera. La meteorización, la actividad biológica y volcánica son fuentes naturales de As, mientras que el uso de combustibles fósiles, la extracción y fundición de metales, así como el uso de herbicidas que lo contienen también liberan As al medio (Mirza et al., 2014). Debido a su alta disponibilidad y toxicidad la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), lo clasifica como carcinógeno humano del grupo I, debido a las afectaciones a la salud que provoca. La población humana puede exponerse al arsénico de diferentes formas, siendo probablemente la más importante la ingesta de agua o alimentos contaminados (Biswas et al., 2020).

El arsénico existe en el ambiente en formas orgánicas e inorgánicas, pero en aguas naturales aparece casi exclusivamente en las formas inorgánicas como arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) y arsenito ( $\text{AsO}_3^{3-}$ ) (Gallegos-Garcia et al., 2012; Tangahu et al., 2011). Este metaloide es sensible a reacciones redox por lo que las dos especies son fácilmente interconvertibles (Basu et al., 2014). El arsenato existe principalmente como especie aniónica y predomina en condiciones aeróbicas, y el arsenito está presente como especie neutral y predomina en ambientes anaeróbicos (Wang et al., 2010, 2011).

Las plantas pueden absorber varias especies de arsénico utilizando diversos mecanismos. Sin embargo, la biodisponibilidad de éste depende de las características del suelo, tales como el pH, el contenido de agua, y la presencia de sustancias orgánicas. Además, la especiación del metaloide se puede considerar como otro factor que afecta significativamente su absorción (Souri et al., 2017). El arsenato, como análogo químico del fosfato, presenta propiedades similares, por que compite por los mismos transportadores de membrana (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002; Raab et al., 2007). Una vez dentro de las células de la raíz, el As(V) puede reemplazar al P y de esta manera alterar los procesos celulares esenciales de las plantas, por ejemplo, las reacciones de fosforilación, incluyendo

la síntesis de ATP, lo que genera problemas en la homeostasis energética, el metabolismo del carbono, y la síntesis de ADN (Ali et al., 2009; Duman et al., 2010; Garg & Singla, 2011).

El arsenito se absorbe principalmente a través de acuaporinas, que son proteínas integrales de membrana presentes en todas las plantas y que regulan la absorción del agua y el transporte de moléculas neutras como el glicerol y ácido salicílico (Wang et al., 2010, 2011). El As(III) reacciona con los grupos sulfhidrilo en los residuos de cisteína y el nitrógeno del imidazol en los residuos de histidina, alterando la estructura de las proteínas y las interacciones proteína-proteína, lo que conduce a la interferencia en la función general de las proteínas (Bienert et al., 2008; Isayenkov & Maathuis, 2008). Esta afectación a nivel proteico causa inhibición de actividades enzimáticas, afecta el metabolismo de ácidos grasos, la absorción de glucosa y la producción de glutatión (Ali et al., 2009).

Después de ser absorbido por las plantas, el As presenta una baja movilidad, con la excepción de las especies hiperacumuladoras que sí presentan buena translocación de raíces a las partes aéreas (Zhao et al., 2009). Las plantas tolerantes generalmente presentan la capacidad de bioestabilizar al metaloide mediante su inmovilización en las raíces (Peralta-Pérez & Volke-Sepúlveda, 2012). Luego, el primer paso para combatir la toxicidad corresponde a la reducción de As(V) a As(III), gracias a la acción de la arsenato reductasa (AR), una enzima con elevada capacidad de reducción del arsenato absorbido y que rápidamente lo convierte a arsenito dentro de las raíces (Ellis et al., 2006; Tripathi et al., 2007).

Un paso posterior a la reducción del arsénico, es la formación de complejos del As(III) con agentes quelantes de bajo peso molecular (Sharma, 2012; Xu et al., 2007). Uno de estos quelantes corresponde al tripéptido glutatión (GSH, Glu-Cys-Gly) el cual es sintetizado por la  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) y la GSH sintetasa (GS). Además, el GSH es el precursor de otro importante agente quelante, las fitoquelatinas (PC's), que son una familia de pequeños péptidos sintetizados enzimáticamente y con la estructura  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , con  $n$  que va de 2 a 11 (Morelli et al., 2005).

La evidencia sugiere que las PC desempeñan un papel constitutivo en la desintoxicación de As mediante la formación de complejos con As(III) en plantas no hiperacumuladoras (Liu et al., 2010; Zhang et al., 2012). Como solo el As(III) puede unirse

a las PC's y así activar la fitoquelatina sintasa, la reducción de As(V) a As(III) mediante la acción de la AR es un paso crítico en la tolerancia al arsénico. Una vez que se forman estos complejos en el interior del citosol, ellos son desplazados a las vacuolas en las raíces reduciendo de esta forma el efecto tóxico de los iones metálicos libres en las células (Rascio & Navari-Izzo, 2011).

Pocas especies de plantas son naturalmente tolerantes al As. Algunas especies tropicales y subtropicales pueden absorber y tolerar este metaloide (Aldrich et al., 2007). Una especie recientemente reconocida con capacidad para acumular arsénico es *Justicia pectoralis* (Acanthaceae) (Espinoza, 2018); esta capacidad se puede aprovechar para desarrollar tecnologías de fitorremediación que ayuden a la eliminación de este contaminante. El "tilo" como se le conoce comúnmente, es una planta herbácea de amplio uso tradicional y medicinal gracias a sus propiedades sedantes (Leal et al., 2017). Ella presenta algunas características que la convierten en una excelente candidata para su uso en la remediación de aguas contaminadas con As tales como su capacidad de crecer y desarrollarse en hidroponía, así como su fácil eliminación de un entorno acuático, la alta tasa de crecimiento y producción de biomasa, su adaptabilidad a una amplia gama de condiciones climáticas, su amplio sistema radicular, y su fácil cultivo (H.Ali et al., 2013). Sin embargo, a pesar de estas características y debido a que su capacidad de acumulación de As es un fenómeno recientemente descubierto, los mecanismos involucrados no se han descrito. El objetivo de esta investigación fue determinar los mecanismos responsables de la captación, reducción y desintoxicación de arsénico en *Justicia pectoralis*.

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

Los experimentos se llevaron a cabo en el invernadero del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica. La iluminación fue regulada por la presencia de una malla verde polisombra comercial (sarán 30% sombra).

#### *Propagación de plantas de tilo*

Los individuos de *J. pectoralis* se mantuvieron individualmente en macetas de plástico (diámetro superior 13 cm, alto 12.5 cm, diámetro inferior 9 cm), utilizando Súper Tierra (EverGreen®, Costa Rica) como medio para el establecimiento del banco de plantas. Las plantas se regaron diariamente, y una vez al mes se abonaron con disoluciones hidropónicas

(EverGreen®, Costa Rica), siguiendo las indicaciones del fabricante (5 ml y 2.5 ml de solución hidropónica mayor y menor, respectivamente) .

Los propágulos de tilo se obtuvieron mediante propagación vegetativa, usando estacas de *J. pectoralis* de 10 a 12 cm de longitud (tres - cuatro nudos), realizando el corte del tallo en bisel, con un ángulo de 45° justo por debajo del nudo (es necesario dejar un nudo en la base de la estaca ya que un nudo basal aumenta las posibilidades de enraizamiento). Esta actividad se llevó a cabo en horas de la mañana con el fin de evitar la deshidratación del material. Las estacas se colocaron individualmente en recipientes de vidrio (120 mL de capacidad) con un volumen de 100 mL de medio hidropónico (preparado a partir de disoluciones hidropónicas comerciales EverGreen®, Costa Rica), para promover el desarrollo de raíces adventicias en las plantas.

#### *Adaptación de plantas al medio hidropónico*

Las plantas se transfirieron a sistemas hidropónicos que consistían en recipientes de plástico (22 x 15 x 10 cm). La disposición de las plantas en el medio hidropónico se realizó mediante la técnica de raíz flotante para que ellas se aclimataran a medios de cultivo acuosos. El medio hidropónico se oxigenó manualmente, aproximadamente cada 48 horas mediante un sistema de aireación generado por una bomba de pecera convencional (SUN SUN) y se renovó mensualmente.

Seleccioné individuos de 12-16 semanas desde la propagación vegetativa, con tamaños y masas similares. Los sistemas hidropónicos de raíz flotante utilizados en los ensayos consistieron en recipientes de plástico (1.5 L de capacidad, cubiertos en su exterior por un plástico negro), conteniendo 1 L del medio de cultivo, dosificado con arsenato y plata en las respectivas concentraciones.

#### *Condiciones de crecimiento de plantas de Arabidopsis thaliana*

La especie vegetal *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (*Col-0*) se utilizó para los ensayos correspondientes a la identificación del gen encargado de la reducción de As. Se vertieron semillas de *A. thaliana* en tubos de microcentrífuga previamente esterilizados. Las semillas se esterilizaron mediante un tratamiento de 2 minutos en etanol al 70%, seguido de un lavado con hipoclorito sódico al 1% y por último, cinco lavados con agua destilada estéril; todos los pasos se llevaron a cabo con agitación constante. Finalmente se adicionó una alícuota de agua

destilada estéril autoclavada y se almacenaron las semillas en oscuridad durante 96 h a 4 °C. Pasado este tiempo las semillas se sembraron en frascos de vidrio con medio sólido Murashige & Skoog. Los recipientes se mantuvieron con un ciclo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, y las plantas se utilizaron para los análisis moleculares cuando alcanzaron el tamaño necesario para los análisis posteriores.

### **Mecanismos de captación de arsénico**

#### *Efecto del fosfato en la absorción de arsenato*

Se expusieron individuos de *J. pectoralis* (aclimatados a hidroponía) a diferentes concentraciones de arsenato (As(V)) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Las concentraciones de fosfato fueron 20, 40 y 60  $\mu\text{M}$  (suplido como  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y las concentraciones de arsenato fueron 0, 83, 170 y 250  $\mu\text{M}$  (suplido con  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 98.5%) para un total de 12 combinaciones (4 individuos por sistema hidropónico). Los sistemas hidropónicos se oxigenaron cada 24 horas con el equipo de aireación mencionado en la sección 1.2. La reducción del volumen por evapotranspiración en los sistemas hidropónicos se controló agregando agua desionizada. Para el análisis de absorción de As(V) y  $\text{PO}_4^{3-}$ , las plantas de cada arreglo se cosecharon luego de 18 días, se lavaron cuidadosamente con agua desionizada y se separaron en raíces y partes aéreas (tallos y hojas). Las muestras se almacenaron en un congelador (Polaris) (< - 15 °C) antes de ser liofilizadas.

#### *Efecto de la plata (Ag) en la absorción de arsenito*

Después de la adaptación en la disolución hidropónica, se expusieron individuos de *J. pectoralis* a diferentes concentraciones de plata y una concentración de arsénico (suplido como arsenito). Las plantas se trataron primero con Ag (suplido como  $\text{AgNO}_3$  a 0, 0.001, 0.01 y 0.1 mM) durante 2 horas, posteriormente se adicionó arsénico 0.1 mM (As(III), suplido como  $\text{Na}_2\text{AsO}_3$ ), esto con el fin de asegurar la inhibición previa de las acuaporinas en las raíces, para un total de 8 combinaciones (4 individuos por sistema hidropónico). Después de 1 hora de adicionado el As (tiempo requerido para minimizar la oxidación de As(III)), todas las plantas se extrajeron de los sistemas hidropónicos y separaron en raíces y parte aérea (tallos y hojas). Las raíces se lavaron primero con agua desionizada, posteriormente con un tampón de citrato (pH 5.7) para asegurar la desorción de As en la superficie de la raíz. Las muestras se almacenaron en un congelador (Polaris) (< - 15 °C)

antes de ser liofilizadas. Dado que la plata no mostró un efecto sobre la absorción de As(III) en la planta, el experimento se repitió y la exposición al arsénico se extendió de 1 a 2 horas.

#### *Digestión de los tejidos vegetales (raíces)*

Las raíces se liofilizaron (liofilizador Labconco®) durante 48 horas. Concluido este proceso, cada muestra se homogenizó y se pulverizó (molino Kintech®). Se tomaron submuestras (triplicados) de 0.1 g (balanza A&D) y se mezclaron con 7 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado (70 % m/m). La mezcla se calentó en baño maría a 80 – 85 °C con agitación constante (plantilla Corning) durante cuatro horas. Finalizado este tiempo, se adicionaron 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado (30 % m/m) y se continuó con el calentamiento y agitación hasta obtener una disolución transparente. Todas las muestras se trasvasaron a balones de 100.00 mL y se aforaron con agua desionizada. Posteriormente, las muestras se filtraron por membranas de acetato de celulosa de 0.45 µm (Minisart®) y se trasvasaron a botellas de Nalgene® y almacenaron a 4 °C hasta el día de su análisis.

#### *Cuantificación del arsénico y fósforo acumulado*

El análisis de As total y Pi en las raíces de *J. pectoralis* se realizó en el Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA) de la Universidad de Costa Rica (UCR). La cuantificación de arsénico total se realizó mediante la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS Agilent 7500 cx). Las concentraciones de P se determinaron utilizando el método de fósforo total (MAQA-1) contenido en el “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”.

### **Determinación de la presencia y actividad de la arsenato reductasa**

#### *Selección de oligonucleótidos para la amplificación del gen de la arsenato reductasa*

Se realizó una biblioteca de secuencias de genes codificantes para la enzima arsenato reductasa que fueron obtenidas del GenBank. Posteriormente se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias a través del programa CLC Sequence Viewer 8.0.0 (QIAGEN) (Figura S1). En el alineamiento resultante se identificaron regiones conservadas, y a partir de estas regiones se diseñaron los imprimadores tanto sentido como antisentido. Además, se probaron los cebadores reportados en el trabajo de Sánchez-Bermejo (2014) los cuales amplifican regiones del gen de la arsenato reductasa (*At2g21045*) a partir de la planta modelo *A. thaliana*.



### *Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen arsenato reductasa*

Para la extracción de ADN se tomó una muestra de material vegetal fresco tanto de *J. pectoralis* como de *A. thaliana*. Se utilizó el kit de extracción FastDNA<sup>®</sup> Spin Kit for Plant and Animals Tissues (MP Biomedicals, California) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se realizaron reacciones de PCR de 20  $\mu$ L para amplificar el gen de la arsenato reductasa utilizando una mezcla de reacción (PCR Master Mix, 10  $\mu$ L, 2X, Thermo Scientific), suero albúmina bovino (BSA, 0.5  $\mu$ L), dimetilsulfóxido (DMSO, 0.8  $\mu$ L), cebadores (0.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ M) y ADN (x  $\mu$ L) y agua (5.7  $\mu$ L). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems 9902, Norwalk, EE.UU). La primera PCR se llevó a cabo con ADN de *A. thaliana* y *J. pectoralis*, y se utilizaron los imprimadores reportados para *A. thaliana*, las condiciones utilizadas fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de los procesos de desnaturalización (95 °C, 30 s), hibridación (50 - 60 °C, 30 s) y extensión (72 °C, 60 s), con una extensión final de 72 °C durante 8 min. Agua desionizada estéril fue el control negativo.

Se realizaron una segunda y tercera PCR únicamente ADN de *J. pectoralis*. Los imprimadores utilizados fueron los reportados para *A. thaliana* así como los diseñados a partir del alineamiento. Las condiciones de la segunda PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de los procesos de desnaturalización (95 °C, 45 s), hibridación (40 - 45 - 50 °C, 60 s) y extensión (72 °C, 60 s), con una extensión final de 72 °C durante 10 min. Las condiciones tiempo y temperatura de la tercera PCR fueron: una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de los procesos de desnaturalización (95 °C, 45 s), hibridación (46 - 50 - 54 °C, 60 s) y extensión (72 °C, 60 s), con una extensión final de 72 °C durante 8 min.

La visualización de los resultados se realizó en geles de agarosa al 1%. Finalmente, los fragmentos amplificados fueron enviados a Macrogen Inc. (EEUU).

### *Determinación de la actividad arsenato reductasa*

Extracción del material vegetal y actividad arsenato reductasa

Los extractos utilizados en este experimento fueron obtenidos de plantas tratadas con 83  $\mu$ M de arsenato (soplido como NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) por 8 días, esto con el fin de inducir la actividad de la

enzima. La extracción se llevó a cabo moliendo 2.5-5 g de material vegetal fresco, usando un mortero y N<sub>2</sub> líquido (99.998 %, INFRA<sup>®</sup>) con 7.5-15 ml de un tampón (tris – maleato + EDTA 1mM + glicerol 10%) ajustado a pH 6,5. Después de la homogenización del material vegetal, los residuos se eliminaron pasando la pasta a través de papel filtro. El filtrado se centrifugó durante (30 minutos, 12 000 rpm, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante, todos los pasos se realizaron en hielo. Una parte del extracto resultante se pasó a través de una columna de desalinización PD-10 para eliminar la interferencia de compuestos de bajo peso molecular y la otra se reservó.

Para determinar la actividad de la enzima, 1 mL del extracto se incubó durante 60 minutos a 30 °C, en una mezcla que contenía el tampón tris – maleato, GSH (1mM) y arsenato (405 µM). Posteriormente la determinación de arsénico total así como las dos especies de As (As(V) y As(III)) se llevó a cabo empleando la metodología colorimétrica, la cual corresponde a una adaptación de (Hu et al., 2012; Lenoble et al., 2003).

#### *Metodología colorimétrica*

##### Disoluciones Patrón

Se preparó una disolución madre de 1000 mg/L As(V) disolviendo arsenato de sodio (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O) en agua desionizada. Además se preparó una disolución madre de 50 µmol/L de fosfatos disolviendo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en agua desionizada.

##### Preparación de Reactivos

El agente oxidante empleado fue KMnO<sub>4</sub> 0.3 mmol/L, y el agente reductor la tiourea 10%, la cual se preparó diariamente ya que solo es estable durante 6 horas a temperaturas inferiores a 30°C. Se prepararon dos disoluciones llamadas “reactivo de color A” y “reactivo de color B”. El reactivo de color A estuvo conformado por molibdato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>\*4H<sub>2</sub>O) 130 g/L, tartrato de antimonio y potasio K(SbO)C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>\*0.5H<sub>2</sub>O) 20 g/L y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 9 mol/L, el reactivo de color B correspondió a ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) al 10.8%. Debido a problemas de estabilidad en la mezcla, el ácido ascórbico se agregó a la alícuota tratada en primer lugar, y luego se añadió la mezcla el “reactivo de color A”. El reactivo de color A es estable por 2 meses si se mantiene a una temperatura de 4 °C y se evita la exposición a la luz. El reactivo de color B y los reactivos oxidante y reductor deben prepararse el día de la determinación.

### Curva de calibración

Las disoluciones para la curva se prepararon con agua desionizada y concentraciones conocidas de arsénico, y con fosfato para eliminar cierta dependencia que existe entre el P y el As, lo cual mejora la velocidad de desarrollo del color y la obtención de mediciones más precisas (Dhar et al., 2004). El método de azul de molibdeno se utilizó para la generación de color y se calculó la absorbancia correspondiente al arsénico total. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y con corrección con la utilización de un blanco conteniendo los reactivos. Una regresión lineal se calculó para obtener la pendiente y la ordenada al origen, y un modelo representativo de los datos.

### Análisis de la muestra

Para el análisis de la muestra, se tomaron tres alícuotas de 167  $\mu\text{L}$  que se agregaron a un balón aforado de 25 mL, el primer balón se aforó con agua destilada (muestra sin tratar), y en el segundo y tercer balón se agregaron 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 mol/L. Posteriormente se añadieron 2 ml de agente oxidante (muestra oxidada) y 2 ml de agente reductor (muestra reducida) respectivamente; se agitaron y se dejaron reaccionar durante 20 minutos. Posteriormente una alícuota de cada muestra tratada se agregó a un respectivo balón aforado de 10 mL, adicionalmente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de P,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 mol/L (la concentración final debe mantenerse en 0.216 mol/L), 200  $\mu\text{L}$  del “reactivo de color B”, 400  $\mu\text{L}$  del “reactivo de color A” y 20  $\mu\text{L}$  de tartrato de antimonio y potasio. Después de añadir cada reactivo la muestra se agitó, se dejó reaccionar durante 5 minutos y se midió la absorbancia. Todos los análisis se realizan por triplicado. Las concentraciones de las diferentes especies de arsénico en la muestra se calcularon de la siguiente forma:

$$\text{Arsénico total} = \text{As}_{\text{oxidado}} - \text{As}_{\text{reducido}}$$

$$\text{As(III)} = \text{As}_{\text{oxidado}} - \text{As}_{\text{sin tratar}}$$

$$\text{As(V)} = \text{As}_{\text{sin tratar}} - \text{As}_{\text{reducido}}$$

### **Péptidos involucrados en la desintoxicación de As**

#### *Extracción del material vegetal*

La determinación de fitoquelatinas, glutatión y péptidos unidos a arsénico se realizó mediante cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-ToF/MS). Después de 4 días de exposición a arsénico las plantas fueron

cosechadas, se separaron en raíces y parte aérea, y las raíces se lavaron con una disolución de fosfato libre de As (100 mM). Las raíces se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido seguido de molienda con un mortero. La muestra resultante se mezcló con ácido fórmico al 1% (relación sólido: líquido ~ 1: 3) durante 90 minutos a 4 °C y los restos celulares se sedimentaron posteriormente mediante centrifugación a 12.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810R). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de membrana de nailon (tamaño de poro 0.45 mm) y se almacenó en frío (4 °C) durante no más de 6 horas hasta que se realizaron las respectivas mediciones.

*Medición de muestras en cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-ToF/MS)*

Los perfiles cromatográficos se obtuvieron mediante un sistema ACQUITY Ultra Performance LC™ equipado con un muestreador automático y un detector de matriz de fotodiodos unidos a un sistema Waters® SYNAPT ESI-QTOF (Waters, Milford, EE. UU.). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna Waters® ACQUITY™ BEH C18, 50 x 2.1 mm, 1.7 µm, la temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C, volumen de inyección, 5.0 µl, caudal, 100 µl/min. Los extractos de raíces se eluyeron utilizando agua con ácido fórmico (Optima, Fisher Scientific, USA) al 0.1% en el canal A y en el canal B acetonitrilo (Optima, Fisher Scientific, USA) al 0.1 % de ácido fórmico (Optima, Fisher Scientific, USA). El sistema se estabilizó y se utilizó un gradiente de cuatro pasos que consistía en 0 % B en 0 minutos, 20 % B durante los siguientes 20 minutos, 0 % durante 21 minutos seguido de 0 % de B en los siguientes 25 minutos.

Los parámetros del espectrómetro de masas se establecieron de la siguiente manera: el flujo de gas de desolvatación (N<sub>2</sub>) se estableció en 650 L / h, y una temperatura de desolvatación de 350 °C, el flujo de gas de cono (N<sub>2</sub>) se estableció en 40 L / h y la temperatura de la fuente se estableció en 150 °C. El voltaje capilar y el voltaje del cono de muestreo se establecieron en 3 kV y 35 V respectivamente. El voltaje del cono de extracción se estableció 3.5 V. Se utilizó el software MassLynx (versión 4.1, Waters) para la adquisición y el procesamiento de datos.

*Análisis estadísticos*

Para determinar los efectos del fosfato en la captación de arsenato se realizó un ANOVA de dos vías. El efecto de la plata en la captación de arsenito se verificó posterior a un análisis de

varianza (ANOVA) de 1 vía. Los resultados se expresaron como media ponderada y para cada valor se calculó la desviación estándar. Se revisaron los supuestos de los análisis paramétricos antes de proceder con las diferentes ANOVAs (i.e., igualdad de varianzas, ajuste a la normalidad, e independencia. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando R básico.

## Resultados y discusión

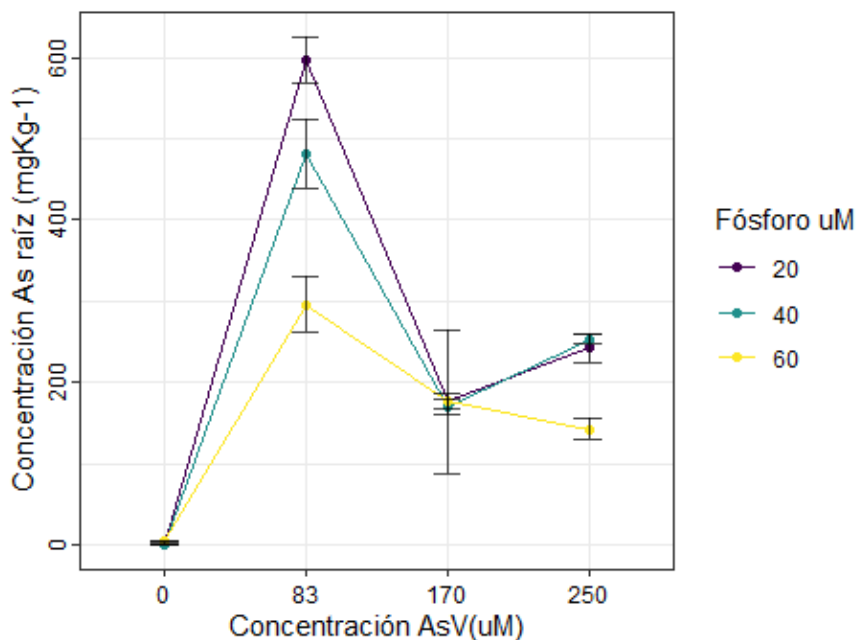
### Mecanismos de captación de arsénico

#### *Efecto del fosfato en la absorción de arsenato*

Diversos estudios indican que las tasas de captación de arsénico en plantas tolerantes y no tolerantes disminuyen considerablemente por la presencia de fosfato en el medio de cultivo, ya que éste puede interactuar con el arsenato e influir en su absorción. Los resultados demuestran que el fosfato es un excelente inhibidor de la captación de As(V), ya que el 0. Además, se determinó que la concentración de As en las raíces se ve afectada significativamente por la exposición a As(V) y  $\text{PO}_4^{3-}$  y que la interacción entre ambos iones también tuvo un efecto sobre la concentración de As absorbida (Cuadro 1). Por otro lado, en el tratamiento de 83  $\mu\text{M}$  de As(V), se observa que la absorción del metaloide se redujo a poco menos de la mitad ( $596 \pm 28$  frente a  $295 \pm 34$  cuando el fosfato añadido aumentó de 20 a 60  $\mu\text{M}$ ). Además con el suministro de 60  $\mu\text{M}$  de P la absorción de arsénico siempre fue menor, esto sin importar la concentración de As(V) añadida (figura 1).

**Cuadro 1.** Análisis de varianza de dos factores (ANOVA) de la concentración total de arsénico absorbido en las raíces de *Justicia pectoralis* expuestas a As(V) y P

<b>Fuente de la variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Arsénico	3	7370.50	<b>2.14E-16</b>
Fósforo	2	14.04	<b>9.16E-05</b>
Arsénico*Fosforo	6	137.77	<b>2E-16</b>

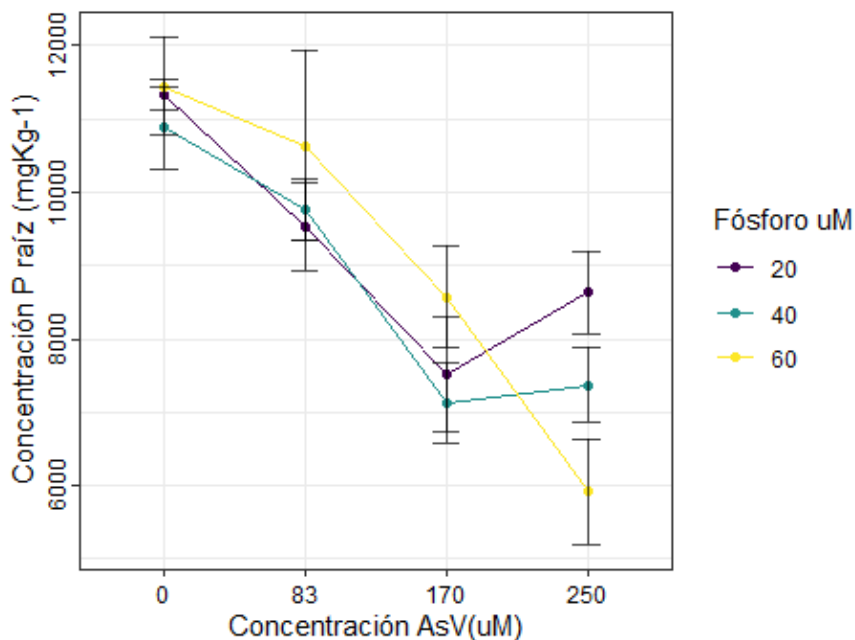


**Figura 2.** Efecto de diferentes concentraciones de arsenato y fosfato sobre la concentración total de As en las raíces de plantas de *J. pectoralis* cultivadas en medio hidropónico. Los valores representan promedios ( $\pm 1$  D.E.) de 3 réplicas por tratamiento.

Con respecto a la acumulación de fósforo total, en ausencia de As(V) las concentraciones de P fueron similares para todos los tratamientos en los que P fue añadido (20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  y 60  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, al agregar arsénico al medio nutritivo se observó un descenso en las concentraciones de P. Esto tuvo lugar especialmente en el tratamiento de 60  $\mu\text{M}$  de fosfato, en el que la concentración inicial de P absorbido fue de  $11334 \pm 200$ , pero al añadir la máxima concentración de As(V) (250  $\mu\text{M}$ ) la absorción fue de  $5917 \pm 716$  (Figura 2). La presencia de As(V) en el medio de cultivo, así como la interacción entre As y P, tuvo un efecto significativo en las concentraciones de P acumulado, lo que ocasionó una clara reducción en las concentraciones de este macronutriente en las raíces del tilo (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Análisis de la varianza de dos factores (ANOVA) de la concentración total de fósforo absorbido en las raíces de *Justicia pectoralis* expuestas a As(V) y P

Fuente de la variación	df	F	P
Arsénico	3	67.978	<b>7.11E-12</b>
Fósforo	2	1.591	0.22
Arsénico*Fosforo	6	5.660	<b>8.85E-4</b>



**Figura 3.** Efecto de diferentes concentraciones de arsenato y fosfato sobre la concentración total de P en las raíces de plantas de *J. pectoralis* cultivadas en medio hidropónico. Los valores representan promedios ( $\pm 1$  D.E.) de 3 réplicas por tratamiento.

Los resultados evidencian una competencia entre los iones de fosfato y arsenato por los transportadores en la superficie de la raíz. La captación de micronutrientes y sustancias no esenciales a través de las raíces de las plantas está regulada por los mismos procesos y por lo tanto se puede presentar competencia entre los iones, principalmente si presentan formas químicas similares. Esto implica que ellos pueden sustituirse entre sí en reacciones químicas (Liu et al., 2004; Meharg & Macnair, 1992; Strawn, 2018; Wang et al., 2002).

Esta competencia explica la reducción en la absorción de P cuando el As(V) está disponible para las plantas. Sin embargo, los aumentos en la absorción de fosfato cuando el arsenato está presente en el medio nutritivo, muestran que los sistemas de captación presentan una mayor afinidad por los fosfatos. A pesar de lo anterior, se aprecia una leve inhibición del arsenato sobre la absorción de fosfato en la planta, lo cual ha sido reportado previamente (Esteban et al., 2003; Mkandawire et al., 2004). Esta afinidad por el fosfato y la absorción restringida de As podrían representar dos mecanismos de las plantas para superar los efectos tóxicos del As, ya que la tolerancia al metaloide se encuentra estrechamente ligada a la nutrición con fosfato (Campos et al., 2014).

La competencia entre  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  por los sitios de absorción en los sistemas radicales de las plantas es un fenómeno reportado en gran variedad de especies (Abbas et al., 2018). De manera similar a los resultados obtenidos para *J. pectoralis*, varios estudios también han mostrado que el As en las plantas disminuye con el aumento de P en la disolución nutritiva en cultivos hidropónicos. Por ejemplo, Wang et al. (2002) investigaron la interacción de As y P en la absorción de As en el helecho hiperacumulador *Pteris vittata*. Ellos encontraron que la presencia de fosfato en la disolución de nutrientes produjo una disminución en la captación del metaloide y también identificaron una disminución en la concentración de P cuando se aumentaron las concentraciones de As(V). Otro resultado similar se obtuvo en *Isatis cappadocica*, en el que la exposición a niveles bajos de fosfato provocó una mayor acumulación de arsénico. Sin embargo, en las concentraciones más altas de As(V) (800 y 1200  $\mu\text{M}$ ), la adición de fosfato (1600  $\mu\text{M}$ ) disminuyó las concentraciones de As en un 61–82% y 53–77% respectivamente (Souri et al., 2017). Por otro lado Shi et al (2018) concluyeron que el fosfato tiene un efecto significativo en la acumulación de As en plantas de trigo ya que el aumento de este macronutriente en la disolución disminuyó la concentración de As tanto en las raíces como los brotes, observando un efecto mayor para las raíces que los brotes (una disminución del 80% en las raíces y del 48% en los brotes).

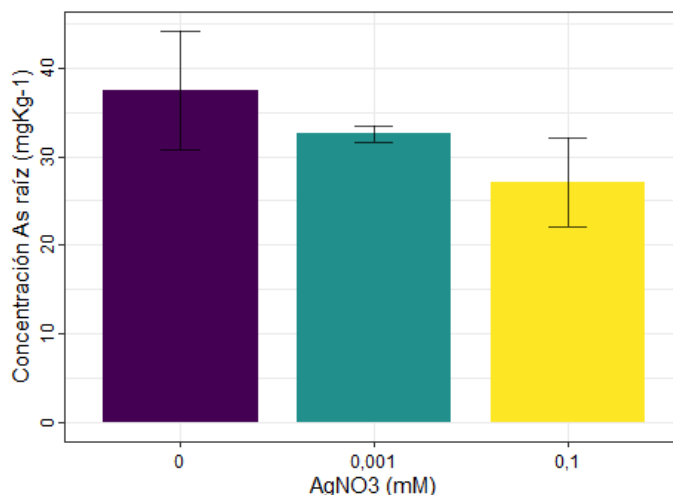
#### *Efecto de la plata en la absorción de arsenito y arsenato*

En este ensayo se analizó el efecto de la plata en la absorción de arsénico en plantas expuestas a As(III) y As(V). La plata provocó una reducción en la captación de arsénico (Figura 3). Sin embargo, no hubieron diferencias significativas entre el control y los diferentes tratamientos con plata que se llevaron a cabo durante una hora (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) sobre el efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(III) durante una hora.

<b>Fuente de la variación</b>	<b><i>df</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>P</i></b>
$\text{AgNO}_3$	2	3.465	0.0999



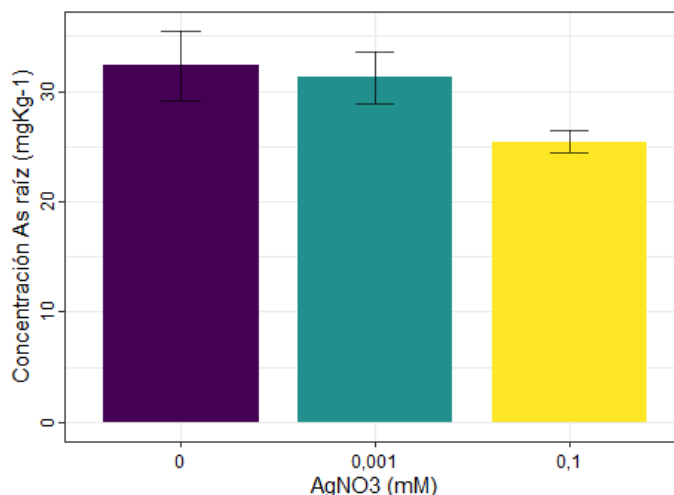


**Figura 4.** Efecto de diferentes concentraciones de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a  $\text{As(III)}$  durante una hora. Los valores representan promedios ( $\pm 1$  D.E.) de 3 réplicas por tratamiento.

Con el fin de comprobar la inhibición de la absorción de arsenito provocada por la exposición a la plata, se aumentó el tiempo de exposición al metaloide por dos horas: en este caso el efecto fue significativo. Observé un efecto mayor en la concentración de 0.1 mM (Figura 4). La concentración de arsénico en las raíces disminuyó de  $32 \pm 3$  a  $25 \pm 1$   $\text{mg kg}^{-1}$  con respecto al control, lo que demuestra que el incremento de las concentraciones de plata en la disolución de nutrientes disminuye la captación de arsenito. Por lo tanto, los datos experimentales obtenidos comprueban que la afluencia de arsenito a las raíces de *J. pectoralis* es inhibida por la plata, concordando así con los resultados obtenidos por Mathews et al. (2011) y Nagarajan & Ebbs (2007) en el helecho *Pteris vittata*, donde se menciona que los canales de acuaporina son los responsables de la entrada de  $\text{As(III)}$ .

**Cuadro 4.** Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) del efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a  $\text{As(III)}$  durante dos horas

Fuente de la variación	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
$\text{AgNO}_3$	2	7.587	<b>0.0228</b>



**Figura 5.** Efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(III) durante dos horas. Los valores representan promedios ( $\pm 1$  D.E.) de 3 réplicas por tratamiento.

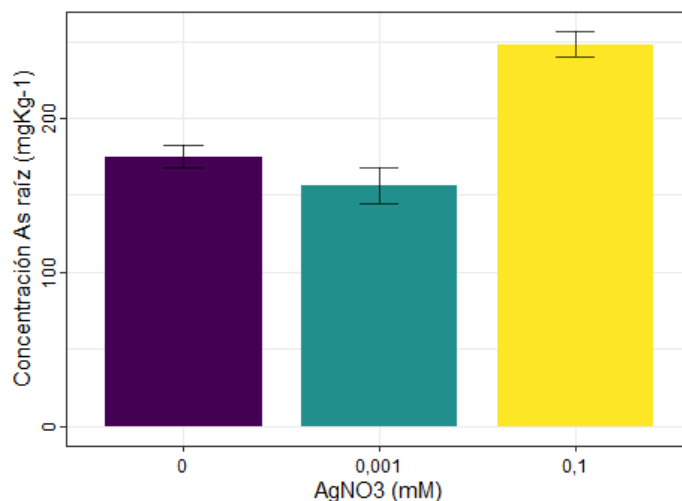
Las acuaporinas y las acuagliceroporinas son las responsables del transporte de agua y glicerol, además de urea, amoníaco, peróxido de hidrogeno, metaloides entre otros (Madeira et al., 2016; Mukhopadhyay et al., 2014), y en los últimos años se ha demostrado que su función se puede ver afectada por diferentes inhibidores que reducen la absorción de agua y pequeños solutos neutros hacia las raíces. La plata es el inhibidor de acuaporinas más potente que se ha descrito en la literatura y su mecanismo de inhibición se debe probablemente a su capacidad de interactuar con los grupos sulfhidrilo de proteínas. Específicamente, este ión interactúa con la cisteína cerca del motivo conservado de asparagina-prolina-alanina (NPA), lo que genera un bloqueo o cambios conformacionales, que afectan su actividad de transporte (Deng et al., 2019; Niemietz & Tyerman, 2002).

El subgrupo de las proteínas intrínsecas similares a nodulina26 (NIPs) que pertenecen al grupo de las Proteínas Intrínsecas Mayores o acuaporinas (MIP) son responsables de la captación, transporte y extrusión de metaloides no cargados incluido el arsenito (Pommerrenig et al., 2015; Sabir et al., 2020). El transporte de arsenito a través de las NIP se debe la diversa selectividad de sustrato que viene dada por su estructura. Los dos motivos NPA altamente conservados son los responsables del transporte de agua. Por otro lado, la constricción arginina aromática (ar / R) formada en el extremo celular del poro determina la

hidrofobicidad / hidrofiliidad y tamaño de poro, lo que finalmente determina el tamaño y naturaleza de los sustratos (Sabir et al., 2020).

El arsenito en disolución acuosa a pH neutro se encuentra disponible como  $\text{As}(\text{OH})_3$ , lo que demuestra que existe una similitud estructural con el glicerol. Por ello, se ha propuesto que el movimiento de  $\text{As}(\text{OH})_3$  hacia las células se da por medio de las acuagliceroporinas, es decir, el mismo canal que transporta glicerol (Garbinski et al., 2019; Porquet & Filella, 2007). El papel de las acuagliceroporinas tanto en el transporte de glicerol como arsenito se ha confirmado experimentalmente. Meharg & Jardine (2003) analizaron la competencia en la absorción entre el arsenito y el glicerol en las raíces de arroz, y los resultados demostraron que la absorción de arsenito fue inhibida por el glicerol. Esto confirmó que tanto el glicerol como el arsenito son absorbidos por el mismo sistema. Lindsay & Maathuis (2016) también demostraron que la acuagliceroporina NIP7;1 de *Arabidopsis thaliana* está implicada en la absorción y tolerancia a las especies de arsénico trivalente. Además, se ha demostrado que los miembros de la subfamilia NIP (homólogas a la nodulina 26 de soja) de plantas son equivalentes en estructura y función a las acuagliceroporinas de otros organismos y estas median el transporte de  $\text{As}(\text{III})$  (Sabir et al., 2020)

Con respecto al efecto de la plata en la absorción de  $\text{AsV}$  se determinó que a diferencia del efecto de la plata en la absorción de arsenito, el impacto de este inhibidor en la absorción de arsenato no produjo grandes efectos, independientemente de las concentraciones de plata a las que fueron expuestas las plantas. En este caso, las plantas expuestas a  $\text{As}(\text{V})$  acumularon hasta 10 veces más arsénico en comparación con las plantas expuestas a  $\text{As}(\text{III})$  (Figura 5), por lo tanto se confirma que el arsenato y el arsenito son captados por diferentes sistemas en las raíces.



**Figura 6.** Efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la concentración total de arsénico en las raíces de *J. pectoralis* expuestas a  $\text{As(V)}$  durante una hora. Los valores representan promedios ( $\pm 1$  D.E.) de 3 réplicas por tratamiento.

Si bien las acuaporinas no afectaron la captación de arsenato, ellas juegan un rol importante en la tolerancia al metaloide. Levaduras que expresaban NIP de diferentes especies vegetales, mostraron mejora en su crecimiento en un medio que contenía  $\text{As(V)}$ , lo que sugiere que la rápida reducción a  $\text{As(III)}$  hace que estas acuagliceroporinas medien la salida de esta especie de arsénico, confirmando que estas proteínas son canales bidireccionales (Bienert et al., 2008).

### **Presencia y actividad de la arsenato reductasa**

#### *Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen codificante para la enzima arsenato reductasa*

Se obtuvieron un total de 93 secuencias (Cuadro S1) del gen de la arsenato reductasa. El alineamiento arrojó una secuencia consenso con alto contenido de bases degeneradas. Sin embargo, dentro de la secuencia existían zonas conservadas con baja tasa de bases degeneradas. Estas zonas se eligieron para el diseño de los imprimadores. Se obtuvo un total de 2 parejas de imprimadores (2 secuencias sentido y dos secuencias antisentido) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Imprimadores utilizados para la amplificación del gen de la arsenato reductasa

Nombre	Secuencia
ARCenibiotF1	TTGAKRAKGCYWTGAAYRTYCC
ARCenibiotR1	CCCAWGCMGARTAGCCTC
ARCenibiotF2	ARRAGYCA YRTTGAKRAKGC
ARCenibiotR2	GCMGARTAGCCTCCYYCCATRTT
At2g21045Fp	ATGTATACATATTCTCTCCTCAAC
At2g21045Rp	TTAGTTTTTCCTTTGGCCTGAAC

*Amplificación y secuenciación del gen arsenato reductasa en Justicia pectoralis y Arabidopsis thaliana*

Con el fin de estandarizar el protocolo para la amplificación del gen AR, se realizaron diferentes pruebas de PCR. Con respecto a *A. thaliana*, todas las muestras mostraron un perfil bastante homogéneo con bandas similares en las diferentes temperaturas de hibridación. Sin embargo, a mayor temperatura la intensidad de las bandas disminuyó lo que reflejó un bajo rendimiento del producto de PCR. El peso del fragmento correspondió al esperado, 945 pb aproximadamente. Sin embargo, con respecto al tilo no se obtuvo ningún producto de amplificación (Figura S2). Basado en estos resultados, se decidió trabajar en las temperaturas que mostraron bandas con mayor intensidad (50 – 54 °C).

Otra variación en las condiciones del PCR para *J. pectoralis*, fue la utilización de los imprimadores diseñados a partir del alineamiento, así como los reportados para *A. thaliana*. El primer análisis dio como resultado la amplificación de varios fragmentos, tanto para los imprimadores específicos de *A. thaliana*, como para una de las combinaciones de los que fueron diseñados en este trabajo, en las tres temperaturas de hibridación (40, 45, 50 °C). Uno de los fragmentos amplificados tenía un peso de aproximadamente 481 pb, un peso similar al esperado (Figura S3). Sin embargo, la presencia de varios amplicones es una limitante en la identificación por PCR en donde los fragmentos amplificados no pudieron ser secuenciados en primera instancia.

En el análisis posterior se probaron dos nuevas temperaturas de hibridación (46 y 54 °C) con el fin de obtener la temperatura óptima para mejorar la estabilidad y especificidad del

complejo templado – imprimador. Se obtuvieron distintos perfiles de bandas en las diferentes temperaturas y combinaciones de imprimadores probadas (Figura S4). Estos productos de PCR fueron enviados a secuenciar para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados. Los resultados de la secuenciación revelaron que se obtuvieron otros fragmentos amplificados y la presencia de estos fue una limitante para los análisis posteriores. Debido a que las secuencias no resultaron ser de buena calidad no se logró obtener una secuencia consenso para ser comparada con las secuencias publicadas que codifican para AR en otras especies vegetales.

Los genes responsables de la codificación de AR han sido identificados y purificados en diferentes especies vegetales, tales como *A. thaliana*, *O. sativa* y *P. vittata* (Cesaro et al., 2015; Sánchez-Bermejo et al., 2014; Xu et al., 2017). La dificultad para encontrar este gen en el genoma de tilo puede deberse a la alta variabilidad de las familias de estos genes responsables de la transformación de arsénico. Las AR descritas en diversos organismos presentan diferencias que están asociadas a la heterogeneidad de secuencias y a la conformación estructural, lo que permite clasificarlas según sus estructuras, mecanismos de reducción, la localización de las cisteínas catalíticas (Messens & Silver, 2006).

#### *Actividad arsenato reductasa*

La actividad de arsenato reductasa en la planta se determinó de forma indirecta, midiendo la absorbancia a 880 nm que se genera por el color del complejo formado por el As(V) con molibdato. La metodología está basada en un ensayo colorimétrico el cual es una modificación del método clásico utilizado para la cuantificación de fosfato (P) en muestras acuosas (Hu et al., 2012; Lenoble et al., 2003). El fundamento de la determinación se basa en las similitudes entre el As(V) y el P, lo que ocasiona que el arsenato forme el complejo con molibdato, que reducido por el ácido ascórbico, produce especies de color azul que absorben fuertemente en la región infrarroja (880 nm). El As(III) no reacciona para formar el complejo, por lo que una reducción en la absorbancia está directamente relacionada con la reducción de As(V) a As(III) en la longitud de onda seleccionada.

Se extrajeron las proteínas solubles de las raíces de *J. pectoralis*, y se utilizaron mezclas de reacción que contenían el extracto con y sin desalinizar, las mismas se incubaron en presencia o ausencia de glutatión. Existió reducción en la absorbancia cuando se utilizaron los extractos

proteicos sin desalinizar en presencia de GSH (Cuadro 6). Sin embargo, cuando los extractos fueron desalinizados, las absorbancias no variaron. La presencia de glutatión hace posible la reducción de As(V) a As(III) con el extracto sin desalinizar. Por otro lado, la desalinización del extracto proteico podría haber eliminado algún cofactor importante para que se produzca la reacción de reducción a pesar de haber agregado GSH. Un resultado similar se dio cuando extractos proteicos se concentraron mediante precipitación con acetona. Los extractos redisueltos tampoco mostraron cambios en su absorbancia a 880nm, incluso luego de agregar GSH. Este resultado podría apoyar la hipótesis de la falta de un cofactor para que se realice la reducción (Cuadro 7), y por otro lado que la reducción de As(V) se deba a una reacción enzimática mediada por GSH.

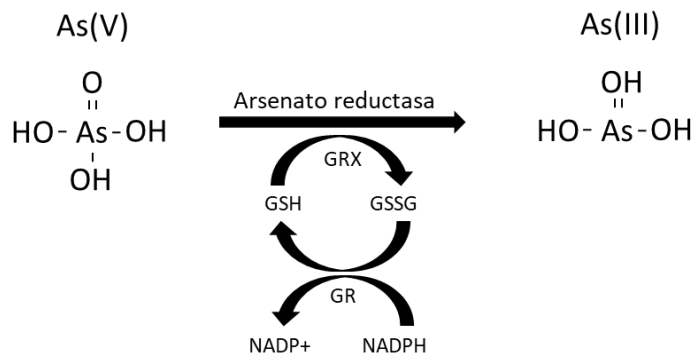
**Cuadro 6.** Cambio en absorbancia a 880 nm en extractos proteicos desalinizados o no de raíces de *J. pectoralis* en presencia o ausencia de glutatión. Los valores representan promedios ( $\pm 1$  D.E.) de 2 réplicas por tratamiento.

Muestra	Absorbancia según tiempo de incubación (minutos)	
	0	60
Extracto proteico sin desalinizar + glutatión	0.035 $\pm$ 0.02	0.025 $\pm$ 0.01
Extracto proteico	0.039 $\pm$ 0.007	0.034 $\pm$ 0.008
Extracto proteico desalinizado + glutatión	0.014 $\pm$ 0.002	0.019 $\pm$ 0.006
Extracto proteico desalinizado	0.012 $\pm$ 0.008	0.016 $\pm$ 0.004

**Cuadro 7.** Cambio en absorbancia a 880 nm en extractos proteicos de raíces de *J. pectoralis*, previamente concentrados con acetona. Los valores representan promedios ( $\pm 1$  D.E.) de 2 réplicas por tratamiento.

Muestra	Tiempo de incubación (minutos)	
	0	60
Extracto proteico + glutatión	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.07
Extracto proteico	0.06 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.02

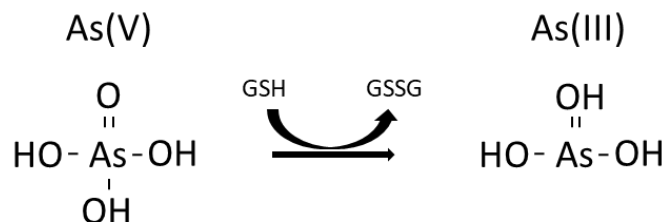
El GSH cumple un rol determinante en la vía enzimática, ya que funciona como donante de electrones para la reducción de arsenato catalizada por enzimas (Mukhopadhyay et al., 2000). Las enzimas involucradas en la reducción de As(V) a As(III) trabajan con mayor frecuencia con los componentes del + de las células y este sistema se mantiene mediante el ciclo redox del GSH con la glutaredoxina (GRX) y la glutatión reductasa (GR) (Messens & Silver, 2006; Mukhopadhyay et al., 2002) (Figura 7).



**Figura 7.** Reducción de arsenato por la vía enzimática. El arsenato (As(V)) se reduce mediante la acción de la arsenato reductasa y glutatión (GSH) para producir arsenito (As(III)) y disulfuro de glutatión (GSSG). La glutaredoxina (GRX) y la glutatión reductasa (GR) mantienen el ciclo redox del glutatión.

Las plantas también mantienen la capacidad de reducir arsenato a arsenito, aunque no tengan una arsenato reductasa funcional. Tal es el caso reportado por Chao et al., 2014 en *A. thaliana*, en el cual las plantas mantenían la capacidad de reducir el arsénico en ausencia de la arsenato reductasa funcional HAC1 (High Arsenic Content 1). La forma en que las plantas pueden reducir el As(V) mediante un mecanismo no enzimático, es utilizando GSH como agente reductor. Dos moléculas de GSH son necesarias para que el As(V) se reduzca a As(III) (Delnomdedieu et al., 1994) (Figura 8). Nagarajan & Ebbs (2010) determinaron que en extractos de raíces de *P. vittata*, la adición de GSH aumentó la tasa de reducción de arsenato en 65-70% en comparación con las reacciones control en las que no se añadió GSH, evidenciado de esta forma que la actividad de arsenato reductasa es significativamente mayor cuando se incluye GSH exógeno.





**Figura 8.** Reducción de arsenato por la vía no enzimática. El arsenato (As(V)) se reduce mediante glutatión (GSH) para producir arsenito (As(III)) y disulfuro de glutatión (GSSG).

La posibilidad de que el GSH sea el responsable de reducir al As(V) en *Justicia pectoralis* no parece ser una posibilidad, dado que su sola adición a los extractos no provocó una disminución en la absorbancia a 880 nm.

La determinación de la especie de arsénico presente en ambos tiempos de reacción (0 y 60 minutos) del ensayo utilizado no se pudo llevar a cabo con la metodología empleada. Un punto importante en las determinaciones mediante espectrofotometría ultravioleta (UV) es la no interferencia de otros compuestos a la hora de cuantificar el analito de interés. En este sentido, la matriz con la que se trabajó es muy compleja y a pesar de los ensayos realizados intentando eliminar las interferencias presentes en los extractos proteicos, ellas siempre imposibilitaron la determinación de específica de As(V) y As(III) en las muestras.

La actividad arsenato reductasa ha sido reportada en variedad de organismos, y tiene una función clave con respecto a la desintoxicación de arsénico, previniendo que este metaloide se acumule rápidamente en las células y de esta manera hacer frente a la toxicidad y los daños oxidativos asociados que provoca. En plantas se ha observado un mecanismo de resistencia al arsénico que está relacionado con la reducción de As(V) a As(III), ya que se ha encontrado que la principal especie de arsénico presente en raíces y partes aéreas corresponde a la especie trivalente (As(III)) a pesar de haber sido expuestas a As(V) (Xu et al., 2007). De acuerdo con los resultados obtenidos, *J. pectoralis* puede tener este mismo mecanismo de reducción.

#### **Agente quelante involucrado en la desintoxicación de arsénico**

La exposición a arsénico en tilo induce la producción de glutatión y fitoquelatinas, al igual que en otras especies vegetales. Los datos obtenidos mediante la técnica UPLC-ESI-Q-ToF/MS son consistentes con la presencia del glutatión, una fitoquelatina libre y un complejo As(III)-PC en los extractos de raíces. Los compuestos fueron identificados mediante la

determinación de masa exacta con un error inferior a 3 ppm (Cuadro 8). El GSH se determinó en un tiempo de retención de 1 minuto (GSH  $[M + H]^+$  a 308  $m/z$ , error de 0.0 ppm), la fitoquelatina 2 oxidada se presentó a un tiempo de retención de 8 min ( $PC_2$  ox  $[M + 2H]^{2+}$  a  $m/z$  538) y el complejo arsénico – fitoquelatina 3, a los 11 min (As(III)- $PC_3$   $[M + H]^+$  a 844  $m/z$ , error de 0.0 ppm). Las plantas control mostraron la presencia de  $PC_2$  oxidada, sin embargo su señal era menor en comparación a la obtenida en los tratamientos con arsénico V.

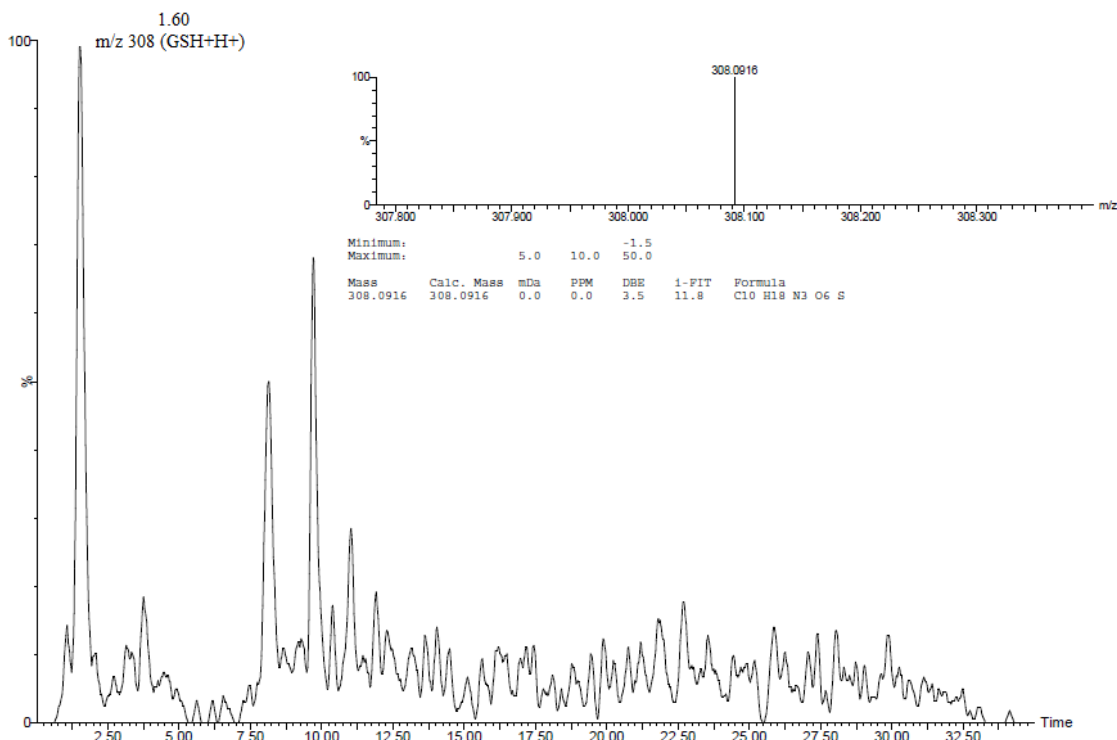
**Cuadro 8.** Compuestos identificados mediante cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría masas de tiempo de vuelo en extractos de raíces de *Justicia pectoralis* expuestas a As(V)

Masa monoisotópica ( $[M+H]^+$ o $[M+2H]^+$ )	Tiempo de retención (min)	Especie química	Fórmula Molecular	Error (ppm)
308.0916	1.604	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	0.0
538.1278	8.024	$PC_2$ oxidada	$C_{36}H_{54}N_{10}O_2S_4$	NA
844.0933	11.114	As <sup>(III)</sup> - $PC_3$	$C_{26}H_{38}N_7O_{14}S_3As$	0.0

Las plantas presentan la capacidad de reducir el As(V) absorbido dando lugar al As(III). Dado que el arsenito afecta los procesos metabólicos en el citoplasma, la planta debe desintoxicarse de alguna forma. Una de las estrategias para reestablecer la homeostasis intracelular está relacionada con la síntesis de tioles como un sistema de defensa, y la posterior quelación del metaloide dado a su alto contenido de cisteínas, generando de esta forma complejos metal-ligando que reducen la toxicidad en las raíces de plantas no hiperacumuladoras (Bluemlein et al., 2009).

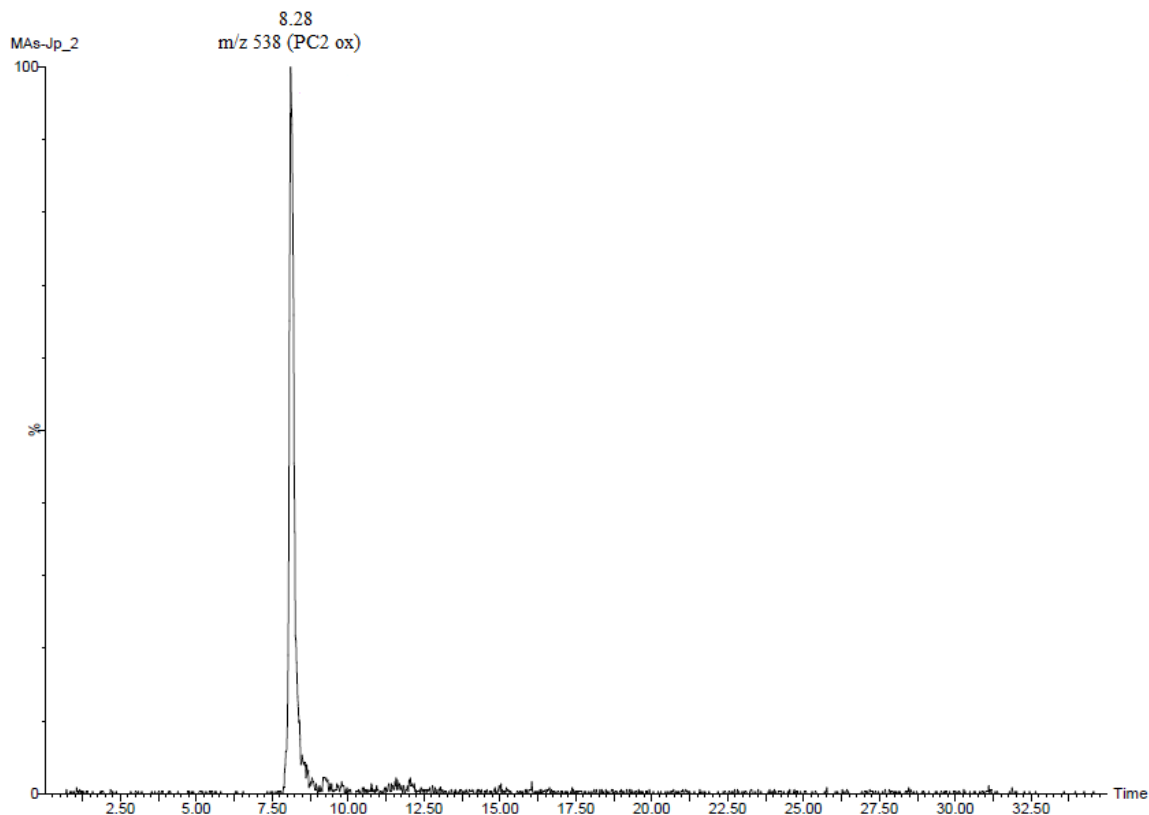
Se determinó la presencia de GSH intracelular en *J. pectoralis* expuesto a As(V) (Figura 10), la presencia de este metabolito es importante ya que juega un papel central en la tolerancia de las plantas a los metales pesados y metaloides y es de gran importancia en las plantas expuestas a arsénico (Hernández et al., 2015). El incremento en la síntesis de GSH se ha determinado como una de las primeras respuestas de defensa de las plantas al As(III) (Veza et al., 2019). Uno de los mecanismos responsables de la tolerancia a As(III) en las plantas

está relacionado con la capacidad antioxidante del GSH (Zhang et al., 2014). Otro mecanismo corresponde a la biosíntesis de las fitoquelatinas, ya que éste actúa como precursor de ellas (Noctor et al., 2012).



**Figura 9.** Cromatograma y espectro representativo que muestra la separación UPLC y la detección ESI-MS/MS-Qtof del compuesto GSH en raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(V) durante cuatro días. El eje de tiempo se muestra en la parte inferior en minutos.

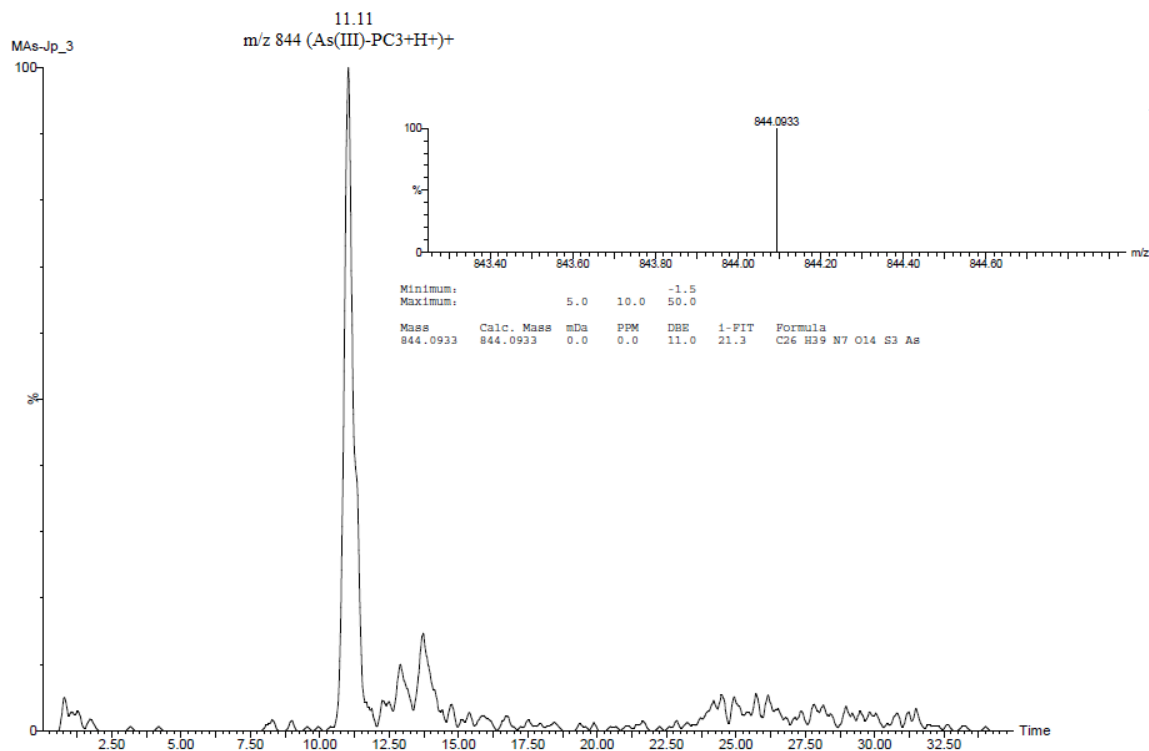
La fitoquelatina libre identificada como PC<sub>2</sub> oxidada (dos puentes SS) en *J. pectoralis* (Figura 11) es de los compuestos más comunes encontrados en relación con la desintoxicación de arsénico. Raab et al., (2007) observaron como la producción de estos péptidos se ve estimulada por el metaloide e informaron que la PC<sub>2</sub> oxidada fue el compuesto dominante en todas las partes de la planta de girasol (*Helianthus annuus*) cuando la estresaron con el metaloide. Por otro lado, recientemente se identificaron por primera vez varias especies de PC's en dos genotipos de arroz, y la PC<sub>2</sub> fue la especie dominante, además de su biosíntesis aumentó al exponer las plantas a dosis más altas de As(III) y As(V) (Kumar et al., 2020).



**Figura 10.** Cromatograma representativo que muestra la separación mediante UPLC la PC<sub>2</sub> oxidada en raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(V) durante cuatro días. El eje de tiempo se muestra en la parte inferior en minutos.

El complejo formado por As(III) y la PC<sub>3</sub> (Figura 12) presentó una señal más fuerte en individuos de *J. pectoralis* cuando el periodo de exposición fue de cuatro días. La formación de este complejo es un mecanismo importante para la tolerancia constitutiva así como adaptativa en plantas no hiperacumuladoras de As (Souri et al., 2017). Este complejo se forma debido a que la PC<sub>3</sub> proporciona tres grupos tiol (-SH Cys) que equivalen a la carga del As(III) y forman una coordinación triédrica más estable (Raab et al., 2004; Schmied-Tobies et al., 2014). De hecho la PC<sub>3</sub> libre así como el complejo As(III)-PC<sub>3</sub> no se detectaron en las plantas control, lo que indica que su formación parece ser inducida por la absorción de As(V). Además, no se logró detectar PC<sub>3</sub> libre en ninguna de las muestras, lo que indica su afinidad para formar complejos con el As(III). El complejo principal formado al aumentar los niveles de exposición de arsénico en el girasol fue el As(III)-PC<sub>3</sub> (Raab et al., 2007; Raab

et al., 2005). Por otro lado, Raab et al., 2004 estudiaron el papel de las PC's en la detoxificación de As(V) en el césped *Holcus lanatus*, y encontraron que As(III)-PC<sub>3</sub> era el complejo dominante.



**Figura 11.** Cromatograma y espectro representativo que muestra la separación mediante UPLC y la detección ESI-MS/MS-Qtof del complejo As(III)-PC<sub>3</sub> en raíces de *J. pectoralis* expuestas a As(V) durante cuatro días. El eje de tiempo se muestra en la parte inferior en minutos.

Otro mecanismo utilizado como sistema de defensa para tolerar la toxicidad causada por el arsénico en plantas no hiperacumuladoras está relacionado con el secuestro de los complejos As(III)-PC en las vacuolas de las células de la raíz. Las vacuolas ocupan la mayor parte del volumen de células vegetales maduras y su actividad metabólica es limitada, por lo tanto constituyen un sitio ideal para el secuestro de compuestos tóxicos (Park et al., 2012; Zhang et al., 2018). En plantas de arroz cultivadas con arsénico, el análisis realizado mediante nano-espectrometría de masas de iones secundarios (NanoSIMS) reveló que el arsénico se encontraba en las vacuolas de las células compañeras del floema, acompañado de S, por lo que mencionan que es posible que el As sea desintoxicado mediante la complejación con

ligandos y su posterior secuestro en las vacuolas (Moore et al., 2014). Probablemente la síntesis de fitoquelatinas así como el secuestro vacuolar representen las principales vías metabólicas involucradas en la resistencia y acumulación de arsénico en plantas tolerantes.

Los resultados de este estudio muestran que el tilo absorbe arsenato y arsenito por medio de los sistemas de captación de fosfato y las acuaporinas, respectivamente. Posteriormente, el arsenato se reduce dentro de las células de la raíz por una vía enzimática mediada por glutatión, y además, el arsénico induce la síntesis de fitoquelatinas y su posterior complejación. Si bien, no fue posible detectar el gen en el genoma de tilo responsable de la reducción de arsenato, no se puede descartar la presencia de una arsenato reductasa. La actividad de reducción de As(V) a As(III) fue determinada indirectamente y además, la detección del complejo As(III)-PC<sub>3</sub> evidencia que la reducción del As(V) se da en *J. pectoralis*. La capacidad de *J. pectoralis* para acumular y tolerar As le confieren ventajas sobre otros métodos convencionales de remediación de ambientes contaminados con el metaloide.

## Referencias

- Aldrich, M. V., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., & Gardea-Torresdey, J. L. (2007). Examination of arsenic(III) and (V) uptake by the desert plant species mesquite (*Prosopis* spp.) using X-ray absorption spectroscopy. *Science of the Total Environment*, 379(2–3), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.08.053>
- Ali, W., Isayenkov, S. V., Zhao, F. J., & Maathuis, F. J. M. (2009). Arsenite transport in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2329–2339. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0021-7>
- Basu, A., Saha, D., Saha, R., Ghosh, T., & Saha, B. (2014). A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. *Research on Chemical Intermediates*, 40(2), 447–485. <https://doi.org/10.1007/s11164-012-1000-4>
- Bienert, G. P., Thorsen, M., Schüssler, M. D., Nilsson, H. R., Wagner, A., Tamás, M. J., & Jahn, T. P. (2008). A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)<sub>3</sub> and Sb(OH)<sub>3</sub> across membranes. *BMC Biology*, 6(26), 1–15.

<https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-26>

- Biswas, J. K., Warke, M., Datta, R., & Sarkar, D. (2020). Is arsenic in rice a major human health concern. *Current Pollution Reports*, 6(2), 37–42.
- Bluemlein, K., Raab, A., & Feldmann, J. (2009). Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 357–366. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2395-z>
- Campos, N. V., Loureiro, M. E., & Azevedo, A. A. (2014). Differences in phosphorus translocation contributes to differential arsenic tolerance between plants of *Borreria verticillata* ( Rubiaceae ) from mine and non-mine sites. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(8), 5586–5596. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2444-9>
- Cesaro, P., Cattaneo, C., Bona, E., Berta, G., & Cavaletto, M. (2015). The arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* expresses two arsenate reductases. *Scientific Reports*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep14525>
- Chao, D. Y., Chen, Y., Chen, J., Shi, S., Chen, Z., Wang, C., Danku, J. M., Zhao, F. J., & Salt, D. E. (2014). Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants. *PLoS Biology*, 12(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002009>
- Delnomdedieu, M., Basti, M. M., Otvos, J. D., & Thomas, D. J. (1994). Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chemico-Biological Interactions*, 90(2), 139–155.
- Deng, F., Liu, X., Chen, Y., Rathinasabapathi, B., Rensing, C., Chen, J., Bi, J., Xiang, P., & Ma, L. Q. (2019). Aquaporins mediated arsenite transport in plants: molecular mechanisms and applications in crop improvement. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(16), 1613–1639. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1662704>
- Dhar, R. K., Zheng, Y., Rubenstone, J., & Van Geen, A. (2004). A rapid colorimetric method for measuring arsenic concentrations in groundwater. *Analytica Chimica Acta*, 526(2),

203–209. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.045>

- Duman, F., Ozturk, F., & Aydin, Z. (2010). Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to the inorganic arsenic species As(III) and As(V): Effects of concentration and duration of exposure. *Ecotoxicology*, *19*(5), 983–993. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0480-5>
- Ellis, D. R., Gumaelius, L., Indriolo, E., Pickering, I. J., Banks, J. A., & Salt, D. E. (2006). A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiology*, *141*(4), 1544–1554. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084079>
- Espinoza, J. (2018). *Análisis del uso potencial de la especie Justicia pectoralis L. para la remediación de fuentes naturales de agua contaminadas por arsénico(V)*. [Tesis de Maestría no publicada]. Universidad de Costa Rica.
- Esteban, E., Carpena, R. O., Meharg, A. A., & Esteban, E. (2003). High-affinity phosphate / arsenate transport in white lupin (*Lupinus albus*) is relatively insensitive to phosphate status. *New Phytologist*, *158*, 165–173. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00713.x>
- Gallegos-Garcia, M., Ramírez-Muñiz, K., & Song, S. (2012). Arsenic removal from water by adsorption using iron oxide minerals as adsorbents: a review. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, *33*(5), 301–315. <https://doi.org/10.1080/08827508.2011.584219>
- Garbinski, L. D., Rosen, B. P., & Chen, J. (2019). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environment International*, *126*(2019), 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>
- Garg, N., & Singla, P. (2011). Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistry Letters*, *9*(3), 303–321. <https://doi.org/10.1007/s10311-011-0313-7>
- Hernández, L. E., Sobrino-Plata, J., Montero-Palmero, M. B., Carrasco-Gil, S., Flores-Cáceres, M. L., Ortega-Villasante, C., & Escobar, C. (2015). Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress.



- Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2901–2911.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv063>
- Hu, S., Lu, J., & Jing, C. (2012). A novel colorimetric method for field arsenic speciation analysis. *Journal of Environmental Sciences*, 24(7), 1341–1346.  
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60922-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60922-4)
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. (2008). The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Letters*, 582(11), 1625–1628.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.022>
- Kumar, A., Singh, P. K., Srivastava, S., Dwivedi, S., Tripathi, R. D., Awasthi, G., Gupta, K., & Ansari, M. I. (2020). A comparative study on effect of arsenic on thiolic ligands and phytochelatins in contrasting arsenic accumulating rice. *International Journal of*
- Leal, L. K. A. M., Silva, A. H., & Viana, G. S. d. B. (2017). *Justicia pectoralis*, a coumarin medicinal plant have potential for the development of antiasthmatic drugs? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(6), 794–802.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.09.005>
- Lenoble, V., Deluchat, V., Serpaud, B., & Bollinger, J.-C. (2003). Arsenite oxidation and arsenate determination by the molybdene blue method. *Talanta*, 61(3), 267–276.  
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00274-1)
- Lindsay, E. R., & Maathuis, F. J. M. (2016). *Arabidopsis thaliana* NIP7;1 is involved in tissue arsenic distribution and tolerance in response to arsenate. *FEBS Letters*, 590(6), 779–786. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12103>
- Liu, W.-J., Wood, B. A., Raab, A., McGrath, S. P., Zhao, F.-J., & Feldmann, J. (2010). Complexation of arsenite with phytochelatins reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152(4), 2211–2221.  
<https://doi.org/10.1104/pp.109.150862>
- Liu, W. J., Zhu, Y. G., Smith, F. A., & Smith, S. E. (2004). Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? *New Phytologist*, 162(2), 481–488. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01035.x>

- Madeira, A., Moura, T. F., & Soveral, G. (2016). Detecting aquaporin function and regulation. *Frontiers in Chemistry*, 4(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00003>
- Mathews, S., Rathinasabapathi, B., & Ma, L. Q. (2011). Uptake and translocation of arsenite by *Pteris vittata* L.: Effects of glycerol, antimonite and silver. *Environmental Pollution*, 159(12), 3490–3495. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.027>
- Meharg, A. A., & Macnair, M. R. (1992). Suppression of the high affinity phosphate uptake system: A mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*, 43(4), 519–524. <https://doi.org/10.1093/jxb/43.4.519>
- Meharg, A. A., & Jardine, L. (2003). Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*, 157, 39–44.
- Meharg, Andrew A., & Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 154(1), 29–43. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00363.x>
- Messens, J., & Silver, S. (2006). Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *Journal of Molecular Biology*, 362(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.002>
- Mirza, N., Mahmood, Q., Shah, M. M., Pervez, A., & Sultan, S. (2014). Plants as useful vectors to reduce environmental toxic arsenic content. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–11.
- Mkandawire, M., Lyubun, Y. V., Kosterin, P. V., & Dudel, E. G. (2004). Toxicity of arsenic species to *Lemna gibba* L. and the influence of phosphate on arsenic bioavailability. *Environmental Toxicology*, 19(1), 26–34. <https://doi.org/10.1002/tox.10148>
- Moore, K. L., Chen, Y., van de Meene, A. M. L., Hughes, L., Liu, W., Geraki, T., Mosselmans, F., Mcgrath, S. P., Grovenor, C., & Zhao, F. J. (2014). Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. *New Phytologist*, 201(1), 104–115. <https://doi.org/10.1111/nph.12497>

- Morelli, E., Mascherpa, M. C., & Scarano, G. (2005). Biosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in response to arsenate exposure. *BioMetals*, *18*(6), 587–593. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-2998-1>
- Mukhopadhyay, R., Bhattacharjee, H., & Rosen, B. P. (2014). Aquaglyceroporins: generalized metalloid channels. *Biochim Biophys Acta*, *1840*(5), 1583–1591. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.021>. Aquaglyceroporins
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T., & Silver, S. (2002). Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(3), 311–325. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00112-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00112-2)
- Mukhopadhyay, R., Shi, J., & Rosen, B. P. (2000). Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(28), 21149–21157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910401199>
- Nagarajan, V. K., & Ebbs, S. D. (2007). Transport of arsenite by the arsenic hyperaccumulating brake fern *Pteris vittata* is inhibited by monovalent silver. *Indian Journal of Plant Physiology*, *12*(4), 312–316.
- Nagarajan, V. K., & Ebbs, S. D. (2010). Arsenate reductase activity in roots from the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* utilizes both glutathione and dithiothreitol as reductants. *Plant Biosystems*, *144*(4), 857–859. <https://doi.org/10.1080/11263504.2010.522770>
- Niemietz, C. M., & Tyerman, S. D. (2002). New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Letters*, *531*(3), 443–447.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, *35*(2), 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Park, J., Song, W. Y., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T. H., Schiller, M., Lee, T. G., Martinoia, E., & Lee, Y. (2012). The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate

- tolerance to cadmium and mercury. *Plant Journal*, 69(2), 278–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04789.x>
- Peralta-Pérez, M. D. R., & Volke-Sepúlveda, T. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 75–88.
- Pommerrenig, B., Diehn, T. A., & Bienert, G. P. (2015). Metalloido-porins: essentiality of Nodulin 26-like intrinsic proteins in metalloid transport. *Plant Science*, 238, 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.002>
- Porquet, A., & Filella, M. (2007). Structural evidence of the similarity of  $\text{Sb}(\text{OH})_3$  and  $\text{As}(\text{OH})_3$  with glycerol: implications for their uptake. *Chemical Research in Toxicology*, 20(9), 1269–1276. <https://doi.org/10.1021/tx700110m>
- Raab, A., Feldmann, J., & Meharg, A. A. (2004). The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiology*, 134(3), 1113–1122. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033506>
- Raab, A., Ferreira, K., Meharg, A. A., & Feldmann, J. (2007). Can arsenic-phytochelatin complex formation be used as an indicator for toxicity in *Helianthus annuus*? *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1333–1338. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl300>
- Raab, Andrea, Raab, A., Schat, H., Schat, H., Meharg, A. a, Meharg, A. a, Feldmann, J., & Feldmann, J. (2005). Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytologist*, 168, 551–558. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01519.x>
- Raab, Andrea, Williams, P. N., Meharg, A., & Feldmann, J. (2007). Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants. *Environmental Chemistry*, 4(3), 197–203. <https://doi.org/10.1071/EN06079>
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>

- Sabir, F., Di Pizio, A., Loureiro-Dias, M. C., Casini, A., Soveral, G., & Prista, C. (2020). Insights into the selectivity mechanisms of grapevine NIP aquaporins. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21186697>
- Sabir, F., Gomes, S., Loureiro-Dias, M. C., Soveral, G., & Prista, C. (2020). Molecular and functional characterization of grapevine NIPs through heterologous expression in aqy-null *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2)(63), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21020663>
- Sánchez-Bermejo, E., Castrillo, G., Del Llano, B., Navarro, C., Zarco-Fernández, S., Martínez-Herrera, D. J., Leo-Del Puerto, Y., Muñoz, R., Cámara, C., Paz-Ares, J., Alonso-Blanco, C., & Leyva, A. (2014). Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications*, *5*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5617>
- Schmied-Tobies, M. I. H., Arroyo-Abad, U., Mattusch, J., & Reemtsma, T. (2014). Mass spectrometric detection, identification, and fragmentation of arseno-phytochelatins. *Journal of Mass Spectrometry*, *49*(11), 1148–1155. <https://doi.org/10.1002/jms.3435>
- Sharma, I. (2012). Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biologia*, *67*(3), 447–453. <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0024-y>
- Shi, G., Ma, H., Chen, Y., Liu, H., & Song, G. (2019). Low arsenate influx rate and high phosphorus concentration in wheat (*Triticum aestivum* L.): a mechanism for arsenate tolerance in wheat plants. *Chemosphere*, *214*(2019), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.090>
- Souri, Z., Karimi, N., & De Oliveira, L. (2017). Antioxidant enzymes responses in shoots of arsenic hyperaccumulator, *Isatis cappadocica* Desv., under interaction of arsenate and phosphate. *Environmental Technology*, *39*(10), 1316–1327. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1329349>
- Souri, Z., Karimi, N., & Sandalio, L. M. (2017). Arsenic hyperaccumulation strategies: an overview. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *5*(67), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00067>

- Strawn, D. G. (2018). Review of interactions between phosphorus and arsenic in soils from four case studies. *Geochemical Transactions*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12932-018-0055-6>
- Tangahu, B. V., Abdullah, S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2011/939161>
- Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., & Maathuis, F. J. M. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology*, 25(4), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003>
- Veza, M. E., Luna, D. F., Agostini, E., & Talano, M. A. (2019). Glutathione, a key compound for As accumulation and tolerance in soybean plants treated with AsV and AsIII. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.03.002>
- Wang, J., Zhao, F. J., Meharg, A. A., Raab, A., Feldmann, J., & McGrath, S. P. (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology*, 130(3), 1552–1561. <https://doi.org/10.1104/pp.008185>
- Wang, X., Ma, L. Q., Rathinasabapathi, B., Cai, Y., Liu, Y. G., & Zeng, G. M. (2011). Mechanisms of efficient arsenite uptake by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Science and Technology*, 45(22), 9719–9725. <https://doi.org/10.1021/es2018048>
- Wang, X., Ma, L. Q., Rathinasabapathi, B., Liu, Y., & Zeng, G. (2010). Uptake and translocation of arsenite and arsenate by *Pteris vittata* L.: effects of silicon, boron and mercury. *Environmental and Experimental Botany*, 68(2), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.11.006>
- Xu, J., Shi, S., Wang, L., Tang, Z., Lv, T., Zhu, X., Ding, X., Wang, Y., Zhao, F. J., & Wu, Z. (2017). OsHAC4 is critical for arsenate tolerance and regulates arsenic accumulation in rice. *New Phytologist*, 215(3), 1090–1101. <https://doi.org/10.1111/nph.14572>

- Xu, X. Y., McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2007). Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist*, *176*(3), 590–599. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02195.x>
- Zhang, J., Martinoia, E., & Lee, Y. (2018). Vacuolar transporters for cadmium and arsenic in plants and their applications in phytoremediation and crop development. *Plant and Cell Physiology*, *59*(7), 1317–1325. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy006>
- Zhang, W., Tan, N. G. J., & Li, S. F. Y. (2014). NMR-based metabolomics and LC-MS/MS quantification reveal metal-specific tolerance and redox homeostasis in *Chlorella vulgaris*. *Molecular BioSystems*, *10*(1), 149–160. <https://doi.org/10.1039/c3mb70425d>
- Zhang, X., Uroic, M. K., Xie, W. Y., Zhu, Y.-G., Chen, B.-D., McGrath, S. P., Feldmann, J., & Zhao, F.-J. (2012). Phytochelatins play a key role in arsenic accumulation and tolerance in the aquatic macrophyte *Wolffia globosa*. *Environmental Pollution*, *165*, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.009>
- Zhao, F. J., Meharg, A. A., & Mcgrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, *181*, 777–794.

### Capítulo III. Conclusiones

- A. La entrada de arsenato en las raíces de tilo se realiza a través de los sistemas de captación de fosfato, y se observa una inhibición de la entrada de As en presencia de concentraciones de P superiores a 40  $\mu\text{M}$ . La entrada de arsenito es mediada por las acuaporinas, específicamente las acuagliceroporinas, ya que la exposición al nitrato de plata, un inhibidor de estas proteínas provoca una reducción en la captación del metaloide.
- B. Con respecto a la desintoxicación de arsénico, se corrobora la presencia de mecanismos de reducción dependientes de glutatión. La adición de GSH al extracto proteico provoca la reducción del As(V) a As(III) probablemente mediante la vía enzimática en raíces de *J. pectoralis*.
- C. No se logró la identificación de las especies de arsénico presentes en el ensayo de reducción de arsénico por las características de la matriz, la cual fue muy diversa y compleja.
- D. Se determinaron tanto la presencia de glutatión, como la de fitoquelatinas, y específicamente la presencia del complejo As(III)-PC<sub>3</sub>, lo que también evidencia que el As(V) es reducido por la planta a As(III).
- E. Si bien, no se pudo identificar un gen de arsenato reductasa en el genoma de *J. pectoralis*, los resultados del ensayo colorimétrico así como la presencia del complejo As(III)-PC<sub>3</sub> sugieren que la enzima está presente.
- F. En la medida en que en el conocimiento de los mecanismos implicados en la tolerancia al As en tilo incrementa, permitirá una aplicación más eficiente y a gran escala de esta tecnología.



## Cuadros Suplementarios

**Cuadro S1.** Secuencias depositadas en el GenBank utilizadas para el alineamiento múltiple del gen codificante para la arsenato reductasa en plantas

<b>Especie</b>	<b>Código de acceso</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BT008306.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AK227791.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_127674.5
<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	XM_002878484.2
<i>Camelina sativa</i>	XM_010430695.1
<i>Camelina sativa</i>	XM_010418542.2
<i>Camelina sativa</i>	XM_010473778.1
<i>Capsella rubella</i>	XM_006296286.2
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype <i>Es-0</i>	KF938557.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> strain <i>Lm-2</i>	KF938559.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> strain <i>Kz-2</i>	KF938558.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype <i>Ct-1</i>	KF938556.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> strain <i>Bay-0</i>	KF938563.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> strain <i>Yeg-1</i>	KF938562.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> strain <i>Sav-0</i>	KF938561.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype <i>Chi-0</i>	KF938555.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> strain <i>Fuk-0</i>	KF938572.1
<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006409248.2
<i>Brassica rapa</i>	XM_009122870.2
<i>Brassica napus</i>	XM_013835763.2
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	XM_013741399.1
<i>Brassica napus</i>	XM_013816559.2
<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010533243.2
<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010533244.1
<i>Raphanus sativus</i>	XM_018582207.1
<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	XM_023657157.1

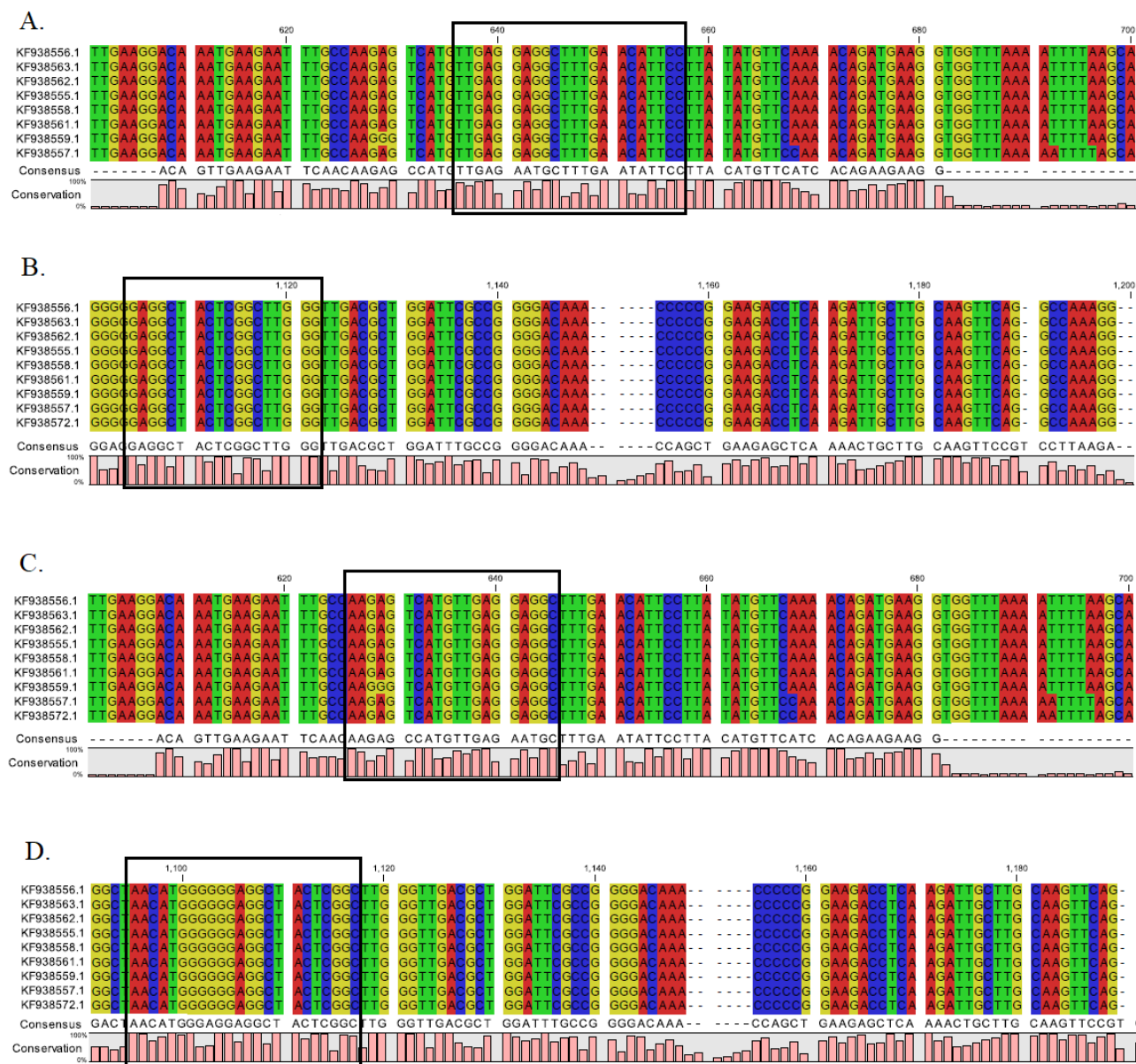
<i>Cucumis melo</i>	XM_008459455.2
<i>Eucalyptus grandis</i>	XM_010057796.2
<i>Prunus persica</i>	XM_007217791.2
<i>Ziziphus jujuba</i>	XM_016012288.2
<i>Prunus avium</i>	XM_021945378.1
<i>Cucurbita moschata</i>	XM_023088230.1
<i>Cucurbita maxima</i>	XM_023129927.1
<i>Lotus japonicus</i>	BT136986.1
<i>Morus notabilis</i>	XM_024176383.1
<i>Populus trichocarpa</i>	XM_002320980.3
<i>Populus euphratica</i>	XM_011035260.1
<i>Prunus mume</i>	XM_008231523.1
<i>Momordica charantia</i>	XM_022290565.1
<i>Prunus mume</i>	XM_016793737.1
<i>Jatropha curcas</i>	XM_012226359.2
<i>Malus x domestica</i>	XM_008359756.2
<i>Cucumis melo</i>	XM_008459454.2
<i>Arachis hypogaea</i>	XM_025831144.1
<i>Prunus avium</i>	XM_021945377.1
<i>Quercus suber</i>	XM_024069868.1
<i>Arachis ipaensis</i>	XM_016332339.2
<i>Arachis duranensis</i>	XM_016097340.2
<i>Nicotiana attenuata</i>	XM_019395959.1
<i>Spinacia oleracea</i>	XM_021997172.1
<i>Medicago truncatula</i>	XM_003595679.3
<i>Lactuca sativa</i>	XM_023887951.1
<i>Lactuca sativa</i>	XM_023887952.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	XM_016652898.1
<i>Nicotiana glauca</i>	XM_009804804.1
<i>Chenopodium quinoa</i>	XM_021918153.1
<i>Vigna unguiculata</i>	XM_028055534.1

<i>Juglans regia</i>	XM_018968263.1
<i>Medicago truncatula</i>	XM_003593742.3
<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	XM_004303880.1
<i>Cynara cardunculus var. scolymus</i>	XM_025141172.1
<i>Vigna radiata var. radiata</i>	XM_014667858.2
<i>Vigna radiata var. radiata</i>	XM_020358556.1
<i>Glycine max</i>	NM_001254954.2
<i>Soybean clone JCVI-FLGm-9P15</i>	BT096360.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	XM_016605151.1
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XM_009613820.2
<i>Rosa chinensis</i>	XM_024329740.1
<i>Vigna angularis</i>	XM_017577390.1
<i>Cucumis sativus</i>	XM_004147023.2
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	XM_010692084.2
<i>Cicer arietinum</i>	XM_004513206.3
<i>Capsicum annuum</i>	XM_016721425.1
<i>Capsicum annuum</i>	XM_016701808.1
<i>Solanum tuberosum</i>	XM_006347202.2
<i>Solanum pennellii</i>	XM_015223307.2
<i>Citrus sinensis</i>	XM_025101743.1
<i>Nelumbo nucifera</i>	XM_010248545.2
<i>Gossypium arboreum</i>	XM_017762054.1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	XM_007131465.1
<i>Lupinus angustifolius</i>	XM_019595008.1
<i>Gossypium raimondii</i>	XM_012606430.1
<i>Papaver somniferum</i>	XM_026540292.1
<i>Olea europaea var. sylvestris</i>	XM_022990684.1
<i>Citrus clementina</i>	XM_024179038.1
<i>Nelumbo nucifera</i>	XM_010248544.1
<i>Ananas comosus</i>	XM_020229047.1
<i>Nelumbo nucifera</i>	XM_010248543.2

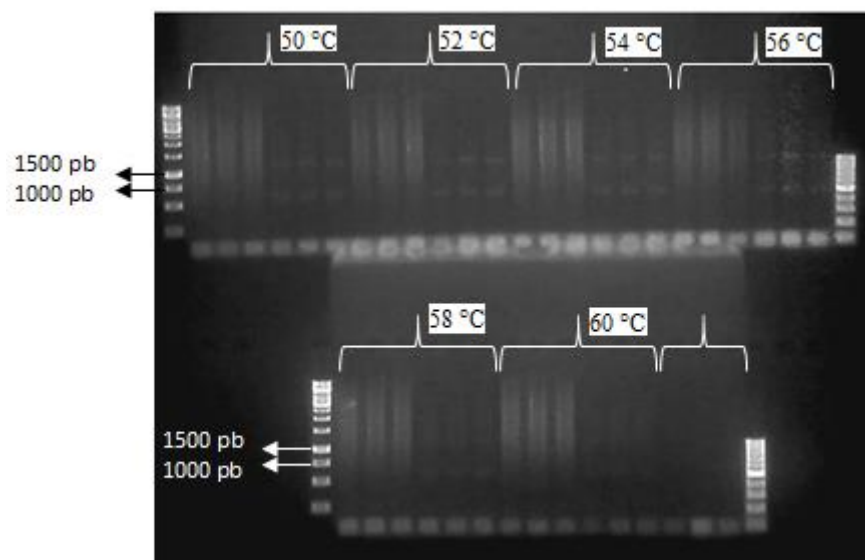
<i>Gossypium hirsutum</i>	XM_016899969.1
<i>Nicotiana attenuata</i>	XM_019405513.1
<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>	XM_022787432.1
<i>Gossypium raimondii</i>	XM_012606432.1
<i>Theobroma cacao</i>	XM_018124634.1

---

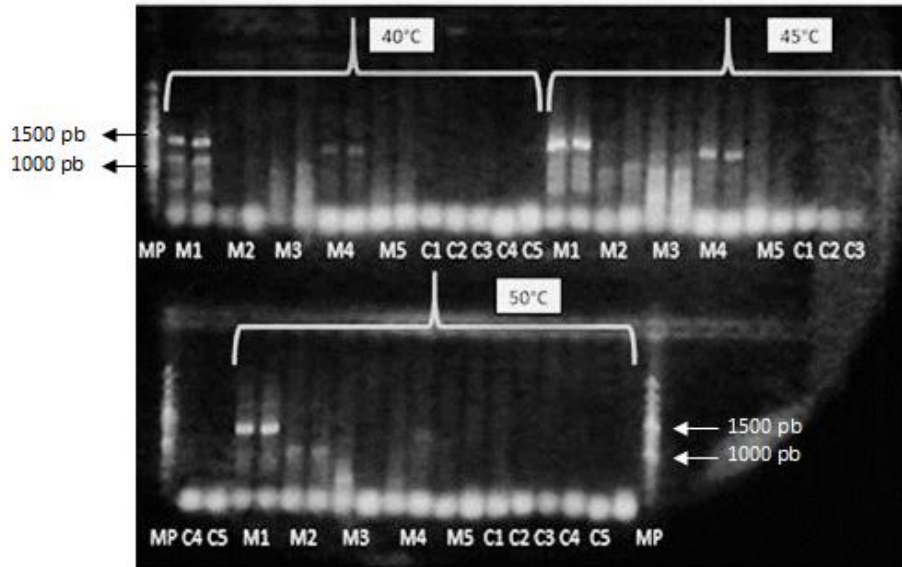
## Figuras Suplementarias



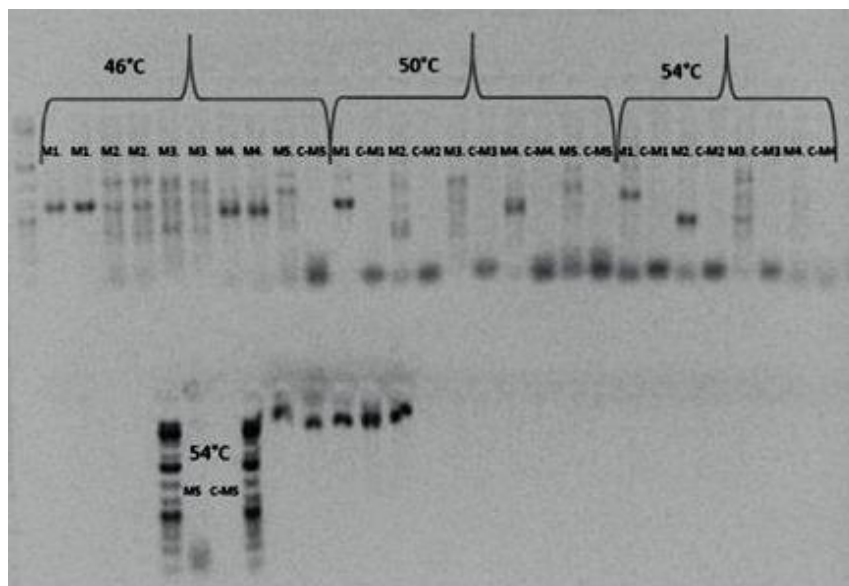
**Figura S1** Alineación de múltiples secuencias de genes que codifican para la enzima arsenato reductasa en 93 especies de plantas para el diseño de oligonucleótidos. Las secuencias están alineadas mediante un algoritmo de *alineación progresiva*, y los nucleótidos idénticos y similares se encuentran enmarcados. **A.** Oligonucleótido ARcenibiotF1. **B.** Oligonucleótido ARcenibiotR1. **C.** Oligonucleótido ARcenibiotF2. **D.** Oligonucleótido ARcenibiotR2.



**Figura S2.** Amplificación del gen de la arsenato reductasa en *Arabidopsis thaliana* y *Justicia pectoralis* con los cebadores específicos para *Arabidopsis thaliana*. **Arriba**, carril 1: Marcador de peso molecular 1kb; carril 2-4: *Justicia pectoralis*; carril 5-7: *Arabidopsis thaliana*; carril 8-10: *Justicia pectoralis*; carril 11-13: *Arabidopsis thaliana*; carril 14-16: *Justicia pectoralis*; 17-19: *Arabidopsis thaliana*; carril 20-22: *Justicia pectoralis*; carril 23-25: *Arabidopsis thaliana*; carril 26: Marcador de peso molecular 100 bp. **Abajo**, carril 1: marcador de peso molecular 1kb, carril 2 carril 2-4: *Justicia pectoralis*; carril 5-7: *Arabidopsis thaliana*; carril 8-10: *Justicia pectoralis*; carril 11-13: *Arabidopsis thaliana*; carril 14-16: controles negativos; carril 17: Marcador de peso molecular 100 bp.



**Figura S3.** Amplificación del gen de la arsenato reductasa en *Justicia pectoralis* utilizando los imprimadores específicos para *Arabidopsis thaliana* así como los diseñados a partir del alineamiento de secuencias. MP: marcador peso molecular 100 bp; M1: imprimadores específicos para *A. thaliana*; M2: ARcenibiotF1 + ARcenibiotR1; M3: ARcenibiotF1 + ARcenibiotR2; M4: ARcenibiotF2 + ARcenibiotR1; M5: ARcenibiotF2 + ARcenibiotR2; carril 14-16: control negativo para cada una las combinaciones de imprimadores.



**Figura S4.** Amplificación del gen de la arsenato reductasa en *Justicia pectoralis* utilizando los imprimadores específicos para *Arabidopsis thaliana* así como los diseñados a partir del alineamiento de secuencias. Carril 1: marcador peso molecular 100 bp; M1: imprimadores específicos para *A. thaliana*; M2: ARCEnibiotF1 + ARCEnibiotR1; M3: ARCEnibiotF1 + ARCEnibiotR2; M4: ARCEnibiotF2 + ARCEnibiotR1; M5: ARCEnibiotF2 + ARCEnibiotR2; C-M1/M5: control negativo para cada una las combinaciones de imprimadores.