



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

**ALTERACIONES
HISTOLÓGICAS DE LA
ADMINISTRACIÓN
INTRAPERITONEAL DE
EBULINA EN RATONES
VIEJOS**

TRABAJO FIN DE
GRADO EN EL GRADO
DE MEDICINA

DPTO. DE BIOLOGÍA
CELULAR, HISTOLOGÍA
Y FARMACOLOGÍA.

Valladolid, mayo 2020

Autor: Paula Vicente Pardo

Tutor: Dr. Manuel Garrosa

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 SAÚCO. ORIGEN, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA, COMPOSICIÓN Y APLICACIONES FARMACOLÓGICAS	3
1.2 RIPS	4
1.3 RIPS DEL SAMBUCUS EBULUS. EBULINA E ISOFORMAS	5
1.4 TOXICIDAD DE LA EBULINA	9
1.5. APLICACIONES FARMACOLÓGICAS: TERAPIA DIRIGIDA. INMUNOTOXINAS Y CONJUGADOS	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSIÓN	17
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFÍA	20

RESUMEN

La ebulina es una lectina con actividad antirribosómica aislada del saúco menor que se incluye entre las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) tipo 2. El interés de este tipo de proteínas radica en el consumo humano de los frutos y otras partes de las plantas que las contienen y en sus aplicaciones médicas. Entre éstas, destaca su posible empleo en la terapia contra el cáncer y otras enfermedades. Por todo ello, se hace necesario conocer la toxicidad de las RIPs y determinar sus posibles dosis terapéuticas. En el presente trabajo nos planteamos estudiar la toxicidad de la ebulina f en ratones viejos para conocer sus efectos en la edad avanzada y determinar si existen diferencias con respecto a los jóvenes. Se emplearon 6 ratones Swiss hembra de 12 meses de edad. A 4 de ellos se les inyectaron, por vía intraperitoneal, 4,5 mg/Kg de ebulina f disuelta en PBS pH 7,4 en un volumen de 60 μ L. A los 2 animales restantes se les inyectó por la misma vía 60 μ L de PBS como controles. En todo momento se siguieron las directrices para el manejo de animales de laboratorio establecidas en la Directiva europea 2010/63/EU y la legislación española al respecto. Se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% muestras de intestino delgado, intestino grueso, hígado, corazón, riñón y pulmón para su estudio histológico, encontrándose una mayor histotoxicidad de la ebulina f en ratones viejos con respecto a ratones jóvenes. Este hallazgo debe tenerse presente ante la posibilidad de su uso terapéutico sola o en forma de inmunotoxinas que permitan direccionar a la ebulina f frente a determinadas dianas en enfermedades como el cáncer, patología que aumenta su prevalencia con el envejecimiento.

Palabras clave: Ebulina. RIPs. Histotoxicidad

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SAÚCO. ORIGEN, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA, COMPOSICIÓN Y APLICACIONES FARMACOLÓGICAS

El saúco (género *Sambucus*, familia *Adoxaceae*) contiene gran variedad de especies. Constituyen mayoritariamente arbustos, no obstante, con las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y calidad de suelo pueden convertirse en árboles pequeños. El saúco prospera salvaje en climas tropicales, sin embargo, algunas especies requieren climas más continentales y mayores alturas. Probablemente las especies mejor conocidas y más ampliamente estudiadas sean el *S. nigra* (saúco negro) y el *S. ebulus* o saúco menor (enano) o yezgo. El saúco enano es un arbusto pequeño, aunque puede alcanzar los 3 metros de altura. Está dotado de un rizoma reptante y florece en verano (1).

El consumo de frutos del saúco se remonta al Neolítico. De hecho, se ha documentado el empleo alimenticio y medicamentoso de frutos del saúco desde hace más de 5000 años en regiones del norte de Francia y de la Toscana italiana. Sin embargo, el uso de frutos del saúco ha estado históricamente restringido por su contenido en proteínas biológicamente activas o sustancias de bajo peso molecular cuya ingestión podría desencadenar efectos nocivos en el organismo (2).

Como mencioné anteriormente, el saúco se ha considerado una de las plantas medicinales más utilizadas a nivel mundial y se ha documentado su uso en una amplia variedad de afecciones durante siglos. Entre sus acciones biológicas se han descrito la mejora del perfil lipídico y salud cardiovascular, efectos antivirales, efectos insecticidas, antiinflamatorios, diurético, efectos beneficiosos en el tratamiento de la artritis reumatoide y otros procesos inflamatorios crónicos, fiebre, epilepsia, antiulceroso y actividad en la curación de heridas y consolidación de fracturas óseas entre otras acciones (1–3).

En la actualidad, un número creciente de países están incorporando el saúco negro a su agricultura. En España su producción es anecdótica. Los cultivos se emplean en su mayoría en la producción de zumos concentrados debido a sus propiedades como antioxidante y fuente de vitamina C, y tintes (1).

Respecto a los compuestos bioactivos responsables de sus acciones medicinales, destacan flavonoides, vitaminas, antocianinas y polifenoles que le confieren actividad antioxidante (1,2). Entre las antocianinas descritas destaca Cyanidin-3-O-glucosidasa, en la cual se ha descrito actividad anticancerosa, ya que inhibe el crecimiento celular (2,3). Además de proteínas estructurales y funcionales, se han aislado en el saúco proteínas inactivadoras de ribosomas y lectinas, que serán objeto de este trabajo.

1.2 RIPs

Una RIP es una proteína con actividad enzimática inhibidora irreversible de la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por los ribosomas de mamíferos, hongos, algunas plantas y algunas bacterias.

Las RIPs llevan a cabo su actividad antirribosómica mediante la hidrólisis del enlace N-glucosídico de la adenina 4324 de la subunidad mayor (28S rRNA) del ribosoma de la rata o de su equivalente en otras células eucariotas. Esta adenina está localizada en un asa altamente conservado (SRL), lugar de interacción del ribosoma con el factor de elongación 2 (EF-2) en células eucariotas y el factor de elongación G (EF-G) en células procariontas. Como resultado las RIPs impiden la unión del factor de elongación y la consiguiente translocación del petidil-tRNA del sitio ribosómico aceptor (A) al sitio ribosómico donador (P) impidiendo así la síntesis proteica (Fig. 1). En todos los sistemas el mecanismo enzimático es el mismo, la depurinación del ácido nucleico. La eliminación de una adenina es condición necesaria para evitar síntesis proteica. Se han descrito RIPs con capacidad para eliminar más de una adenina. Se desconoce la significación funcional de este proceso de multidepuración. Tras los sucesivos estudios se han descrito RIPs que actúan sobre ácidos nucleicos no ribosómicos, oligonucleótidos y ADN.

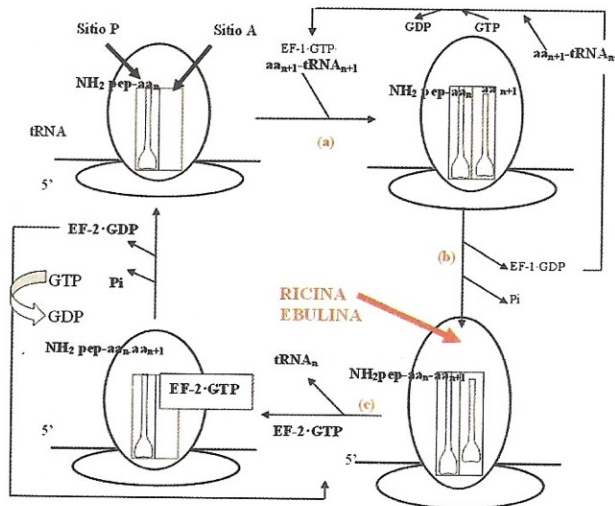


Figura 1. Alteración en el alargamiento de la cadena aminoacídica en células eucariotas producida por la acción enzimática de RIPs. Obtenido de (1).

Además se han ido atribuyendo otras actividades a las RIPs como actividad quitinasa, actividad topológica en el ADN, inhibidor de la integrasa del HIV, actividad SOD, actividad DNasa o actividad lipasa (4).

Por otro lado, las RIPs se clasifican en RIPs de tipo 1 y RIPs de tipo 2 (Tabla 1). Además, hay un grupo especial conocido como RIPs de tipo 3 aisladas únicamente en la familia Poaceae. Las RIPs tipo 1 están formadas por una sola cadena polipeptídica con actividad enzimática de inhibición de síntesis de proteínas. Las RIPs tipo 2 (tipo A-B) o lectinas antirribosómicas presentan dos cadenas polipeptídicas diferentes unidas por un puente disulfuro: una cadena A (con actividad enzimática equivalente a RIP tipo 1) y una cadena B (con propiedades de lectina). La cadena B permite a las RIPs tipo 2 entrar en la célula animal que contenga en su superficie el azúcar al que se une, permitiendo a la cadena A ejercer la actividad antirribosómica. Las RIPs de tipo 2 pueden estar formadas también por dímeros de dos cadenas polipeptídicas unidos por fuerzas no covalentes (tipo (A-B)₂), equivalentes a RIPs tipo 2 (1–3,5–7).

Tipo 1 (Una cadena)	No tóxicas	Gelonina, beetinas, tricosantina, petroglaucina, musarminas, ebulitinas, nigritinas, PAP, etc.
Tipo 2 (dos cadenas)	Poco tóxicas	Nigrina, ebulina
	Muy tóxicas	Ricina, abrina, modeccina, volkensina, viscumina
Tipo 2 (cuatro cadenas)	No tóxicas	Aglutinina de Ricinus communis (RCA), Aglutinina de Abrus precatorius (APA), Aglutinina de Momordica charantia,
	Algo tóxicas	Aglutinina de Viscum album (VAA)

Tabla 1. Clasificación de las proteínas inactivadoras de ribosomas de origen vegetal en función de su estructura molecular y toxicidad. Modificado de (1).

1.3 RIPS DEL SAMBUCUS EBULUS. EBULINA E ISOFORMAS

Se ha descrito la coexistencia de varias proteínas antirribosómicas en hojas maduras del *S. ebulus*. Al parecer, proceden de un pequeño número de genes ancestrales que posteriormente han sufrido procesos de duplicación y escisión (4). Las RIPS monocatenarias con actividad antirribosómica se denominaron ebulitinas α , β y γ . Las tres

inhiben la síntesis proteica sobre lisados de reticulocitos de conejos en el rango 1-3 nM. Al estar desprovistas de cadena lectina, no son capaces de reconocer receptores celulares y atravesar la membrana, lo que las convierte en menos tóxicas.

Sin embargo, las RIPs tipo 2 tienen más interés y mayor extensión en el campo de la biomedicina. Su potencial actividad antirribosómica condujo a los investigadores a profundizar en estas proteínas desde la perspectiva de la biología molecular, mediante sistemas acelulares de síntesis de proteínas.

Se han ido progresivamente aislando distintas isoformas de lectinas antirribosómicas que en su mayoría difieren en tan solo algún aminoácido. Sin embargo, estas diferencias pueden dar lugar a cambios en la actividad enzimática muy notables (1).

La ebulina, enzima sobre la que centraré mi trabajo, es una RIP tipo 2 que se halla en distintas isoformas dependiendo de la parte de la planta de la que se aísle. La ebulina I fue la primera RIP de dos cadenas que se aisló del *S. ebulus*, constituyendo junto con la nigrina b (*S. nigra*) una nueva familia de RIPs, con propiedades enzimáticas y estructurales similares a la ricina pero con mucha menor toxicidad en animales.

La ebulina I fue aislada en las hojas del *S. ebulus* por cromatografía de afinidad en matriz de Sepharosa-6B tratado con ácido clorhídrico. De este proceso se liberan restos de galactosa que se unen a la lectina. Acto seguido las proteínas son eluidas con D-galactosa o lactosa y son resueltas por filtración en gel Superdex 75.

El análisis estructural de la ebulina muestra que está formada por dos cadenas polipeptídicas: una cadena A con un peso molecular aparente de 26.000 con la actividad N-glicosidasa y una cadena B con peso molecular de 30.000 que muestra actividad lectina. Ambas cadenas están unidas por un puente disulfuro intercatenario (Fig. 2).

A través de clonación molecular y secuenciación de aminoácidos la ebulina I reveló una homología con la ricina de un 34% para la cadena A y un 48% para la cadena B. La ebulina I fue cristalizada y analizada y mostró que los aminoácidos clave para la actividad enzimática tienen la misma posición que en la cadena A de la ricina. Un análisis de la unión a azúcares indica que el subdominio 1α se une a lactosa y galactosa de manera similar que la ricina. Sin embargo, el subdominio 2γ de la cadena B de la ebulina se une solo a galactosa. Esta diferencia en la afinidad a azúcares podría explicar la menor toxicidad de la ebulina frente a la ricina en cultivos celulares y en estudios in vivo en ratones (1-3,5,6,8).

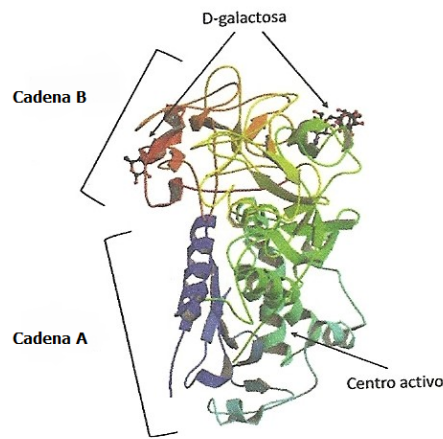


Figura 2. Estructura tridimensional de la ebulina I hallada por difracción de rayos X en cristales de ebulina I, en base a la secuencia de aminoácidos de la ebulina. Obtenido de (1).

La ebulina I inhibe la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo a aproximadamente las mismas concentraciones (IC_{50} de 0,15 nM) que lo hace la ricina (IC_{50} de 0,10 nM). Inhibe también la síntesis de proteínas en otros sistemas acelulares de mamífero, como cerebro o hígado de rata (IC_{50} de 0,09 Y 0,28 nM respectivamente) (Tabla 2). Un aspecto que diferencia a la ricina de la ebulina I es la menor toxicidad que muestra la ebulina sobre células animales en cultivo y sobre animales en experimentación, ratas y ratones. La IC_{50} de la ebulina I sobre células HELA es 64,3 nM (60.000 veces superior que la IC_{50} de la ricina). La IC_{50} de la administración intraperitoneal de ebulina I a ratones es de 2 mg/kg de peso corporal, en contraposición a la de ricina que es de 8 μ g/kg. Como detallaremos más adelante, la ebulina es alrededor de 10.000 veces menos tóxica para los cultivos celulares de mamífero que la ricina. Sin embargo, una de las principales diferencias que se halló con las tres RIPs monocatenarias ya señaladas, es que la ebulina I no es capaz de ejercer su actividad antirribosómica en plantas como *Vicia Sativa*, *Cucumis sativus* y *Triticum aestivum*, o bacterias como *Escherechia coli*. La ebulina I lleva a cabo la aglutinación de eritrocitos humanos a 51 mg/ml (1–3,5,6).

Las ebulinas r1 y r2 fueron aisladas del rizoma del *S. ebulus* mediante el mismo proceso que la ebulina I seguido de Mono-Q cromatografía. La ebulina r1 eluyó antes que la ebulina r2. Los pesos moleculares de las ebulinas r1 y r2 son de 26.000 para las cadenas A y 30.000 para las cadenas B respectivamente. La estructura proteica, actividad enzimática, aglutinación de glóbulos rojos y unión específica a azúcares es similar a la que muestra la ebulina I. Como la ebulina I, no inhiben la síntesis proteica en sistemas acelulares de plantas. La ebulina I y las ebulinas r1 y r2, al igual que la ricina pero a diferencia de otras RIPs tipo 2, actúan sobre el DNA promoviendo la depurinación activa con su característica acción RIP N-glucosidasa pero con diferente eficiencia (2,3).

La ebulina f fue aislada de los frutos verdes del *S. ebulus* y desaparece casi por completo con la maduración de los frutos. Desencadena la aglutinación de los glóbulos rojos humanos a una concentración 10 veces menor que la ebulina I y ha mostrado la mayor actividad en la inhibición de la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo. La ebulina f se encuentra en el saúco enano junto a una lectina homodimérica (tipo B-B) desprovista de actividad RIP, denominada SELFd. Sus cadenas B tienen alta homología de secuencia con la cadena B de la ebulina I con unión específica a la D-galactosa. La ebulina f es capaz de polimerizarse junto con otras ebulinas f e incluso con SELFd para formar agregados de alto peso molecular denominados poliebulinas, coexistiendo con formas libres de ebulina f y SELFd (2,3,6).

Proteína	Conejo (lisados de reticulocitos)	Hígado de rata	Cerebro de rata	<i>Vicia sativa</i>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Triticum aestivum</i>
ebulina I	0.15	0.28	0.09	>1786	>1786	>1786
ebulina f	0.03	0.15	0.06	>1786	>1786	>1786
ebulina r1	0.05	0.34	0.32	>893	>896	>896
Ebulina r2	0.04	0.34	0.30	>893	>896	>896

Tabla 2. Efecto de las lectinas antirribosómicas de *S. ebulus* L. sobre los sistemas celulares de biosíntesis de proteínas de mamíferos y plantas. Concentraciones expresadas en nM. Modificado de (1).

En las flores del *S. ebulus* encontramos dos lectinas denominadas ebulina blo (tipo A-B) y SELblo (tipo B-B). Ambas lectinas comparten secuencia de aminoácidos con la proteína considerada alérgeno Sam n1 aislada en frutos y flores del saúco, con lo que podrían desencadenar respuestas alérgicas. Además, la ebulina blo se ha mostrado altamente tóxica en ratones (2,3,8).

SEA I es una proteína con estructura tetramérica (A-B)₂ con peso molecular aparente de 140.000, en la que cada dímero A-B es equivalente a una unidad de tipo ebulina. Su afinidad por la galactosa permitió aislarlo por el mismo procedimiento usado para la ebulina I. Se ha certificado que SEA es una proteína tipo RIP que no solo actúa sobre el RNA ribosómico, sino que también ejerce su actividad enzimática sobre el DNA de cultivos celulares COLO 320. El análisis histológico y posterior marcaje por fluorescencia muestra que SEA se une a las células caliciformes del epitelio del intestino delgado en ratones. Estas células están

especializadas en la producción y almacenaje de mucina, cuyas cadenas de oligosacáridos terminan habitualmente en ácido siálico (2,3).

Así mismo, se ha comprobado que existe una variación estacional en la presentación de las isoformas de la ebulina en el *S. ebulus*. La maduración conduce a una reducción significativa de RIPs tipo 2 y de la lectina SELFd. La mayor concentración de ebulina I se encuentra durante los brotes (16 mg/kg) y alcanza el mínimo en hojas senescentes. Además, la polimerización de la ebulina f se produce mayoritariamente en frutos verdes, lo que les confiere una gran toxicidad, la cual desaparece con la maduración al disminuir la concentración de ebulina f. Hay datos de intoxicación por consumo de frutos verdes o poco maduros, papel que puede atribuirse a la ebulina f (1,6,7).

Por otro lado, aún falta conocimiento sobre la función biológica de las RIPs tipo 2 en la naturaleza. Se ha planteado la posibilidad de que, al menos en las hojas, la ebulina pudiese formar parte del sistema defensivo de la planta y constituir un anti-nutriente contra virus, insectos y otros depredadores, en un momento en que las hojas están creciendo y requieren toda su energía para este proceso. Podrían estar implicadas en la inducción de apoptosis ante infecciones virales o en senescencia (1–3,5,6,9).

1.4 TOXICIDAD DE LA EBULINA

Uno de los principales retos de las investigaciones sobre las RIPs tipo 2 del *Sambucus* es descubrir por qué son mucho menos tóxicas que la ricina y otras RIPs tipo 2 en sistemas celulares o animales in vivo, ya que, a nivel ribosómico, muestran similar actividad enzimática.

Estudios previos demostraron que la toxicidad de las RIPs tipo 2 es independiente de su actividad enzimática en los ácidos nucleicos o ribosomas. Se han propuesto distintas hipótesis para explicar estas diferencias, que podrían afectar a la unión, captación, tráfico intracelular y procesamiento de las RIPs (4,10).

Mientras que la ricina tras reconocer residuos de galactosa sigue una ruta que incluye el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso donde las cadenas A y B se disocian y la cadena A activa va al citoplasma para ejercer su posterior acción antirribosómica, las lectinas del *Sambucus* son transportadas desde los endosomas a los lisomas, posteriormente degradadas y sus restos expulsados al exterior celular (Fig. 3). Solo a concentraciones 4 o 5 veces superiores a las de la ricina se acumulan suficientes moléculas en los endosomas para que tenga lugar el transporte no específico de estas moléculas al citosol y la realización de la actividad antirribosómica (1–4,6,11).

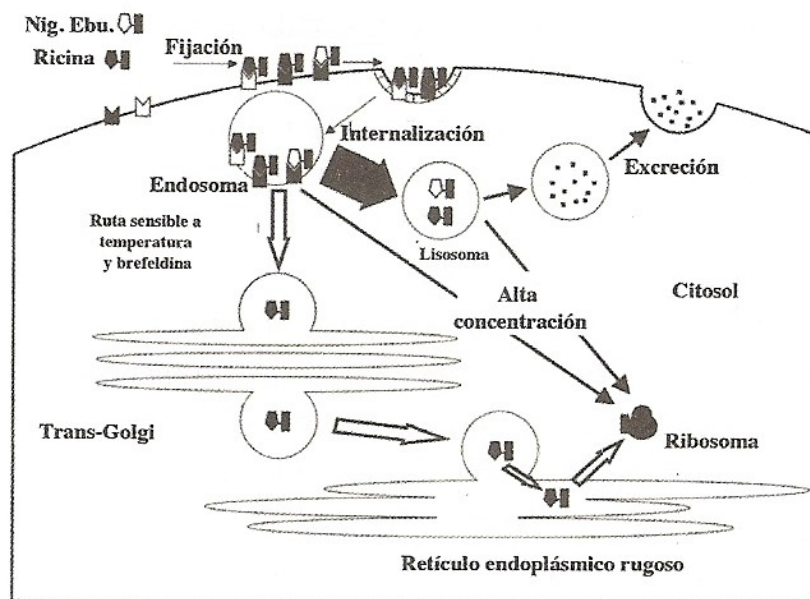


Figura 3. Diferencias en las rutas intracelulares de la ebulina y la ricina que podrían explicar su diferente toxicidad. Obtenido de (1).

Desde otra perspectiva, se han cotejado las estructuras tridimensionales de la ebulina I y la ricina y se ha concluido que a grandes rasgos poseen la misma estructura. La discrepancia más importante se encuentra en los dominios de fijación de azúcar (cadena B). Como expliqué anteriormente, la cadena B de las lectinas antirribosómicas posee dominios específicos de interrelación con el azúcar y es la encargada del tránsito de la lectina a través del citoplasma celular. Se han hallado diferencias en los subdominios de unión de la ricina y la ebulina I (substitución de una tirosina por una fenilalanina en el residuo 248 del subdominio 2γ) dando como resultado una menor afinidad de la ebulina I por galactosa que la ricina. Se cree que esta diferencia en los receptores de unión a azúcares entre la ricina y las proteínas del Sambucus, podría determinar el distinto destino intracelular y posiblemente su citotoxicidad (1–3,6,10).

Por otro lado, se ha descubierto que la ricina es capaz de inhibir a la UPR, proteína encargada de la degradación proteica dependiente de proteasoma, mientras que la ebulina no, lo que significa que es degradada antes de alcanzar los ribosomas (3).

Asimismo, para ejercer su actividad enzimática, la mayor parte de las lectinas tienen que reducirse. Esto nos hace pensar que cuando las RIPS se encuentran en estado nativo, el sitio activo no tiene acceso al lugar de unión en el ribosoma. Es previsible que las RIPS menos tóxicas tengan dificultad para reducir los puentes disulfuro que unen las cadenas. Como última hipótesis, las diferencias de toxicidad podrían explicarse por la existencia de actividad lipasa en las subunidades A-B de la ricina, que favorece que dicha molécula siga la ruta transGolgi, en contraste con las proteínas del Sambucus, que al carecer de dicha actividad siguen una ruta lisosomal (1).

1.5 APLICACIONES FARMACOLÓGICAS: TERAPIA DIRIGIDA. INMUNOTOXINAS Y CONJUGADOS.

Esta menor toxicidad de las RIPS 2 del Sambucus las convierte en perfectas candidatas en la construcción de inmunotoxinas y conjugados dirigidos contra objetivos específicos, impulsando así su utilización en la terapia dirigida. Una inmunotoxina es una molécula artificial que está formada por una toxina, o elemento tóxico, que en nuestro caso sería una lectina antirribosómica, y un anticuerpo, que actúa como elemento conductor y confiere a la inmunotoxina capacidad de dirigir específicamente la toxina a la célula blanco para que ejerza su acción antirribosómica (proyectiles mágicos de Ehrlich)

Los conjugados, por su parte, están formados por una toxina unida a un ligando por fusión genética o ligadura química que actúa como molécula conductora (1,4).

Los trastornos susceptibles de tratamiento con terapia dirigida son aquellos que dependen de células con características o antígenos específicos en su superficie celular. Hasta la fecha se han construido un número variable de inmunotoxinas y conjugados a base de proteínas antirribosómicas y se han llevado a cabo alentadores ensayos clínicos en terapia contra el cáncer, infección por VIH y enfermedades autoinmunes. Entre los más activos se encuentran los dirigidos contra tumores hematológicos, como el mAb anti CD38 acoplado a saporina S6 (RIP tipo 1) diseñado para aplicaciones terapéuticas ex vivo o locorreionales en mieloma y linfoma no Hodking (1,4,12).

La inmunotoxina formada por ebulina I-mAb 44G4 tiene como antígeno específico celular la endoglina (CD105), la cual se expresa mínimamente en tejidos benignos y en mayor medida en las células endoteliales de la neovascularización tumoral. Se ha encontrado también expresión de CD105 en células de otras estirpes tumorales, en especial en melanomas (1,13). La terapia antiangiogénica representa una de las modalidades más prometedoras para el tratamiento del cáncer.

Asimismo, se han construido conjugados formados por lectinas del Sambucus y transferrina humana, cuyo receptor se sobreexpresa en diferentes células cancerosas y en muchos casos se correlaciona con el estadio tumoral. Tras la fijación de la transferrina por su receptor específico, el complejo es internalizado y la toxina lleva a cabo la acción antirribosómica (1, 2, 3).

Esta nueva terapéutica permite reducir la toxicidad sistémica de la quimioterapia tradicional contra el cáncer, pero aún son muchos los obstáculos que hay que superar para el tratamiento exitoso de tumores sólidos debido a la pobre penetración en las masas tumorales, toxicidad y respuesta inmune con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes tanto frente a la parte tóxica como frente al elemento conductor, que podría solucionarse

combinando terapia inmunosupresora. Se ha descrito además la aparición de síndrome de derrame vascular, con destrucción inespecífica de capilares, extravasación de sangre y formación de edema. Hacen falta por tanto futuros trabajos para dilucidar su construcción a gran escala, efectividad in vivo y posterior uso clínico (1–4).

Otra línea de investigación abierta es la posible aplicación de proteínas RIP en la infección por VIH a partir de TAP29, RIP tipo 1 aislada a partir de *Trichosantes Kirilowii*. Esta proteína exhibe similar actividad antiVIH que la tricosantina, pero con mucha menor citotoxicidad, lo que permite ampliar el índice terapéutico en el tratamiento del VIH (14).

El laboratorio de Oncología de Hadassah-Jerusalén ha postulado que el *Sambucus ebulus* estimula el sistema inmunológico y son pioneros en el empleo de sus frutos para tratar pacientes con cáncer y VIH (15).

Por último, un creciente campo de aplicación de las lectinas del *S. ebulus* es la nanofarmacia, que se plantea como posible solución a la toxicidad e inmunogenicidad de las inmunotoxinas y conjugados. Los nanomateriales se han mostrado más estables, solubles y con mejor farmacocinética in vivo, lo que les convierte en excelentes vehículos para la administración de toxinas. Se están realizando estudios para permitir concentraciones efectivas de fármaco en las membranas de las células dianas. En la actualidad están en desarrollo nanocápsulas de quitosano cargadas de prednisona y tratadas con la lectina SELFd del *S. ebulus*. Se ha elegido esta lectina por su mayor resistencia a la digestión por pepsina del fluido gástrico. Posteriormente habrá que comprobar si se alcanza la biodisponibilidad vía oral necesaria para que el fármaco sea efectivo (1,16).

El histórico y extendido empleo de los frutos del saúco y su potencial aplicación terapéutica justifican en nuestra opinión el progreso en el conocimiento de su toxicidad. Por todo ello, proponemos un estudio experimental preliminar que permita valorar las alteraciones histológicas de la ebulina f en ratones viejos, comparando los resultados con los reportados en ratones jóvenes y, valorar así, su seguridad en el consumo y potencial uso farmacológico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los frutos del *Sambucus ebulus* utilizados para este estudio se cosecharon en Barruelo del Valle (Valladolid, España) entre julio y agosto y se almacenaron congelados a -20° C hasta su uso. Se emplearon frutos verdes para extraer la ebulina f, ya que contienen la mayor cantidad de esa proteína como se señaló anteriormente.

Se trituraron los frutos congelados obteniendo una pasta, que se diluyó posteriormente en tampón de extracción (NaCl 280 mM que contiene fosfato de sodio 5 mM, pH 7,5). El extracto se filtró y centrifugó para obtener una solución transparente, que es lo que denominamos extracto crudo. El extracto se sometió a cromatografía de Sepharose 6B tratada con ácido (AT-Sepharose 6B) para obtener las lectinas de unión a D-galactosa que fueron posteriormente liberadas de la resina por un tampón de lactosa 0,2M. Las lectinas se separaron por cromatografía en Superdex 75.

Hemos empleado un total de 6 ratones Swiss hembra: un grupo experimental de 12 meses de edad (n=4) y un grupo control (n=2) de la misma camada. Los ratones se obtuvieron del animalario de la Facultad de Medicina de Valladolid, se alojaron individualmente en jaulas de plástico en una habitación con temperatura controlada. Recibieron alimentación a demanda y acceso libre al agua. La ebulina f disuelta en tampón fosfato salino 0,1 M (PBS) pH 7,4 se administró a una dosis de 4,5 mg/Kg de ebulina en un volumen de 60 µL ajustado a la concentración deseada a los animales experimentales. Se inyectó la misma solución pero sin ebulina f a los animales control. Cuando el animal mostraba claros signos de que iba a tener lugar su muerte y, en cualquier caso antes de las dos semanas después de la administración de la toxina, se procedió a su anestesia con isoflurano para ser sacrificados por decapitación. En todo momento el trato de los ratones en nuestro estudio se realizó de acuerdo con la normativa europea (Directrices del Consejo de Comunidades) sobre la protección de animales de laboratorio y la legislación española al respecto.

Se extrajeron muestras de corazón, intestinos delgado y grueso, pulmón, riñón e hígado. Se fijaron las muestras por inmersión en paraformaldehído al 4% tamponado y se procesaron para su inclusión en parafina y sección a 7 µm de grosor con micrótopo Minot. A continuación se tiñeron con hematoxilina eosina o tricrómico de Masson para ser estudiados por microscopía de luz y detección de apoptosis utilizando el kit TUNEL. Las fotografías fueron hechas con cámara digital Spot en fotomicroscopio Axiophot Zeiss (Alemania), mientras que para las fotografías TUNEL se utilizó un microscopio láser confocal.

3. RESULTADOS

A fin de esclarecer la naturaleza y objetivo del daño producido por la administración intraperitoneal de ebulina f realizamos un análisis histológico de los órganos citados anteriormente en ratonas de 12 meses de edad tratadas y no tratadas.

Aunque hallamos congestión venosa pulmonar tanto en animales control (Fig. 4) como experimentales, esta fue mayor en los últimos. En nuestras muestras experimentales

observamos focos neumónicos en distintas fases: fase inicial, hemorragia en fase de hepatización roja y otros pulmones aparecieron en fase de hepatización gris (Fig. 5). En algunas áreas de condensación advertimos un infiltrado inflamatorio crónico y un aumento del grosor de la pared alveolo-capilar. También observamos la aparición de ciertos núcleos de displasia.

También hemos hallado necrosis centrolobulillar en el hígado de los animales tratados y un aumento del número de apoptosis. Estas apoptosis se localizaban en su mayoría alrededor de la vena central del lobulillo hepático (Figuras 6 y 7).

Las criptas de Lieberkühn del intestino delgado de los animales experimentales presentaban atrofia, restos de apoptosis celulares y pérdida de enterocitos. En la misma línea, pero en mucho menor grado, observamos atrofia de las criptas de Lieberkühn en el intestino grueso de los animales experimentales con disminución en la tasa de renovación celular (Figuras 8 y 9).

Encontramos por otro lado atrofia de algunas fibras musculares cardíacas en los animales experimentales (Fig. 10) llegando, en algún caso, a una extensa pérdida de miocitos cardíacos.

Asimismo, se evidenciaron en el riñón degeneraciones dispersas de las nefronas y necrosis de células tubulares renales. Del mismo modo observamos atrofia de algunos glomérulos renales (Figura 11).

CONTROL

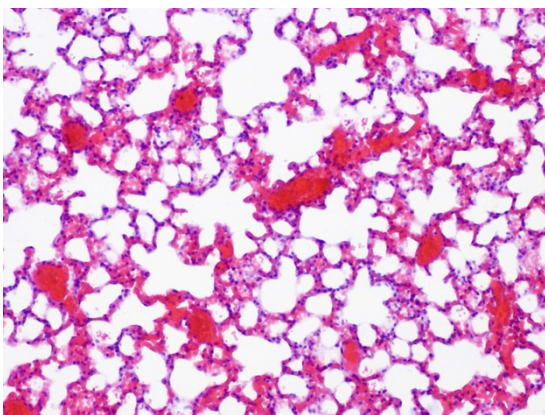


Figura 4. Sección histológica del pulmón de un animal control mostrando una importante congestión venosa y un parénquima pulmonar normal. Hematoxilina y eosina. Objetivo x10.

EXPERIMENTAL

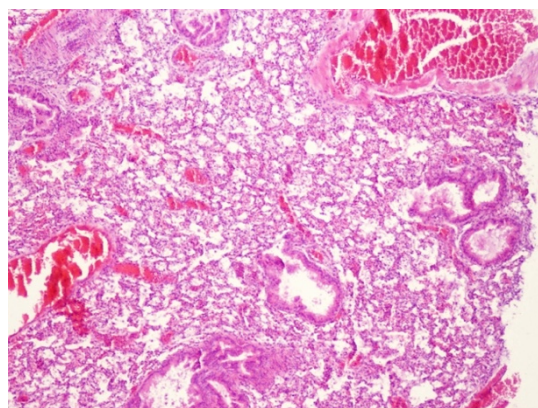


Figura 5. Sección histológica del pulmón de un animal experimental en el que se aprecia una avanzada neumonía. Hematoxilina y eosina. Objetivo x4.

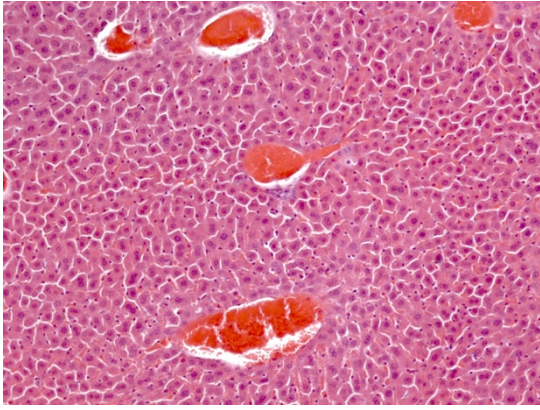


Figura 6. Sección histológica del hígado de un animal control mostrando congestión vascular y un parénquima hepático normal. Hematoxilina y eosina. Objetivo x10.

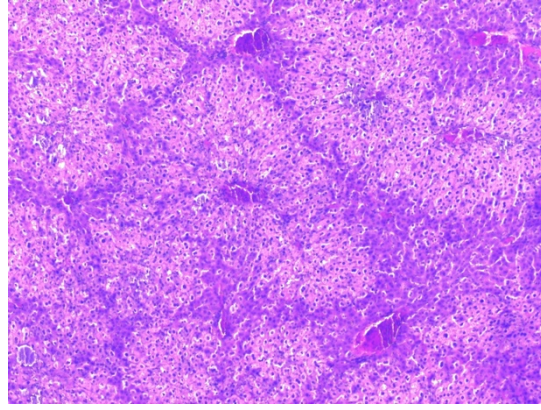


Figura 7. Sección histológica del hígado de un animal experimental. Se aprecia necrosis centrolubulillar, en tanto que los hepatocitos próximos a los espacios portas se encuentran conservados. Hematoxilina y eosina. Objetivo x4.

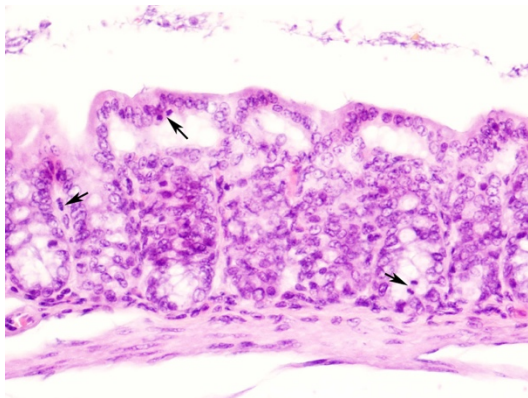


Figura 8. Sección histológica del colon de un animal control mostrando una estructura normal, con abundantes mitosis (flechas). Hematoxilina y eosina. Objetivo x20.

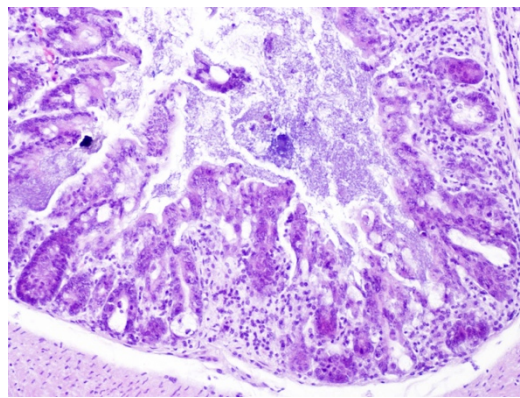


Figura 9. Sección histológica del colon de un animal experimental mostrando degeneración de su estructura con infiltrado inflamatorio en su lámina propia. Hematoxilina y eosina. Objetivo x10.

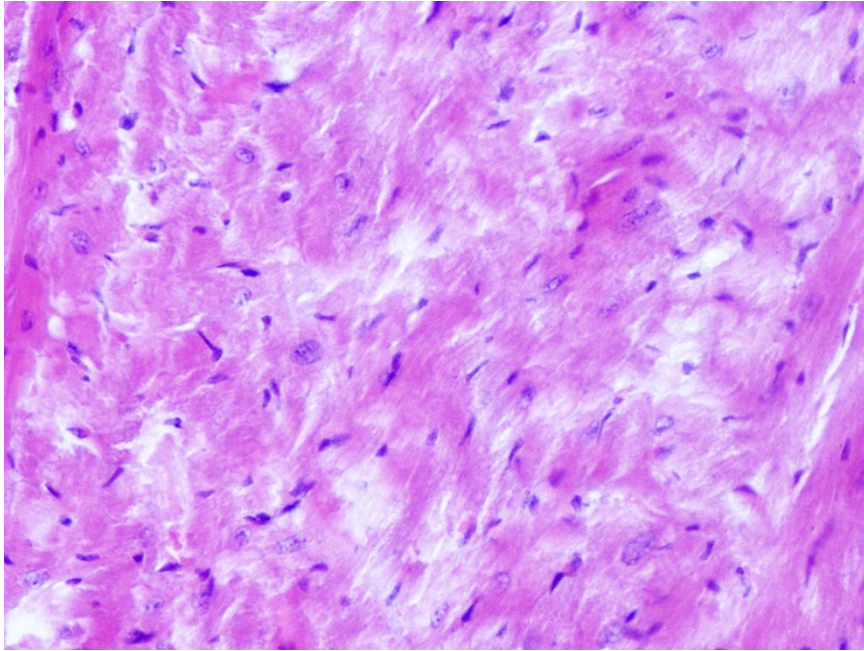


Figura 10. Sección histológica del miocardio de un animal experimental mostrando atrofia y degeneración de los cardiomiocitos, con pérdida de su estriación y alineamiento. Hematoxilina y eosina. Objetivo x20.

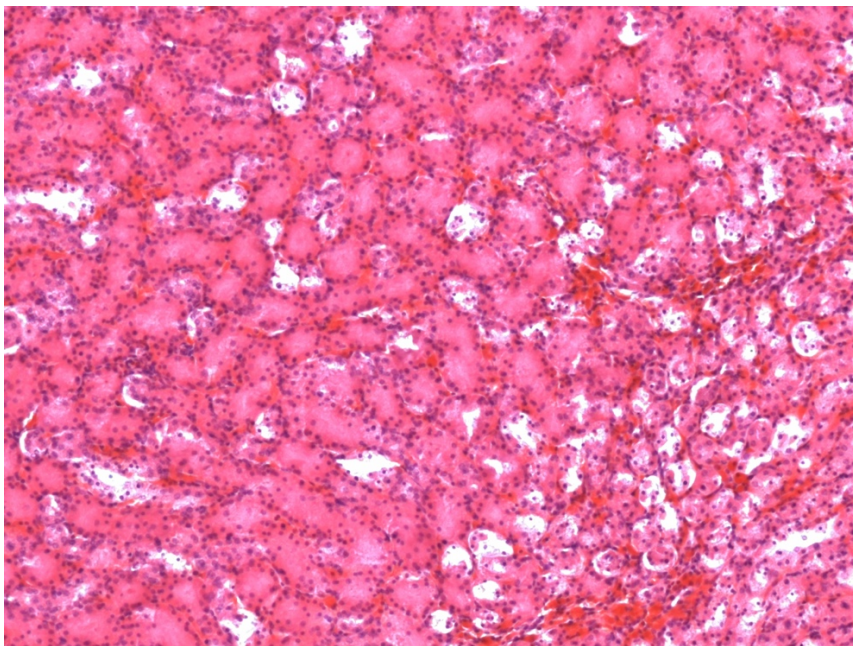


Figura 11. Sección histológica del riñón de un animal experimental mostrando dispersa degeneración de diferentes nefronas. Hematoxilina y eosina. Objetivo x10.

4. DISCUSIÓN

La toxicidad de la ebulina f i.p. se estudió por primera vez en ratones de 6 semanas revelando que el intestino delgado era su principal diana. La estructura general de la pared intestinal se veía alterada. Las criptas aparecían atrofiadas, con evidencia de restos apoptóticos, y pérdida de su característica estructura tubular y organización axial. Se observó alteración en la migración y diferenciación normal de las células amplificadoras de tránsito (TACcells) desde las criptas a la base de las vellosidades, lo que sugiere una acción específica de la ebulina f sobre estas células, provocando la degeneración de las vellosidades. El intestino grueso también apareció dañado, aunque con menor intensidad que el intestino delgado, con un número variable de células apoptóticas y acúmulo de moco en el interior de las criptas. Se estimó una DL_{50} de 5 mg/kg de peso para la administración oral y nasal en contraste con la DL_{50} de 2,8 mg/kg de peso para la administración i.p. (17).

La alta tasa de recambio de las células del epitelio gastrointestinal (GI) y el mantenimiento del equilibrio en las apoptosis permiten asegurar el correcto funcionamiento del sistema. En el curso del envejecimiento aparecen cambios funcionales y estructurales en órganos vitales en los que la regulación por apoptosis desempeña un papel fundamental. En trabajos previos se ha documentado que el intestino delgado envejecido muestra mayor tasa de hiperproliferación y apoptosis y una disminución del área de superficie de intestino delgado por la degeneración de vellosidades. Asociado a esto se han observado cambios en la absorción de nutrientes como glucosa, vitaminas, calcio, Mg, Zn y Cu, lo que podría implicar cambios en la absorción de fármacos de baja permeabilidad en las diferentes regiones del tracto GI.

Nuestros resultados, apoyando los hallazgos de estudios previos, sugieren que la ebulina f promovió apoptosis en intestinos, lo que, junto a la mayor tasa de apoptosis dependiente de la edad, podría suponer una mayor toxicidad de la lectina y por ende mayor letalidad en ratones viejos.

En ratones jóvenes no se han descrito focos neumónicos incluso a dosis más altas (5 mg/kg) tras la administración de ebulina f i.p., en las que solo se observó congestión focal en los pulmones (17). Para explicar esta diferencia, se ha propuesto una menor resistencia de los pulmones a las amenazas en animales viejos.

También hemos observado la aparición de núcleos atípicos con displasia en el parénquima pulmonar tras la administración de ebulina f y aunque no se han visto cambios proliferativos, este hallazgo puede generar inquietud por el posible efecto mutagénico de la ebulina f.

Se ha postulado un doble mecanismo para la producción de hepatotoxicidad de la ebulina f. Por un lado, causaría daño directo por absorción a través de los receptores de

glicoproteínas con residuos terminales de galactosa presentes en la superficie del hepatocito. Por otro lado, y ya que el patrón de lesiones observadas en el hígado adquiere una distribución centrolobulillar, se ha sugerido que un trastorno de la circulación puede ser un factor determinante en la patogénesis. La atrofia de fibras cardíacas y pérdida de cardiomiocitos que hemos observado, podría causar insuficiencia cardíaca congestiva que conduce a la pérdida de las células cercanas a la vena central, apareciendo conservados los hepatocitos próximos a los espacios porta, que reciben irrigación tanto de la vena porta como de la arteria hepática (18,19).

Tanto los animales de control como experimentales han mostrado atrofia de algunos glomérulos renales y degeneración de los túbulos contorneados proximales. Estos cambios son atribuibles principalmente a la edad avanzada. Sin embargo, también observamos necrosis dispersa de nefronas, hecho que pudiera fundamentarse en virtud del pequeño tamaño molecular de la ebulina que le permite ser filtrada a través del glomérulo renal y probablemente reabsorbida por las células de los túbulos contorneados proximales, conduciendo así a la necrosis de las células tubulares. También se ha descrito que la necrosis de los túbulos contorneados ocurre después de la administración de dosis letales de otras RIPs (9,18).

Este trabajo experimental, en la línea de estudios previos, ha permitido dilucidar que la ebulina puede causar importantes efectos histotóxicos en el organismo y que los ratones viejos son más sensibles a la administración de ebulina que los ratones jóvenes.

El hecho de la menor toxicidad de la ebulina con respecto a otras RIPs más tóxicas unido a su capacidad de unión selectiva a azúcares como la D-galactosa le hace idónea como agente terapéutico para la destrucción de células de manera dirigida a dianas específicas como puede ser en el cáncer, sida o enfermedades autoinmunes.

Así, se podría conjugar a la ebulina con un quimioterápico o bien con otra proteína con capacidad de unirse de manera selectiva, como son los anticuerpos y llevar a cabo así una terapia dirigida. Ello incrementaría la efectividad del fármaco, al aumentar la concentración en la diana correspondiente, dañando principalmente las células afectadas, mientras que las normales se verían menos afectadas a la vez que se disminuyen considerablemente los efectos secundarios al poder emplearse menos dosis.

La construcción de una inmunotoxina que ligue la ebulina a un anticuerpo que permita conducirla selectivamente contra las células tumorales viene apoyada por estudios previos con la nigrina b, RIP extraída de la corteza del saúco común o negro (*Sambucus nigra*) (13), que conjugada con el anticuerpo anti-endoglina MJ7/18 se ha visto efectiva frente a células de melanoma (13,20). La endoglina (CD-105), expresada en las células de melanoma, es

reconocida por el anticuerpo unido a la RIP y se internaliza la inmunotoxina y, siguiendo la ruta retrógrada del aparato de Golgi llega hasta el retículo endoplásmico rugoso, donde bloquea la síntesis proteica, conduciendo a la muerte celular. Además, al efecto directo que causaría la ebulina promoviendo la aparición de apoptosis, se sumaría un efecto antiangiogénico en el tumor ya que la neovasculatura tumoral sobreexpresa endoglin, por lo que la inmunotoxina también actuaría sobre estos vasos atacando al tumor por la destrucción de sus vasos neoformados.

Otra posible línea de trabajo sería la de provocar la inhibición de los lisosomas selectivamente en las células tumorales. De esta forma y debido a la ruta lisosomal que sigue la ebulina como expliqué anteriormente, lograríamos anular los lisosomas de las células tumorales, haciéndolas susceptibles a la acción de las RIPs, reduciendo la toxicidad sistémica. La cloroquina y el ácido fusídico han mostrado capacidad para modificar el pH de los lisosomas, inactivando la acción de sus enzimas (21).

5. CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de ebulina f en ratones viejos produce alteraciones histológicas a distintos niveles, no únicamente en intestino delgado y grueso como se había reportado en ratones jóvenes. Hemos observado además alteraciones histológicas en hígado, pulmones, riñones y corazón. Por ello podemos concluir que la ebulina es especialmente tóxica para animales viejos y además potencia la apoptosis ya incrementada de forma fisiológica en el envejecimiento.
2. Las alteraciones histológicas halladas se traducen en cambios estructurales y funcionales de órganos vitales que comprometen la supervivencia de los animales. Estos hallazgos nos hacen considerar la necesidad, en caso del consumo de partes del saúco, de emplear procedimientos para reducir la toxicidad de la ebulina, como podría ser hervir la solución para inactivar la ebulina y hacerla sensible a la pepsina gástrica. A pesar de esto, concluimos que la ebulina es mucho menos tóxica que las RIPs tipo 2 tóxicas.
3. La ebulina constituye una perfecta aspirante para la construcción de inmunotoxinas y conjugados con moléculas que permitan direccionarla a dianas terapéuticas concretas para ejercer su acción tóxica específicamente en células tumorales, sida u otras patologías.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Girbés Juan T. **Aspectos nutricionales, farmacológicos y toxicológicos del género Sambucus**. Discurso de ingreso como académico de número. Academia de Farmacia de Castilla y León. 27 de septiembre de 2019.
2. Tejero J, Jiménez P, Quinto EJ, Cordoba-Diaz D, Garrosa M, Cordoba-Diaz M, et al. **Elderberries: a source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity**. *Molecules*. 30 de enero de 2015;20(2):2364-87.
3. Jiménez P, Tejero J, Cordoba-Diaz D, Quinto EJ, Garrosa M, Gayoso MJ, et al. **Ebulin from dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.): a mini-review**. *Toxins (Basel)*. 25 de febrero de 2015;7(3):648-58.
4. Ferreras JM, Citores L, Iglesias R, Jiménez P, Girbés T. **Use of Ribosome-Inactivating Proteins from *Sambucus* for the Construction of Immunotoxins and Conjugates for Cancer Therapy**. *Toxins (Basel)*. 29 de abril de 2011;3(5):420-41.
5. Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F. **Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria**. *Mini Rev Med Chem*. junio de 2004;4(5):461-76.
6. Girbés T, Citores L, Iglesias R, Ferreras JM, Muñoz R, Rojo MA, et al. **Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves**. *J Biol Chem*. 25 de agosto de 1993;268(24):18195-9.
7. Barbieri L, Ciani M, Girbés T, Liu W, Damme EJMV, Peumans WJ, et al. **Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins**. *FEBS Letters*. 2004;563(1-3):219-22.
8. Jimenez P, Cabrero P, Basterrechea JE, Tejero J, Cordoba-Diaz D, Girbes T. **Isolation and molecular characterization of two lectins from dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) blossoms related to the Sam n1 allergen**. *Toxins (Basel)*. 14 de octubre de 2013;5(10):1767-79.
9. Stirpe F, Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Bolognesi A, Polito L. **Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves**. *FEBS Letters*. 1996;382(3):309-12.
10. Shang C, Chen Q, Dell A, Haslam SM, De Vos WH, Van Damme EJM. **The Cytotoxicity of Elderberry Ribosome-Inactivating Proteins Is Not Solely Determined by Their Protein Translation Inhibition Activity**. *PLoS One* [Internet]. 6 de julio de 2015 [citado 13 de abril de 2020];10(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4493096/>

11. Spooner RA, Lord JM. **Ricin Trafficking in Cells.** *Toxins* (Basel). 9 de enero de 2015;7(1):49-65.
12. Bolognesi A, Polito L, Farini V, Bortolotti M, Tazzari PL, Ratta M, et al. **CD38 as a target of IB4 mAb carrying saporin-S6: design of an immunotoxin for ex vivo depletion of hematological CD38+ neoplasia.** *J Biol Regul Homeost Agents.* diciembre de 2005;19(3-4):145-52.
13. Muñoz R, Arias Y, Ferreras JM, Jiménez P, Langa C, Rojo MA, et al. **In vitro and in vivo effects of an anti-mouse endoglin (CD105)-immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumours.** *Cancer Immunol Immunother.* marzo de 2013;62(3):541-51.
14. Lee-Huang S, Huang PL, Kung HF, Li BQ, Huang PL, Huang P, et al. **TAP 29: an anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 de agosto de 1991;88(15):6570
15. Porter RS, Bode RF. **A Review of the Antiviral Properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) Products.** *Phytother Res.* abril de 2017;31(4):533-54.
16. Pizzo E, Di Maro A. **A new age for biomedical applications of Ribosome Inactivating Proteins (RIPs): from bioconjugate to nanoconstructs.** *J Biomed Sci* [Internet]. 20 de julio de 2016 [citado 9 de abril de 2020];23.
17. Jiménez P, Gayoso M, Tejero J, Cabrero P, Córdoba-Díaz D, Basterrechea JE, et al. **Toxicity in mice of lectin ebulin f present in dwarf Elderberry (*Sambucus ebulus* L.).** *Toxicon.* enero de 2013;61:26-9.
18. Battelli MG, Buonamici L, Polito L, Bolognesi A, Stirpe F. **Hepatotoxicity of ricin, saporin or a saporin immunotoxin: xanthine oxidase activity in rat liver and blood serum.** *Virchows Arch.* febrero de 1996;427(5):529-35.
19. Battelli MG, Barbieri L, Stirpe F. **Toxicity of, and histological lesions caused by, ribosome-inactivating proteins, their IgG-conjugates, and their homopolymers.** *APMIS.* julio de 1990;98(7):585-93.
20. Cheung MC, Revers L, Perampalam S, Wei X, Kiarash R, Green DE, et al. **An evolved ribosome-inactivating protein targets and kills human melanoma cells in vitro and in vivo.** *Mol Cancer.* 3 de febrero de 2010;9:28.
21. Moriyama Y, Nelson N. **Inhibition of vacuolar H⁺-ATPases by fusidic acid and suramin.** *FEBS Lett.* 18 de julio de 1988;234(2):383-6.

Alteraciones histológicas de la administración intraperitoneal de ebulina en ratones viejos

Paula Vicente Pardo

INTRODUCCIÓN

La ebulina es una proteína inactivadora de ribosomas (RIPs) tipo 2 aislada del saúco menor (Fig. 1). Su interés radica en su posible empleo en la terapia contra el cáncer y otras enfermedades, haciendo necesario conocer su toxicidad y determinar sus posibles dosis terapéuticas. En el género *Sambucus*, se ha estudiado la toxicidad de la nigrina b y la ebulina f en ratones jóvenes. En el presente trabajo nos planteamos estudiar la toxicidad de la ebulina f en ratones viejos para conocer sus efectos en la edad avanzada y determinar si existen diferencias con respecto a los jóvenes, dadas las peculiaridades presentes en el anciano, población en la que el cáncer es más prevalente

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 6 ratones Swiss hembra de 12 meses de edad. A 4 de ellos se les inyectaron, vía i.p., 4,5 mg/Kg de ebulina f y a los dos restantes PBS como controles. Se siguió la normativa legal para el manejo de animales de laboratorio. Tras anestesia del animal, se sacrificaron por decapitación y se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% muestras de intestino delgado, intestino grueso, hígado, corazón, riñón y pulmón para su estudio histológico mediante hematoxilina y eosina y tricómico de Masson en secciones en parafina.

RESULTADOS

Hemos hallado atrofia de las criptas de Lieberkühn en ambos intestinos, con apoptosis celulares y pérdida de enterocitos (Fig. 2) y atrofia de vellosidades en intestino delgado. A su vez observamos necrosis centrolobulillar a nivel hepático (Fig. 3) y pérdida de miocitos cardíacos (Fig. 4). El riñón mostró necrosis de células tubulares y degeneración de nefronas (Fig. 5). En pulmón se observó neumonía (Fig. 6), así como algunos núcleos displásicos y, en comparación con los animales control, una mayor congestión venosa.

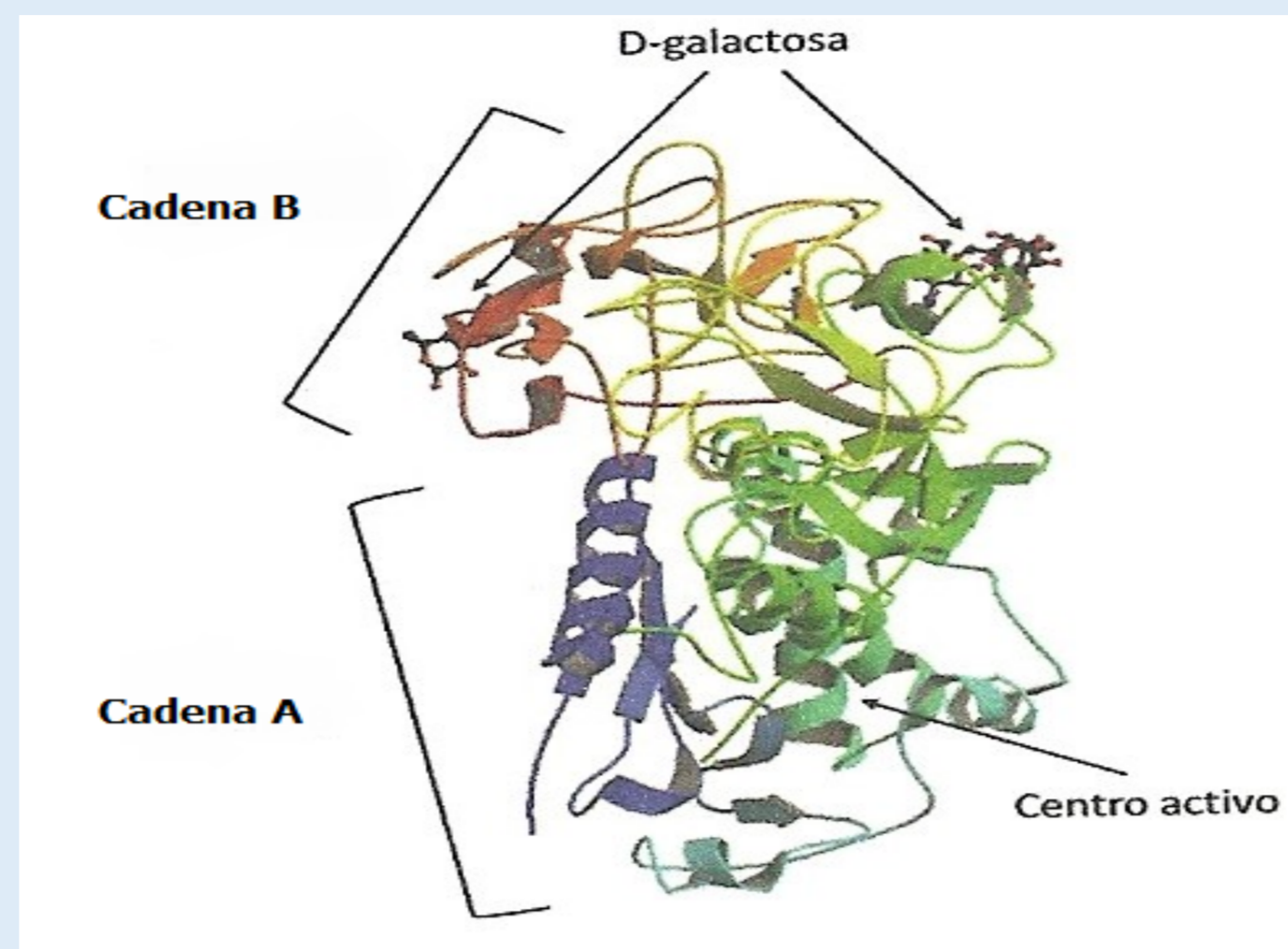


Fig. 1. Estructura tridimensional de la ebulina mediante difracción de rayos X.

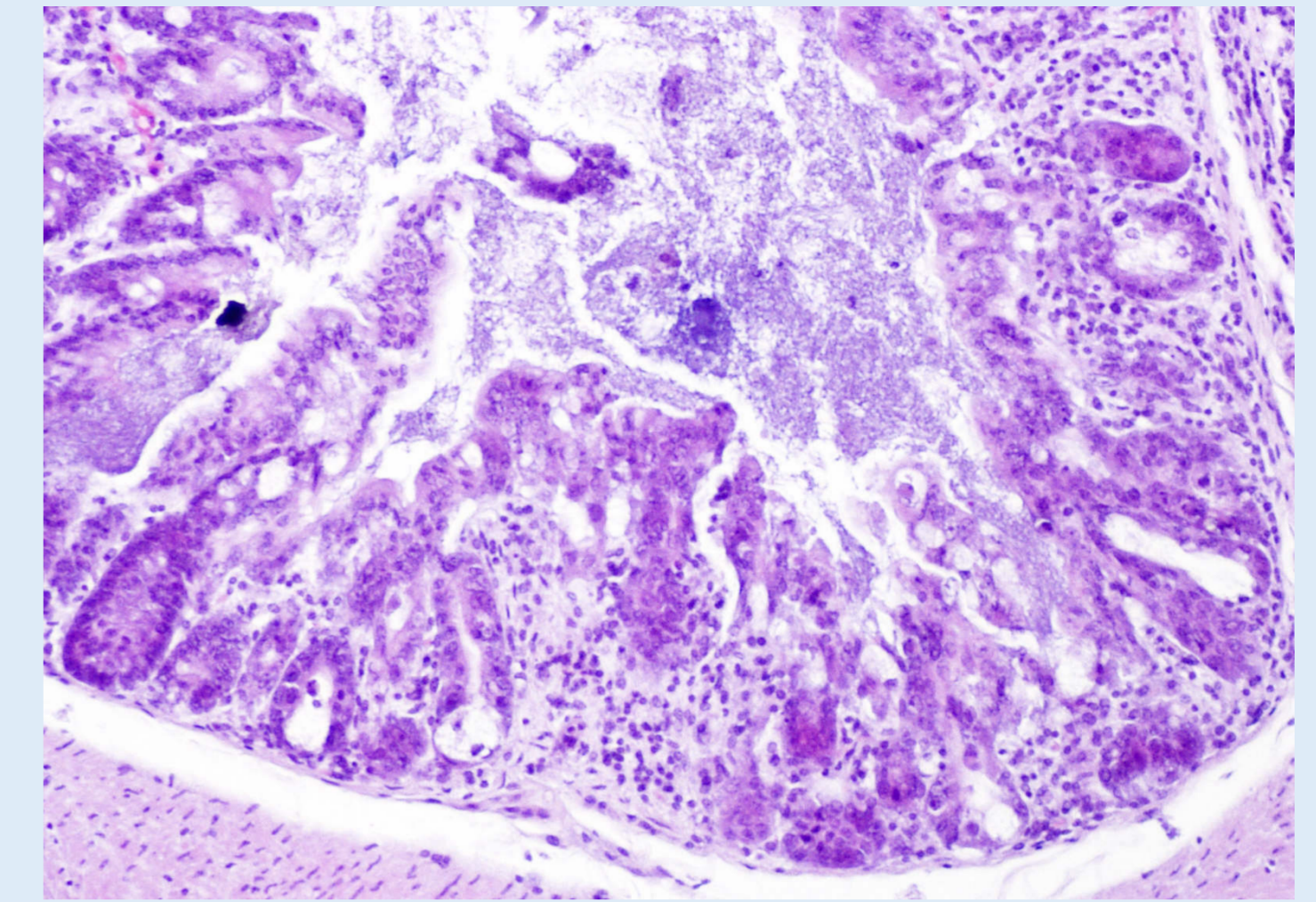


Fig. 2. Intestino grueso: degeneración de su estructura con infiltrado inflamatorio en su lámina propia. HyE. Objetivo x10

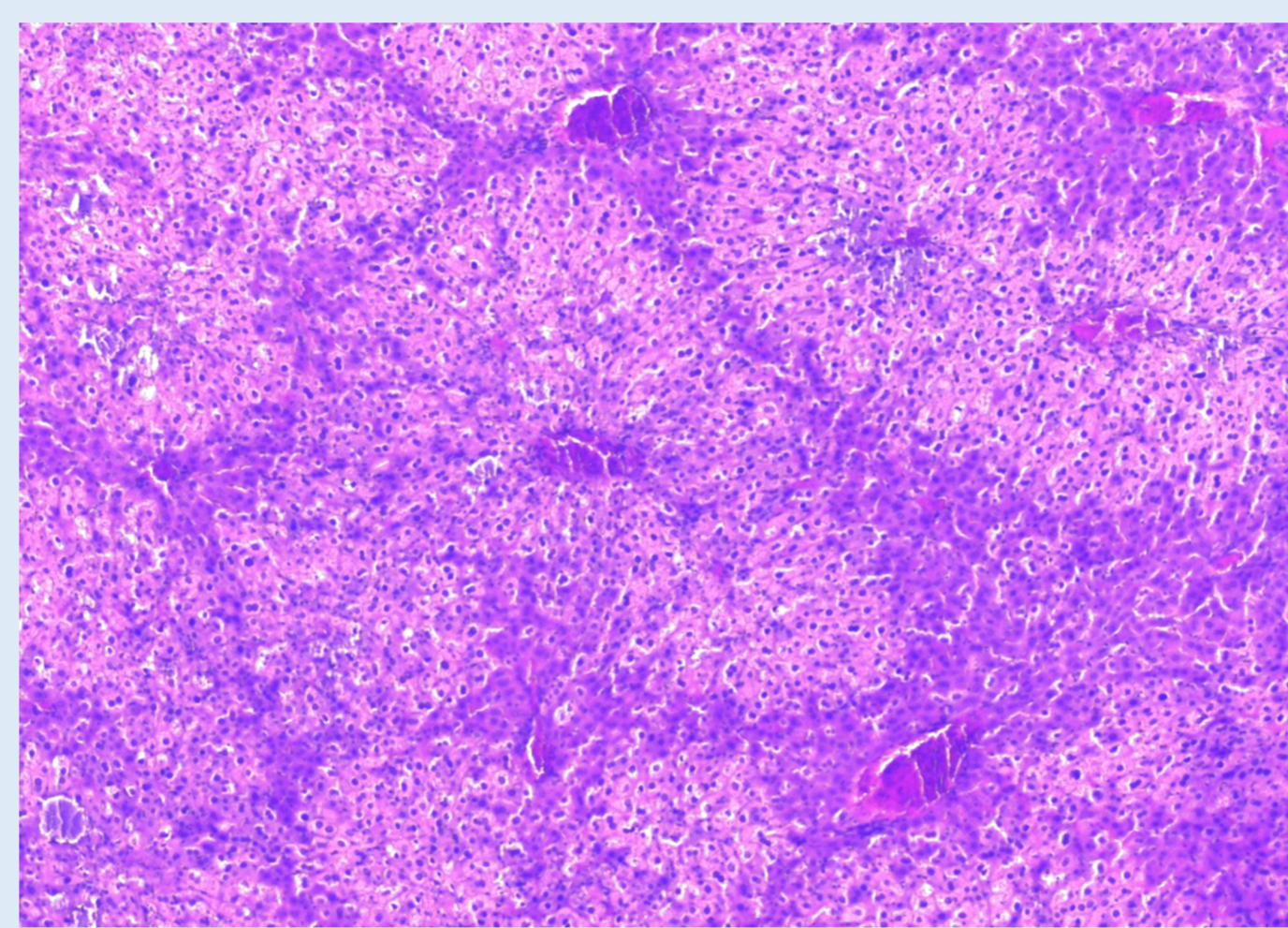


Fig. 3. Hígado: Necrosis centrolobulillar. Los hepatocitos próximos a los espacios portas se encuentran conservados. HyE. Objetivo x4

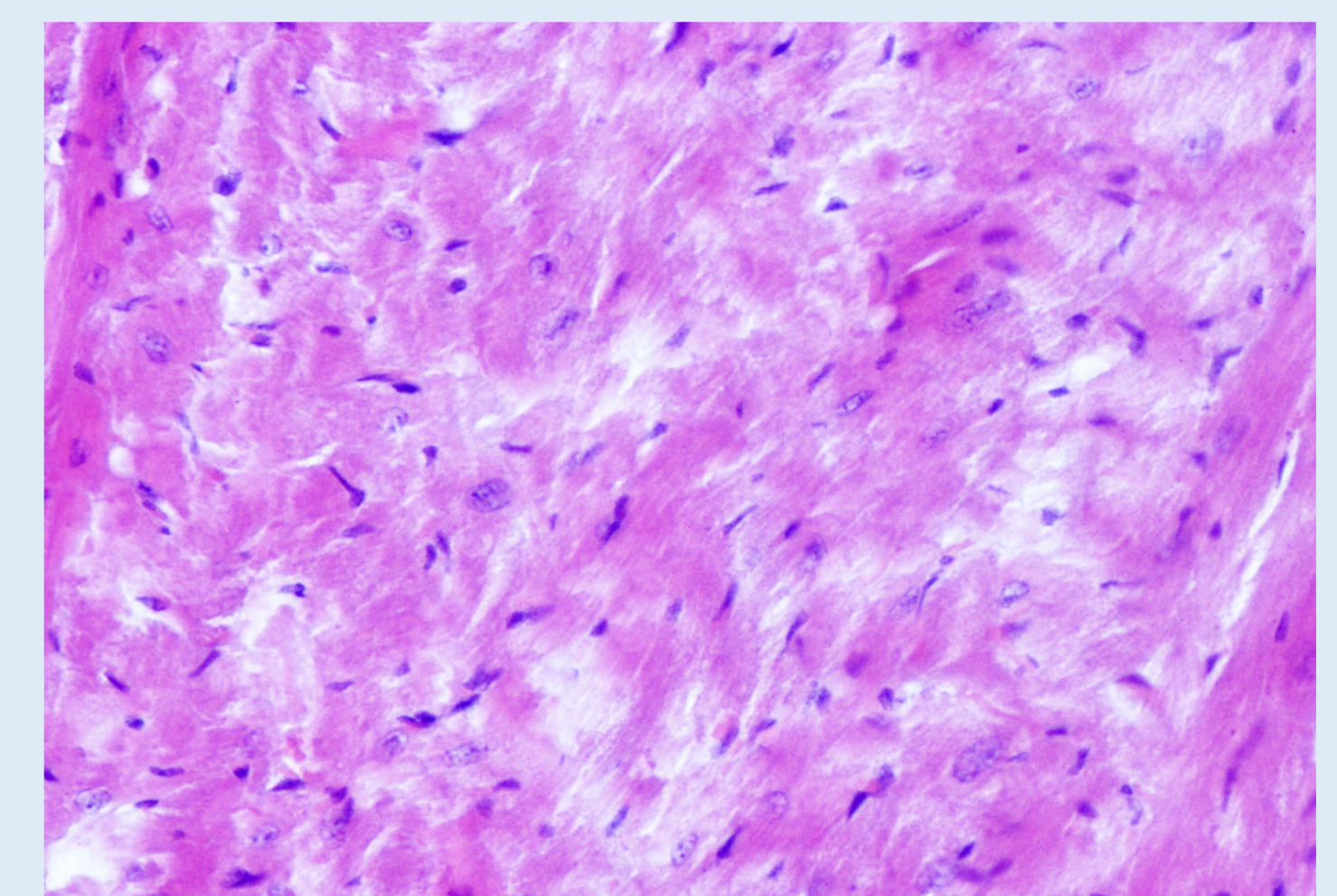


Fig. 4. Corazón: degeneración de los cardiomiocitos. HyE. Objetivo x20.

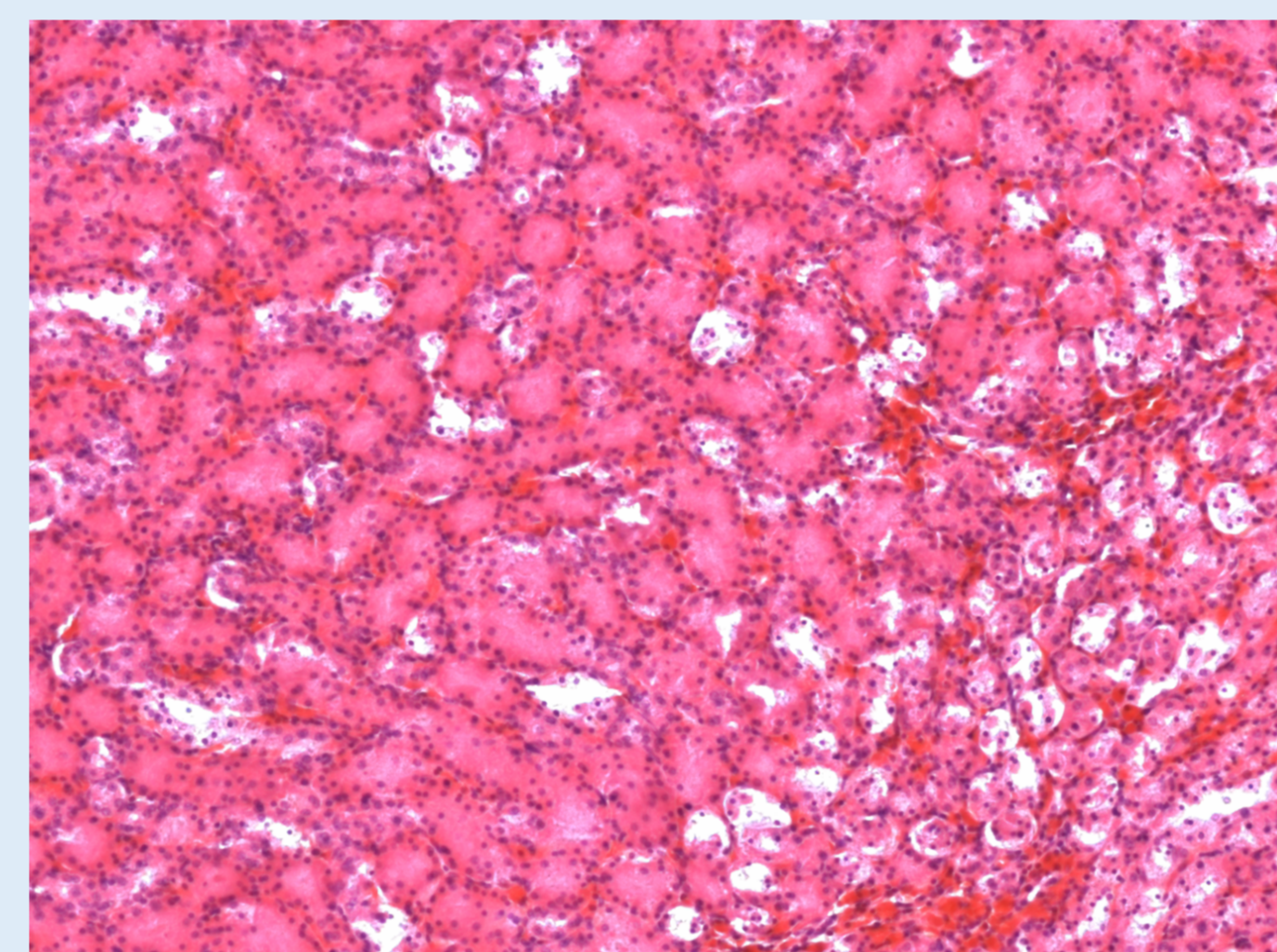


Fig. 5. Riñón: Degeneración dispersa de nefronas. HyE x10

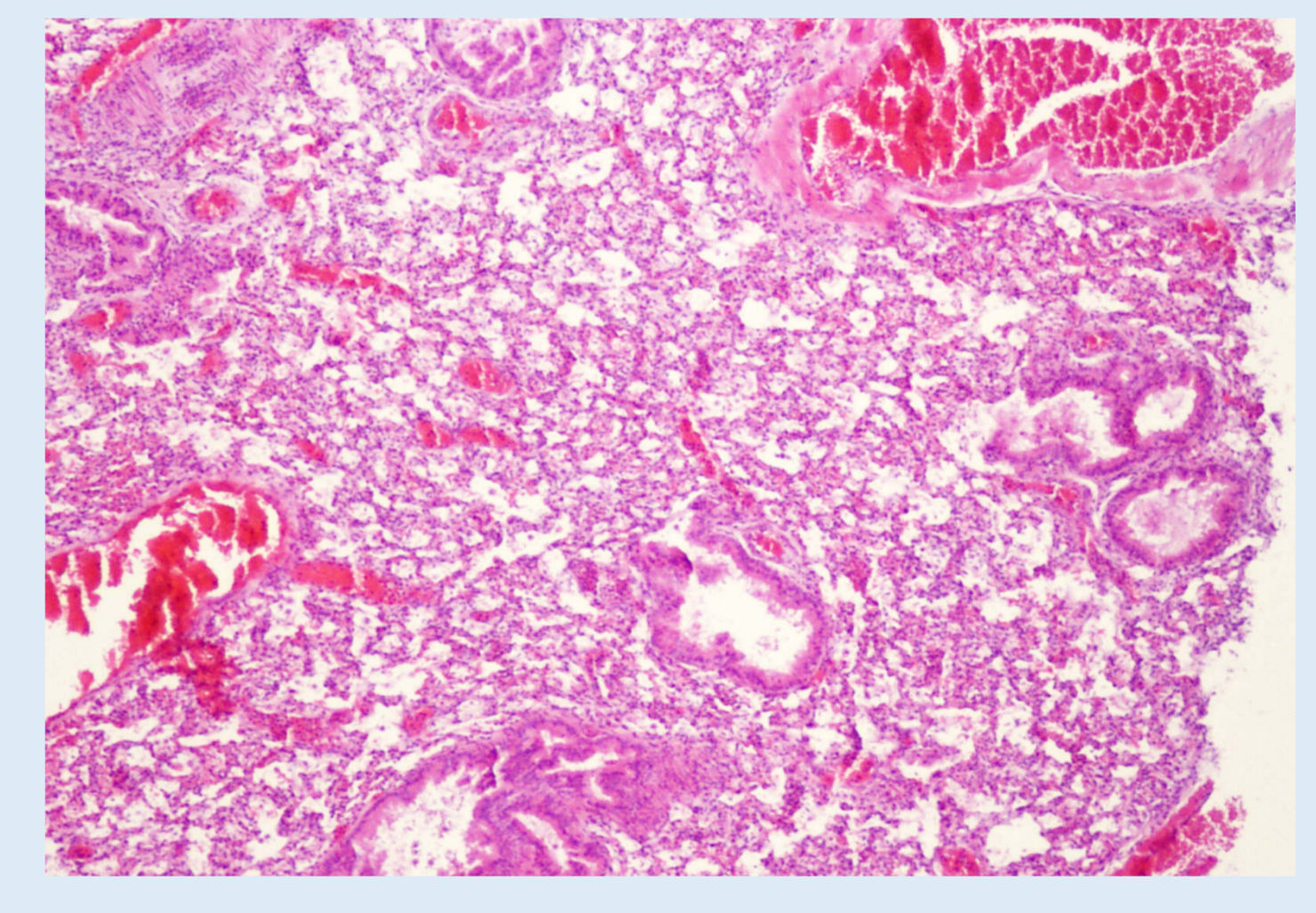


Fig. 6. Pulmón: Neumonía avanzada. HyE. Objetivo x4.

CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de ebulina f en ratones viejos produce mayores alteraciones que en jóvenes en distintos órganos. Por ello podemos concluir que la ebulina es especialmente tóxica para animales viejos.
2. Las alteraciones histológicas causadas por la ebulina producen cambios estructurales y funcionales que comprometen la supervivencia de los animales. A pesar de esto, concluimos que la ebulina es mucho menos tóxica que las RIPs tipo 2 tóxicas.
3. La ebulina constituye una perfecta aspirante para la construcción de inmunotoxinas y conjugados para ejercer su acción tóxica en dianas terapéuticas específicas como en células tumorales, sida u otras patologías.

BIBLIOGRAFÍA

- Tejero J, Jiménez P, Quinto EJ, Cordoba-Diaz D, Garrosa M, Cordoba-Diaz M, et al. **Elderberries: a source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity.** *Molecules.* 30 de enero de 2015;20(2):2364-87.
- Jiménez P, Tejero J, Cordoba-Diaz D, Quinto EJ, Garrosa M, Gayoso MJ, et al. **Ebulin from dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.): a mini-review.** *Toxins (Basel).* 25 de febrero de 2015;7(3):648-58.
- Jiménez P, Gayoso M, Tejero J, Cabrero P, Córdoba-Díaz D, Basterrechea JE, et al. **Toxicity in mice of lectin ebulin f present in dwarf Elderberry (*Sambucus ebulus* L.).** *Toxicon.* enero de 2013;61:26-9.