



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y
FARMACOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

*EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE NIGRINA B
SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE VITAMINA B₆ EN RATONES*

Presentada por **Mónica Aracil Fernández** para optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Pilar Jiménez López y Damián Córdoba Díaz

2012



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y
FARMACOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

*EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE NIGRINA B
SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE VITAMINA B₆ EN RATONES*

Presentada por **Mónica Aracil Fernández** para optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Pilar Jiménez López y Damián Córdoba Díaz

2012

Dña. Pilar Jiménez López, Profesor Contratado Doctor de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y D. Damián Córdoba Díaz, Profesor Ayudante Doctor de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, directores de esta Tesis Doctoral, certifican que el trabajo realizado por Dña. Mónica Aracil Fernández puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 21 de Agosto de 2012

Fdo.: Pilar Jiménez López

Fdo.: Damián Córdoba Díaz

Agradecimientos

- Deseo expresar mi agradecimiento a mis directores la Dra. Dña. Pilar Jiménez López y el Dr. D. Damián Córdoba Díaz, así como mi gratitud al Dr. D. Tomás Girbés Juan por sus consejos, orientaciones y estímulo en la realización de esta Tesis.

- Deseo además expresar mi agradecimiento al Dr. D. Manuel José Gayoso Rodríguez, como Director del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología de la Universidad de Valladolid por su ayuda y colaboración y al Dr. D. Juan José Torrado Durán, como Director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid.

- También quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio del Dr. Girbés, Patricia, Jesús y Joseba su ayuda y amistad y a mis compañeros del laboratorio del Dr. Córdoba, Ana, Sara, y Daniel.

- Finalmente, agradezco a D. Luis Santiago Bucero por su ayuda en la realización de los estudios histológicos.

Trabajos en preparación

Damián Córdoba-Díaz, Pilar Jiménez, Mónica Aracil, Tomás Girbés.
HPLC procedure for the analysis of vitamin B₆ in plasma samples.
Journal of Food and Drug Analysis, (2012)

Damián Córdoba-Díaz, Pilar Jiménez, Manuel Córdoba-Díaz, Mónica Aracil, Patricia Cabrero, Jesús Tejero, Manuel José Gayoso, Tomás Girbés.
Vitamin B₆ absorption by mice treated with the anti-ribosomal lectin nigrin b from elderberry bark.
Nutrition Journal, (2012).

Comunicaciones a congresos

Patricia Cabrero, Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Manuel J. Gayoso, D. Córdoba-Díaz, M. Aracil and Tomás Girbés.
Mouse model for the study of the intestinal regeneration.
VI Congress of the Federation of Spanish Biotechnologists.
Madrid, 18-20 Julio 2012.

El trabajo realizado ha sido financiado por los siguientes proyectos:

Grupo de excelencia GR106; Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León; Investigador Principal: Tomas Girbés; Título: "Nigrina b e inmunotoxinas antitumorales: actividad sobre el desarrollo de los adenomas intestinales en los ratones APCMin". Periodo: 2008-2010

Grupo de Investigación reconocido GIR "Inmunotoxinas antitumorales"
Organismo financiador: Universidad de Valladolid; Investigador Principal: Tomas Girbés; Periodo: 2009-2012

Organismo financiador: Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León; Investigador Principal: Tomas Girbés; Título: "Investigación de las inmunotoxinas para la terapia del cáncer"; Periodo: 2009-2012

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	<u>Página</u>
Figura 1.1. Esquema de la superficie de absorción intestinal.	5
Figura 1.2. Detalles de <i>Sambucus nigra L.</i>	24
Figura 1.3. Estructura primaria de la cadena A de nigrina b deducida de la correspondiente secuencia de genes en comparación con las determinadas para ebulina I y ricina.	30
Figura 1.4. Estructura primaria de la cadena B de nigrina, ebulina I y ricina.	31
Figura 1.5. Estructura tridimensional de la ebulina I determinada por difracción de rayos X.	32
Figura 1.6. Detalle de la secuencia de aminoácidos y la conformación espacial del subdominio 2 γ de ricina y de nigrina o ebulina.	33
Figura 1.7. Rutas intracelulares seguidas por ebulina-nigrina y ricina.	35
Figura 1.8. Secuencia de nucleótidos del bucle del rARN responsable de la interacción del factor de elongación 2.	37

Figura 1.9. Elongación en la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos: etapa afectada por la acción catalítica de las proteínas inactivadoras de ribosomas nigrina, ebulina y ricina.	39
Figura 1.10. Secuencias homólogas pertenecientes a ribosomas sensibles a la acción de las RIPs.	40
Figura 1.11. Vitámeros de la vitamina B ₆ , metabolito principal de la vitamina B ₆ y forma en la que se encuentra dicha vitamina en las plantas.	42
Figura 1.12. Esquema de la absorción y distribución de las diferentes isoformas de la vitamina B ₆	46
Figura 3.1. Corte de corteza secundaria de <i>S. nigra</i> utilizada para la obtención de nigrina b.	57
Figura 3.2. Detalle del sistema eletroforético empleado	64
Figura 3.3. Equipo de histología utilizado del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología.	65
Figura 3.4. Esquema del sistema modular cromatográfico utilizado .	69
Figura 4.1. Detalle del proceso de extracción sobre la corteza de <i>S. nigra</i> para la obtención de nigrina b.	72

Figura 4.2. Aspecto que ofrece el material centrifugado a partir del extracto crudo de corteza de <i>S. nigra</i> utilizada para la obtención de nigrina b.	73
Figura 4.3. Columna GE-Pharmacia KX50 (5 x 15 cm) con camisa de refrigeración rellena con AT-Sepharose 6B.	73
Figura 4.4. Cromatografía de los extractos crudos de <i>S. nigra</i> L. clarificados por centrifugación y filtrado.	76
Figura 4.5. Electroforesis de las lectinas de las corteza de <i>S. nigra</i> en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.	78
Figura 4.6. Hemaglutinación de células rojas de sangre humana O ⁺ ..	80
Figura 4.7. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre el intestino.	83
Figura 4.8. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre los villi.	84
Figura 4.9. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre el intestino grueso.	84

Figura 4.10. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 48 h sobre el intestino.	85
Figura 4.11. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 48 h sobre el intestino grueso.	86
Figura 4.12. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 72 h sobre el intestino delgado.	87
Figura 4.13. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 72 h sobre el intestino grueso.	88
Figura 4.14. Evolución del peso de los animales ensayados a lo largo del tiempo tras la administración intraperitoneal de dosis subletales de nigrina b.	89
Figura 4.15. Aspecto de las diferentes partes del intestino evaluadas en los dos últimos animales de cada grupo.	93
Figura 4.16. Recta de calibrado del colorante azul de Evans en dimetil formamida (DMF).	94

Figura 4.17. Absorbancias de azul de Evans en DMF a la longitud de máxima absorción obtenidas en el aparato digestivo de ratones tratados con dosis IP subletales (10 mg/kg) de nigrina b.	95
Figura 4.18. Barrido espectrofotométrico del estándar de piridoxina hidroclorehidrato.	98
Figura 4.19. Estándar de vitamina B ₆ en condiciones isocráticas de flujo de fase móvil.	99
Figura 4.20. Cromatograma correspondiente a la muestra 2 del estudio de optimización de la manera de preparación de muestras plasmáticas de vitamina B ₆	101
Figura 4.21. Cromatograma correspondiente a la muestra 5 del estudio de optimización de la manera de preparación de muestras plasmáticas de vitamina B ₆	101
Figura 4.22. Cromatograma correspondiente a la muestra 7 del estudio de optimización de la manera de preparación de muestras plasmáticas de vitamina B ₆	102
Figura 4.23. Cromatograma de plasma de ratón contaminado con patrón de vitamina B ₆ preparado por filtración.	103
Figura 4.24. Rectas de calibrado obtenidas considerando alturas o áreas de pico.	104

Figura 4.25. Cromatograma obtenido tras la administración intravenosa de 50 mg/kg de piridoxina hidroclorehidrato.	108
Figura 4.26. Cromatograma obtenido tras la administración oral de 50 mg/kg de piridoxina hidroclorehidrato.	109
Figura 4.27. Cromatograma de plasma de ratón contaminado con patrón de piridoxina (PN) y piridoxamina (PM).	109
Figura 4.28. Cromatograma de plasma de ratón tras la administración oral de un bolo único de 100 mg/kg de PN y un tiempo de distribución de 60 minutos.	111
Figura 4.29. Cromatograma de plasma de ratón tras la administración oral de un bolo único de 100 mg/kg de PN y un tiempo de distribución de 15 minutos.....	111
Figura 4.30. Concentraciones plasmáticas extrapoladas tras la administración de dosis orales de vitamina B ₆ de 25, 50 y 100 mg/kg	112
Figura 4.31. Efecto de la administración IP de nigrina 10 mg/kg sobre la absorción de vitamina B ₆ administrada por vía oral.....	113

Tabla 1.1. Lectinas con actividad RIP aisladas de <i>Sambucus nigra</i> hasta la fecha.	28
Tabla 4.1. Resultados desglosados del ensayo de tinción con azul de Evans. Grupo control y Grupo tras 24 h de la administración IP de dosis subletales (10 mg/kg) de nigrina b.	91
Tabla 4.2. Resultados desglosados del ensayo de tinción con azul de Evans. Grupo tras 48 h y tras 72 h de la administración IP de dosis subletales (10 mg/kg) de nigrina b.	92
Tabla 4.3. Diseño factorial realizado para optimizar la manera de preparación de las muestras de plasma.	101

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. LA VÍA ORAL COMO RUTA DE ADMINISTRACIÓN DE NUTRIENTES Y FÁRMACOS	2
1.2. ABSORCIÓN DE XENOBIÓTICOS	3
1.3. FACTORES QUE CONDICIONAN LA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES O FÁRMACOS ADMINISTRADOS VÍA ORAL	6
1.3.1. FACTORES EXÓGENOS QUE CONDICIONAN LA ABSORCIÓN ORAL DE NUTRIENTES O FÁRMACOS	9
1.3.1.1. Factores que dependen de las características físico-químicas del principio activo o de la formulación	9
1.3.1.2. Factores que dependen de la interacción fármaco-fármaco o fármaco-dieta	10
1.3.2. FACTORES ENDÓGENOS QUE CONDICIONAN LA ABSORCIÓN ORAL DE NUTRIENTES O FÁRMACOS	11
1.3.2.1. Factores fisiológicos	11
1.3.2.2. Factores patológicos	11
1.3.2.2.1. Malabsorción por alteración de los procesos digestivos	13
1.3.2.2.2. Malabsorción por alteraciones de consumo y transporte celular causadas por daño o reducción de la superficie de absorción	15
1.3.2.2.3. Malabsorción por alteraciones causadas por otras causas	19

1.4. PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS (RIPs) DE <i>SAMBUCUS</i>	20
1.4.1. BREVE RESEÑA DEL SAÚCO	22
1.4.2. APLICACIONES MÁS FRECUENTES DEL SAÚCO Y PARTES UTILIZADAS	25
1.4.3. TOXICIDAD DEL SAUCO	26
1.4.4. LECTINAS (FITOHEMAGLUTININAS) DE <i>SAMBUCUS</i> <i>NIGRA</i>	27
1.4.5. ESTRUCTURA DE LA NIGRINA	29
1.4.6. TRÁNSITO INTRACELULAR DE LAS LECTINAS ANTIRRIBOSÓMICAS VEGETALES <i>SAMBUCUS</i>	34
1.4.7. MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR ANTIRRIBOSÓMICO DE LAS RIPs	37
1.4.8. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE NIGRINA B	41
1.5. VITAMINA B ₆	41
1.5.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA VITAMINA B ₆ .	43
1.5.2. REACCIONES ADVERSAS DE LA VITAMINA B ₆	44
1.5.3. PRINCIPALES ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DE LA VITAMINA B ₆	45
1.6. MODELOS QUÍMICOS DE DAÑO-REGENERACIÓN INTESTINAL EN RATÓN	49
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	51

3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. MATERIALES	54
3.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS	54
3.1.2. MATERIALES BIOLÓGICOS	56
3.1.2.1. Vegetales	56
3.1.2.2. Animales de experimentación	56
3.2. MÉTODOS	57
3.2.1. OBTENCIÓN DE NIGRINA DE LA CORTEZA DE <i>SAMBUCUS NIGRA L</i>	57
3.2.1.1. Proceso de extracción	57
3.2.1.2. Aislamiento de las lectinas de la corteza de <i>S. nigra</i>	59
3.2.1.2.1. Preparación del relleno cromatográfico	59
3.2.1.2.2. Cromatografía de afinidad a través de AT- Sepharose 6B	60
3.2.1.2.3. Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75	60
3.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS	61
3.2.2.1. Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr	61
3.2.2.2. Determinación de la actividad aglutinante de eritrocitos .	61
3.2.2.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	62
3.2.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO	64
3.2.4. TINCIÓN CON AZUL DE EVANS	66
3.2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	68

4. RESULTADOS	70
4.1. OBTENCIÓN DE NIGRINA DE LA CORTEZA DE <i>SAMBUCUS NIGRA L.</i>	71
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS	77
4.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS DE <i>S. NIGRA</i> POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS	77
4.2.2. HEMOAGLUTINACIÓN POR LECTINAS DE <i>SAMBUCUS</i> DE CÉLULAS ROJAS DE LA SANGRE HUMANA	79
4.2.3. ESTUDIOS DE LA TOXICIDAD EN RATONES PROVOCADA POR LA ADMINISTRACIÓN IP DE NIGRINA B DE CORTEZA DE <i>SAMBUCUS NIGRA</i>	81
4.2.3.1. Análisis histológicos	81
4.2.3.2. Variación del peso corporal	89
4.2.3.3. Tinción con azul de Evans.....	90
4.3. CUANTIFICACIÓN DE PIRIDOXINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	96
4.3.1. IMPLANTACIÓN DEL MÉTODO	98
4.3.1.1. Selección de la longitud de onda de máxima absorción ...	98
4.3.1.2. Estudio de la composición de la fase móvil	99
4.3.1.3. Preparación de las muestras	100
4.3.1.4. Proporcionalidad	103
4.3.1.4.1. Recta de calibración	103
4.3.1.4.2. Ensayo de linealidad	106
4.3.1.4.3. Ensayo de proporcionalidad	107

4.3.2. RELACIÓN ENTRE LA DOSIS DE VITAMINA B ₆ ADMINISTRADA Y CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA	108
4.4. ABSORCIÓN ORAL DE VITAMINA B ₆ EN RATONES TRATADOS CON DOSIS IP SUBLETALES DE NIGRINA B	113
5. DISCUSIÓN	115
6. CONCLUSIONES	125
7. BIBLIOGRAFÍA	128

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA VÍA ORAL COMO RUTA DE ADMINISTRACIÓN DE NUTRIENTES Y FÁRMACOS

El aparato digestivo suministra al organismo un aporte continuo de agua, electrolitos y nutrientes, para lo que se requiere el tránsito de los alimentos a lo largo de todo el tubo digestivo; la secreción de los jugos digestivos y la digestión de los alimentos; la absorción de los productos digeridos, el agua y los distintos electrolitos; la circulación de la sangre por las vísceras gastrointestinales para transportar las sustancias absorbidas y el control de todas estas funciones por los sistemas locales, nervioso y hormonal.

De la misma manera que los nutrientes, la vía oral es la principal vía de administración de medicamentos cuando lo que se busca es lograr un efecto sistémico y de hecho, el 85% de los medicamentos comercializados se administran por esta vía, ya sean comprimidos, cápsulas, jarabes, etc. Esto es debido entre otros factores a que es la vía de administración más sencilla para el paciente y barata desde un punto de vista tecnológico y por ello es la vía de elección en tratamientos crónicos ya que además no requiere de personal auxiliar y el paciente controla su tratamiento. Uno de los principales problemas asociados a esta vía es la automedicación.

También es posible administrar medicamentos por esta vía buscando un efecto local. De hecho se recurre a esta vía en el tratamiento de diversos problemas de tipo digestivo como pueden ser:

- las dispepsias fermentativas por deficiencia en algún sistema enzimático de los implicados en la digestión que se tratan con dimeticona,

- para proteger la mucosa se utilizan tapizantes de la misma o para neutralizar la acidez gástrica se administran antiácidos,
- para diarreas infecciosas se administran antibióticos que no se absorban tipo sulfamidas y aminoglucósidos,
- para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, proceso inflamatorio del intestino grueso que puede ser ulceroso en estadios tardíos, se emplea la sulfasalazina. Este antibiótico está constituido por un resto de 5-amino-salicílico y un resto de sulfapiridina unidos por enlace azoico. El 5-ASA solo se absorbe íntegramente en el intestino delgado.

Como limitaciones, en teoría por esta vía no podrían administrarse fármacos irritantes de la mucosa gástrica, ni fármacos que se degraden en medio gástrico ni aquellos que se degraden por enzimas intestinales (tipo polipeptidos como la insulina o heparina), ni fármacos que sufran un intenso efecto de primer paso intestinal. Ante estas limitaciones, existen numerosos recursos galénicos para optimizar el tratamiento.

1.2. ABSORCIÓN DE XENOBIÓTICOS

Los nutrientes una vez digeridos y extraídos de los alimentos, o los fármacos una vez liberados del medicamento que los presenta, han de poder absorberse para lograr un efecto sistémico. El estómago está separado del intestino delgado y el esófago por el cardias y el píloro. Tiene forma de bolsa con dos áreas definidas: la parte superior es el *fundus* y la inferior el antro y es considerado como un lugar poco probable de absorción por su histología y función fisiológica. La estructura de la

mucosa gástrica desde la luz del estómago al interior, tiene las siguientes capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa.

El intestino delgado es la zona principal de absorción de sustancias exógenas. Tiene tres partes diferenciadas: duodeno (pH 4-6), yeyuno (pH 6-7) e íleon (pH 7-8). El tiempo de permanencia en las distintas partes es variable y oscila entre 15-30 min en duodeno, 30 min a 3 horas en yeyuno y de 3-6 h en íleon. La absorción se lleva a cabo en todo el intestino delgado en función del pH. La parte absorbida es conducida al hígado a través de las venas mesentéricas, tributarias de la porta, por lo que sería susceptible de sufrir un efecto de primer paso hepático y sufrir ciclo entero-hepático antes de alcanzar circulación sistémica.

Lo mismo que el estómago, el intestino delgado también posee una importante función motora, secretora y digestiva, pero a diferencia de éste, se encuentra notablemente vascularizado y la superficie de absorción es enorme. Así en humanos se ha estimado que el área del cilindro intestinal es de 3.300 cm^2 . Las invaginaciones de la superficie interna constituyen las válvulas conniventes y hace que la superficie alcance los 10.000 cm^2 . Dichas invaginaciones tienen además unos pliegues secundarios que constituyen los villi por lo que la superficie de absorción se incrementa hasta los 100.000 cm^2 . Por su parte estos villi están constituidos por enterocitos con un reborde en cepillo denominados microvilli con lo que considerándolos, la superficie de absorción alcanzaría los $2.000.000 \text{ cm}^2$. Los enterocitos contienen en su interior numerosas enzimas. Cada villi contiene en su interior un capilar sanguíneo tributario de las venas mesentéricas y un capilar linfático. Si el fármaco alcanza el sistema linfático no sufriría ciclo entero hepático.

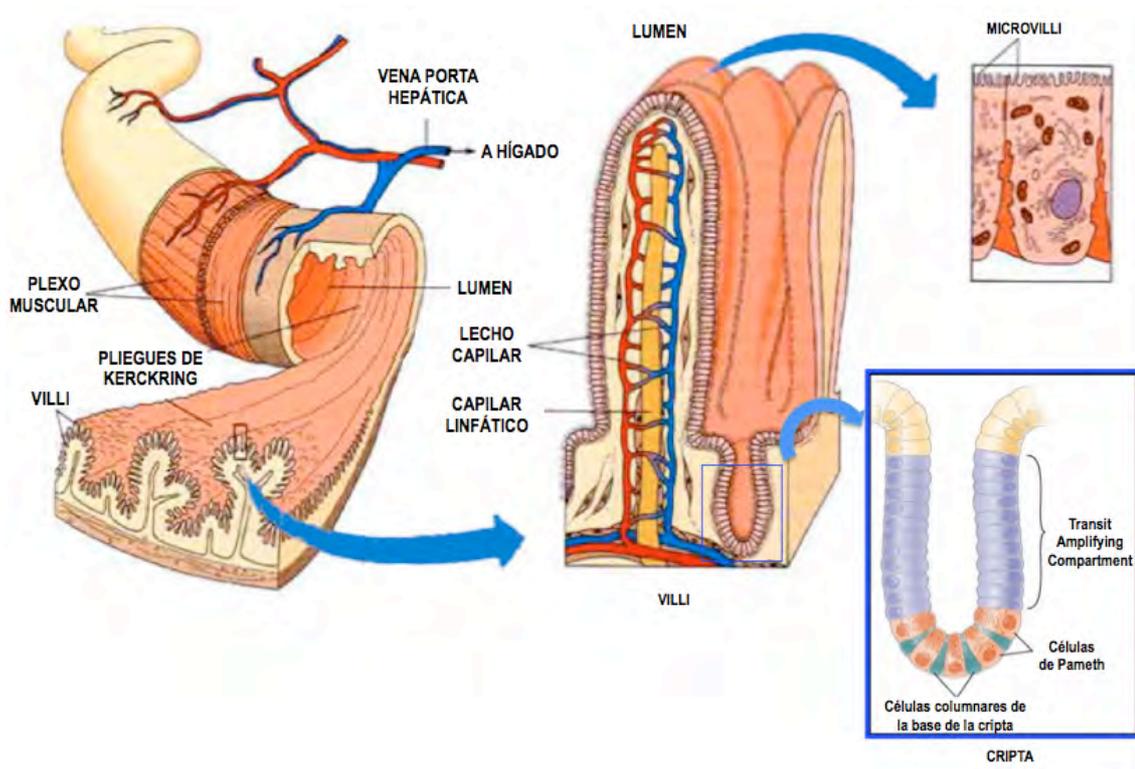


Figura 1.1. Esquema de la superficie de absorción intestinal. En la parte izquierda se puede observar la pared interna del cilindro intestinal con los pliegues primarios o válvulas conniventes; en la central, más ampliado el esquema de la sección de un villi y en la parte derecha superior, un esquema de los enterocitos con borde en cepillo del epitelio de los villi y en la parte inferior un esquema de las diferentes células que componen la cripta (Adaptado de Johnson, 2011).

Las principales secreciones a este nivel son:

- Pancreatina: amilasas (degradación del almidón), lipasas y enzimas proteolíticas.
- Secreción biliar: mucina, sales biliares, pigmentos y ácidos grasos.
- Jugo intestinal: mucina, enzimas (amilasa y enteroquima), cloruros y bicarbonato.
- Enzimas de la mucosa, dentro del enterocito y que por la renovación celular vierten al lumen intestinal provocando la degradación del fármaco antes de absorberse (es una degradación no un efecto de primer paso que implicaría absorción).

El fármaco accede al intestino grueso a través de la válvula ileocecal, para continuar por el colon ascendente (pH 5-7), transverso y descendente (pH neutro). Posteriormente accedería al meso-colon sigmoideo para alcanzar el recto.

La función principal del intestino grueso es la de depósito y expulsión de productos de deshecho. Su estructura es similar al intestino delgado pero sin válvulas conniventes, villi ni microvilli. Las formas farmacéuticas de cesión modificada son capaces de transportar al fármaco a este nivel para que ejerza su efecto local o alcance circulación sistémica. A este nivel la flora es de fermentación de hidratos de carbono generándose restos de ácido fórmico y acético y de putrefacción de proteínas que produce bases nitrogenadas y amoniacó que neutralizan el pH.

1.3. FACTORES QUE CONDICIONAN LA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES O FÁRMACOS ADMINISTRADOS VÍA ORAL

Entendemos por absorción el proceso de incorporación del fármaco a la primera célula del organismo siempre y cuando vaya destinado a circulación sistémica.

Según la teoría del mosaico fluido de Singer y Nicolson (Singer y Nicolson, 1972), las membranas celulares estarían formadas por dos capas lipídicas en las que se encuentran embebidas las proteínas. La parte hidrofílica de las membranas estarían en contacto con el exterior celular y el interior celular. No existen uniones entre los fosfolípidos que constituyen la membrana lo que implica que éstos se pueden mover, por eso se habla de

la membrana fluida. En cuanto a las proteínas tenemos dos grandes grupos: proteínas integrales (implicadas en el sistema de transporte y que no se pueden extraer de la membrana sin destruir la bicapa) y proteínas periféricas (si son extraíbles sin destruir la bicapa y se sitúan en la cara interior de la membrana).

Existen tres posibilidades de transferencia de nutrientes y fármacos a través de membranas biológicas:

1) Filtración o difusión convectiva: el agua circula libremente a través de los poros acuosos por diferencia de presiones a ambos lados de la membrana. Este es el proceso implicado en la distribución, eliminación renal, etc. La limitación sería el diámetro del poro, es decir sólo pasará agua y lo que lleve disuelto de tamaño inferior al mismo. En el caso de los enterocitos el diámetro es de 4-6 Å.

2) Difusión pasiva: se fundamenta en la diferencia de concentraciones a ambos lados de la membrana, pasando fármaco de la zona de mayor concentración a la zona de menor concentración hasta que se alcanza el equilibrio a ambos lados de la membrana y el proceso se detiene. Esta modalidad de transferencia puede llevarse a cabo a través de poros acuosos o por la doble capa lipídica tal cual:

- En el primer caso el condicionante sería el peso molecular del fármaco y el diámetro de poro. En los enterocitos este mecanismo es el responsable de la absorción de fármacos hidrofílicos.

- En el segundo caso tenemos una barrera lipídica y el fármaco fuera, disuelto en medio acuoso. El fármaco se incorpora a la membrana y de aquí difunde a través de la misma hasta llegar a la parte hidrofílica de la misma donde la abandona. Tanto la incorporación a la membrana como la salida de la misma se produce en función del coeficiente de permeabilidad (P) del principio activo, del área de difusión y de la concentración

El fármaco disuelto en el exterior celular debe perder la tendencia a unirse al agua por puentes de hidrógeno, alcanzar la membrana y disolverse en la misma, por lo que moléculas muy ionizadas no pueden abandonar el agua. Los fármacos son normalmente ácidos o bases débiles por lo que están en disolución parcialmente ionizados. Sólo la fracción de fármaco no ionizada es capaz de atravesar la membrana celular. Por tanto, el grado de ionización es fundamental y depende del pH del medio y del pKa del fármaco. A modo de resumen, los factores que influyen en la difusión son los siguientes: la permeabilidad (que incluye coeficiente de difusión, de reparto y espesor de la membrana), el pKa del fármaco y su peso molecular para el paso a través de los poros.

3) Transporte activo: es una modalidad de transferencia de xenobióticos altamente especializada y mediada por un complejo transportador de carácter fundamentalmente proteico. Existen transportadores tanto a nivel intestinal, renal, hepático, etc. para facilitar el paso de sustratos específicos. Este tipo de transporte tiene las siguientes características generales: requiere gasto de energía, necesita de transportadores proteicos específicos, es un mecanismo saturable, ruta de compuestos de elevada polaridad y por último, independiente del gradiente de concentración.

Los factores que condicionan la absorción de nutrientes o fármacos administrados vía oral se pueden agrupar en dos grandes grupos: exógenos o endógenos.

1.3.1. FACTORES EXÓGENOS QUE CONDICIONAN LA ABSORCIÓN ORAL DE NUTRIENTES O FÁRMACOS

Son factores externos al individuo y que por tanto se pueden modificar. Se dividen en dos modalidades:

1.3.1.1. Factores que dependen de las características físico-químicas del principio activo o de la formulación

- *Tamaño de partícula*: a menor diámetro, mayor superficie específica y mayor velocidad de disolución.

- *Polimorfos*: un sólido puede ser amorfo o cristalino. En estado amorfo, las partículas que lo forman no están distribuidas de manera ordenada, formando una red, por lo que es más fácil que se disuelvan. Por otro lado, podemos tener un único cristal o varios tipos (polimorfos) unos más estables que otros. Cuanto más estables sean más difícil será que se disuelvan.

- *Dispersiones sólidas y mezclas eutécticas*: las dispersiones sólidas son una dispersión molecular entre uno o más principios activos poco solubles y un excipiente altamente soluble, que al ponerse en contacto con el medio acuoso, disuelve el polímero liberando al principio activo a tamaño

molecular. La mezcla eutéctica es similar pero durante la obtención se obtiene una nueva entidad química con un punto de fusión diferente a la de sus componentes.

1.3.1.2. Factores que dependen de la interacción fármaco-fármaco o fármaco-dieta

- Interacciones fármaco-fármaco a nivel de absorción:

a) Mecanismos físico-químicos tipo adsorción (cuando se administran conjuntamente dos fármacos y uno es capaz de adsorber al otro en su superficie) o tipo intercambio iónico (cuando se administra una resina de intercambio iónico con un fármaco iónico).

b) Mecanismos químicos, como pueden ser la formación de quelatos inabsorbibles o la modificación del pH digestivo.

c) Mecanismos fisiológicos, es decir, la administración conjunta de dos fármacos si uno de ellos afecta a la motilidad intestinal o al vaciamiento gástrico.

- Interacciones fármaco-alimento a nivel de absorción: lo normal es administrar un fármaco con un volumen de agua, aunque en ocasiones se aconseja administrarlo con alimentos; así sería cuando el fármaco es lesivo para la mucosa gástrica, ejercen un efecto en el bolo o tienen una ventana de absorción y se trata de aumentar la permanencia. Además de los mecanismos físico-químicos, químicos y fisiológicos comentados anteriormente, se pueden producir fenómenos de competencia entre un fármaco y un alimento por un mismo transportador.

1.3.2. FACTORES ENDÓGENOS QUE CONDICIONAN LA ABSORCIÓN ORAL DE NUTRIENTES O FÁRMACOS

1.3.2.1. Factores fisiológicos

- Vaciamiento gástrico. Influye directamente en el tiempo de latencia previo a la absorción e incluso en fármacos de clase I (alta solubilidad y alta permeabilidad) puede ser el factor limitante de la incorporación del fármaco al organismo. El vaciamiento gástrico depende del peristaltismo gástrico (movimiento del estómago en ayunas) y de los mecanismos moduladores del vaciado (regulan la velocidad de vaciamiento en función de la naturaleza del alimento, volumen de líquido administrado o volumen de alimento, para obtener el mayor rendimiento posible).

- Tránsito intestinal. En general, si no existe degradación por la flora u otros factores, a menor velocidad de tránsito mayor absorción. Existen dos tipos de movimientos, de segmentación o amasado y de progresión.

- Interacción fármaco-flora intestinal (ej. vitamina B₁₂).

1.3.2.2. Factores patológicos

- Alteraciones funcionales, tipo úlcera gástrica o duodenal que afectan al vaciamiento gástrico y al tránsito lo mismo que al pH, etc.

- Resecciones totales o parciales, son muy importantes si afectan a la ventana de absorción del fármaco. Como ya se ha comentado, la superficie de absorción del intestino delgado puede alcanzar una superficie total de 200 m². Esta considerable extensión, puede explicar la disociación clínica

entre el síndrome de malabsorción y enteropatía. En otras palabras, *enteropatía*, definida como una enfermedad caracterizada por alteraciones evidentes del intestino delgado, se expresa como un síndrome de malabsorción, esto es, como un complejo de síntomas debidos a mala digestión y/o malabsorción, sólo cuando la extensión afectada es tal, que excede la capacidad de compensación del propio órgano.

En general, la *malabsorción* se define como un defecto en el paso a través de la pared intestinal, de productos procedentes de una digestión normal; mientras que el término *mala digestión* se refiere a una hidrólisis incorrecta de los nutrientes.

Desde un punto de vista nutricional, el resultado final de la malabsorción causada por mala digestión tiende a ser más específica puesto que pueden verse afectados o bien sólo uno o muy pocos nutrientes, mientras que la enfermedad de la mucosa normalmente supone una malabsorción generalizada. (Carmel, 1999). Desde un punto de vista clínico tanto mala digestión como malabsorción son responsables de un síndrome de malabsorción similar.

La malabsorción puede afectar a substratos específicos solamente (malabsorción selectiva) o puede tener una afectación generalizada (malabsorción global). Por esta razón, los signos y síntomas que caracterizan este síndrome pueden ser muy variables. En general estos signos y síntomas son ambos debidos a la modificación del contenido luminal que contendría persistentemente ciertos nutrientes, por ejemplo: diarrea, esteatorrea, meteorismo, dolor abdominal; y también son debidos a la falta de disponibilidad tisular de los nutrientes, por ejemplo: palidez,

astenia, pérdida de peso, retraso o falta de crecimiento físico, edemas, distrofia en la dermis y epidermis, amenorrea, osteopatías, hemeralopía (dificultades para la visión en condiciones de poca luminosidad), manifestaciones neurológicas y hemorrágicas e infecciones recurrentes.

Los síndromes de malabsorción se pueden producir por alteración de los procesos digestivos; alteración de transporte y disponibilidad celular de nutrientes por daño o reducción de la superficie de absorción y un grupo de condiciones con diferentes mecanismos que se ha denominado “varios”.

1.3.2.2.1. Malabsorción por alteración de los procesos digestivos

Se incluyen en este grupo, los síndromes de malabsorción debidos a alteraciones bioquímicas en los procesos normales de la digestión. Son debidos a déficits enzimáticos (enzimas producidos en la superficie en cepillo del intestino o enzimas pancreáticos) y también a una deficiencia de sales biliares.

Déficits enzimáticos.

Los enzimas que pueden ser deficitarios son producidos por las células del borde en cepillo intestinal y están implicados en la digestión de carbohidratos (α -glucosidasa y β -galactosidasa) y de proteínas (enteroquinasa). El déficit más común es el de la lactasa, una β -galactosidasa, que es responsable de la hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa.

Como consecuencia del déficit de lactasa, la presencia persistente de lactosa no hidrolizada en el lumen intestinal, permite la fermentación por parte de bacterias del colon y la producción de gas. El cuadro clínico

consecuente está caracterizado por meteorismo, dolor abdominal, diarrea osmótica. Existe también una rara forma de deficiencia congénita de lactasa que se caracteriza por una total ausencia de lactasa (alactasia) y se manifiesta con una sintomatología presente desde los primeros días de vida.

El déficit de α -glucosidasa (glucoamilasa, sacarasa-isomaltasa, trehalasa) es responsable de una malabsorción selectiva de azúcares no hidrolizados.

Por último, el déficit congénito o adquirido de enteroquinasa, responsable de la transformación de tripsinógeno en tripsina (necesaria para la activación de otras proteasas pancreáticas) causa una malabsorción selectiva de proteínas que cursa con diarrea, retraso en el crecimiento, hipoproteinemia, edemas y anemia.

Otro grupo de alteraciones en los procesos bioquímicos de la digestión, está representado por las alteraciones de las secreciones pancreáticas. Situaciones como pancreatitis crónica, cáncer de páncreas, cirugía pancreática y enfermedades pancreáticas congénitas como fibrosis quística, pueden condicionar la reducción de la excreción y/o de la producción de amilasa, lipasa y proteasa necesarias para una correcta digestión de los nutrientes. La manifestación clínica de los síntomas ocurre sólo en las formas severas, en las que la función pancreática residual es tan sólo < 10%. Los síntomas típicos son, diarrea, esteatorrea y pérdida de peso. Además, la reducción de la secreción de bicarbonato en la pancreatitis crónica no permite un correcto incremento del pH intestinal, necesario para activar algunos enzimas digestivos.

Déficit de sales biliares.

Las situaciones patológicas que pueden originar este déficit son, cirrosis hepática, síndrome colestásico, alteraciones del íleon que conlleven daño en el ciclo enterohepático, sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (responsable de la desconjugación de ácidos biliares en el lumen).

Una concentración baja de sales biliares puede causar el descenso en la formación de micelas en los nutrientes de naturaleza grasa y esto tiene como consecuencia la malabsorción de grasas y vitaminas liposolubles. El cuadro clínico que caracteriza esta patología es el siguiente: esteatorrea, tetania, osteoporosis, ceguera nocturna, diatésis hemorrágica (hemorragias por rotura del equilibrio hemostático), alteraciones tróficas de la piel. Por otra parte, en caso de alteración del ciclo enterohepático, un incremento en la concentración de ácidos biliares en el colon, puede estimular una secreción activa de cloro y agua, causando diarrea acuosa.

1.3.2.2. Malabsorción por alteraciones de consumo y transporte celular causadas por daño o reducción de la superficie de absorción

Dentro de este grupo hay varias situaciones patológicas, las cuales, por ser la causa de una alteración intestinal difusa en la mayoría de los casos, pueden conducir a una malabsorción global.

Enfermedad celíaca: está causada por una inapropiada respuesta inmune al gluten y provoca alteraciones histológicas concretas como son, atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas e incremento del número de linfocitos intraepiteliales (Chand y Anastasios, 2006). La expresión clínica

es variable y los síntomas intestinales pueden ser muy leves, existe una forma silente totalmente asintomática, pero la manifestación clínica clásica se caracteriza por signos y síntomas típicos del síndrome de malabsorción: diarrea, esteatorrea, pérdida de peso, dolor abdominal. etc.

Enfermedad de Crohn: es una inflamación crónica del intestino delgado con una etiología multifactorial. Puede afectar a todo el tracto digestivo aunque la localización más frecuente es el íleo terminal. Las lesiones histológicas son de localización transmural, y es característica la presencia de sarcoidosis (formación de masas de tejido anormal o granulomas debido a inflamación de ganglios linfáticos). Las complicaciones frecuentes son la aparición de estenosis y fístulas (Sands, 2004) que dan lugar a sobrecrecimiento bacteriano. La presentación clínica es variable dependiendo de dónde esté localizada la enfermedad: cuando se localiza en el íleo es responsable de una malabsorción selectiva de vitamina B₁₂ con anemia megaloblástica y de una malabsorción de grasas y vitaminas liposolubles. Cuando la enfermedad se localiza en el colon, los síntomas típicos son dolor abdominal y diarrea, con presencia de sangre en el 70% de los casos (Young y Abreu, 2006).

Gastroenteritis eosinofílica: es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por infiltración eosinofílica; la enfermedad se clasifica dependiendo de la profundidad de alcance de esta infiltración, en las formas: mucosa, muscular y serosa, estas localizaciones también condicionan los distintos síntomas; en particular, se encuentra una malabsorción global en la forma mucosa en el 30% de los casos (Khan, 2005).

Enteropatía autoinmune: es una enfermedad propia de personas jóvenes con rasgos clínicos e histopatológicos similares a la enfermedad celíaca pero sin respuesta a una dieta sin gluten. Es típica la presencia de anticuerpos anti-enterocitos. (Russo y cols.,1999).

Enteritis por radiación: es la consecuencia del daño intestinal agudo o crónico causado por radiación. La forma aguda tiene su origen depleción de las células de las criptas intestinales y su sustitución por una densa infiltración inflamatoria, con acortamiento de las vellosidades. La forma crónica de esta enteritis se produce por la aparición de una vasculitis obstructiva progresiva y depósitos de colágeno, con la consecuente estenosis y malabsorción (Yeoh y cols., 1993). Por otro lado la expansión de un codo intestinal antes de la estenosis puede originar sobrecrecimiento bacteriano. (Bismar y Sinicrope, 2002).

Linfagiectasia: es una enteropatía caracterizada por la pérdida de absorción de proteínas y cuya patología se describe como una dilatación anormal del intestino causada por una rara alteración congénita en el desarrollo de los vasos linfáticos más pequeños del organismo (Rossi y cols., 1996). Las alteraciones histológicas son: vasos linfáticos de la lámina propia (situada entre el epitelio y la muscularis mucosa) dilatados y villis hinchados y mermados (Aoyagi y cols., 1997). El drenaje linfático normal está afectado, por eso, la fuga de linfa en el lumen intestinal hace que exista una pérdida en proteínas que puedan ser absorbidas, vitaminas liposolubles y otros nutrientes, además de los consecuentes edema, hipoalbuminemia e inmunodeficiencia debida a la pérdida de inmunoglobulinas (Barnes y DeRidder, 1993).

Mastocitosis sistémica: en esta enfermedad, el aumento de secreción de histamina es responsable de la aparición de gastritis, úlceras pépticas y, de acuerdo con varios autores, puede causar un daño directo en la mucosa intestinal (Jensen, 2000).

Acrodermatitis enterohepática: es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la desaparición de las crestas de las vellosidades, hiperplasia de las criptas y pérdida de los enzimas del borde en cepillo (Van Wouwe, 1989). La malabsorción del zinc es característica y ello provoca lesiones de la piel y mucosas además de síntomas neuropsiquiátricos (Maverakis y cols., 2007).

Abetalipoproteinemia: es una enfermedad autosómico recesiva rara, que causa una alteración en la constitución intracelular de quilomicrones con acumulación de grasa en los enterocitos y la consecuente afectación de la absorción de la grasa intestinal (Tack y cols.,1988).

Linfomas: son tumores malignos del tejido linfático con invasión intestinal local. Tienden a provocar una afectación multifocal y una rápida difusión. Pueden ser primarios o secundarios según sea su origen intestinal o extra intestinal (Khojasteh y cols.,1983). Las lesiones causan el despunte de los villi y la desaparición de criptas, además de una considerable infiltración de células plasmáticas localizadas en la lámina propia. Estos linfomas pueden invadir la submucosa, ganglios linfáticos mesentéricos, médula ósea y sangre periférica (Ruskone-Fourmestraux y cols., 2006).

“Síndrome de intestino corto”: esta enfermedad es común en pacientes a los que les ha sido practicada una resección quirúrgica del intestino

delgado. La pérdida de superficie de absorción, la disminución en la síntesis de hormonas gastrointestinales y la aceleración del tránsito intestinal, son responsables de malabsorción (Jackson y Buchman, 2005). Por otra parte, la posible pérdida de la válvula ileocecal provoca una migración retrógrada de bacterias desde el colon hasta el intestino delgado causando en éste sobrecrecimiento bacteriano.

1.3.2.2.3. Malabsorción por alteraciones causadas por otras causas

La enfermedad más común es la proliferación bacteriana anormal en el lumen intestinal causada por diferentes trastornos como, atrofia gástrica, diverticulosis en duodeno o yeyuno, estenosis, obstrucciones, fístulas, neuropatía diabética, esclerodermia, pseudo-obstrucción intestinal e incompetencia de la válvula ileocecal (Meyers y cols., 2001). Al desaparecer el equilibrio de la microflora intestinal normal, las funciones metabólicas e inmunológicas de la misma están afectadas (Lin, 2004). En particular, la presencia anormal de bacterias está implicada en la desconjugación de ácidos biliares, con la consecuente esteatorrea, malabsorción de grasas y vitaminas liposolubles y la liberación de ácidos biliares libres, que causan daño a la mucosa intestinal (Quigley y Quera, 2006). Estas bacterias compiten con su hospedador por el uso de cobalamina, con el consecuente déficit de vitamina B₁₂ (Huse Bye, 2005). También se han descrito alteraciones histológicas de la mucosa intestinal con una infiltración crónica inflamatoria aumentada en la *lamina propria* y destrucción de vellosidades intestinales (Riordan y cols., 2001). Otras causas de síndromes de malabsorción de origen microbiano son las parasitosis intestinales, enteritis, sprue tropical, enfermedad de Whipple y VIH.

Dentro de las parasitosis intestinales se incluyen las infecciones por protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, etc.) y las infestaciones por nematodos (*Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, etc.) y cestodos (*Taenia sp.*, etc.) (Katz y Taylor, 2001).

La enteritis infecciosa incluye infecciones intestinales virales (*Rotavirus*, *Calicivirus*, *Adenovirus* entérico) o bacterianas (en particular por *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* o *Vibrio cholerae*). El daño de la mucosa se produce por mecanismo directo de las toxinas de la bacteria (Kim y cols., 1998).

1.4. PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS (RIPs) DE SAMBUCUS

Las plantas poseen numerosas sustancias que además de atravesar la mucosa intestinal interaccionan con ella, bien produciendo efectos en el desarrollo de los receptores de membrana o bien ejerciendo efectos tóxicos. Entre ellas se encuentran las lectinas o fitohemaglutininas. Las lectinas se definen como proteínas que interaccionan con azúcares de una manera más o menos específica. Las lectinas se encuentran en innumerables alimentos vegetales y su ingestión puede provocar alteraciones intestinales causantes de mal funcionamiento intestinal y ocasionar malabsorción de nutrientes y trastornos en el crecimiento de los animales alimentados con ellas.

Algunas de ellas poseen además de esta actividad no enzimática otra de naturaleza enzimática, concretamente una actividad inactivadora de

ribosomas, y por ello se incluyen en la categoría de proteínas inactivadoras de ribosomas o RIPs (*ribosome-inactivating proteins*).

En la actualidad, las RIPs se clasifican en dos categorías: RIPs de tipo 1 y RIPs de tipo 2 (Girbés y cols., 2004). Las RIPs de tipo 1 (vegetales y bacterianas) están formadas por una sola cadena polipeptídica con actividad N-glicosidasa y en general con escasa toxicidad para animales., que es la que presenta actividad de inhibidor de síntesis de proteínas.

Las RIPs de tipo 2 están formadas por dos cadenas polipeptídicas diferentes: una cadena inhibidora de síntesis de proteínas equivalente a las RIPs de tipo 1, denominada cadena A, y una cadena con propiedades de lectina que se denomina cadena B unida por puentes disulfuro. Las RIPs de tipo 2 pueden también estar formadas por dímeros unidos por fuerzas no covalentes, siendo cada dímero una molécula de dos cadenas polipeptídicas equivalente a una RIP de tipo 2.

Las RIPs tipo 2 se clasifican a su vez en “muy tóxicas” y “poco tóxicas” en relación con la ricina. La elevada toxicidad de ricina, volkensina, abrina, entre otras RIPs, clasificadas como “muy tóxicas” es debida a que pueden atravesar las membranas celulares al reconocer y unirse a receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol (Girbés y cols., 2004). Por otro lado, las RIPs de tipo 2 poco tóxicas en comparación con ricina, se las conocen como “no tóxicas” para células humanas cultivadas y para ratones.

A pesar de esta clasificación, en estudios de la toxicidad en ribosomas mediante la medida de la concentración inhibitoria 50%, se pudo comprobar que no hay diferencia de actividad entre ricina y volkensina

clasificadas como muy tóxicas, y ebulina y nigrina, clasificadas como poco tóxicas: en ambas es del orden de 10^{-10} M. En células HeLa, cultivadas in vitro, vemos que la concentración inhibitoria 50% es diferente de 4 a 7 órdenes de magnitud. Cuando se ensaya la toxicidad en ratones, la dosis letal 50% es de 8 y 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ricina y volkensina respectivamente mientras que para nigrina y ebulina es de 2 mg/kg y 12 mg/kg respectivamente, es decir presentan toxicidad aunque sean clasificadas como “poco tóxicas” en comparación con ricina.

Las RIPs tipo 1 son menos tóxicas para las mismas células y animales de ensayo que las de tipo 2 tóxicas, a excepción de los macrófagos (Barbieri y cols., 1993), debido a que no pueden entrar por mediación de receptores de membrana.

1.4.1. BREVE RESEÑA DEL SAÚCO

Los saúcos, sus frutos, hojas, corteza y rizomas se han recolectado y utilizado desde el Neolítico como alimento y medicina. Se han encontrado restos de saúco enano o yezgo (*Sambucus ebulus* L.) y de saúco negro (*Sambucus nigra* L.) en emplazamientos arqueológicos de unos 6.000 años en diversas áreas del arco mediterráneo, en particular en el sur de Francia y el norte de Italia (Martin y cols., 2008; Rottoli y Castiglioni, 2009). Pío Font-Quer en su libro “Plantas Medicinales. El Dioscorides renovado” hace una descripción detallada de la botánica, recolección, composición, virtudes y uso, e historia de ambos saúcos. La familia de las *Sambuceaceae* consta de no menos de 40 especies. Estas especies vegetales son arbustos

que llegan a convertirse en pequeños árboles si se dan las circunstancias adecuadas de temperatura, humedad y calidad del suelo.

Los frutos han sido por lo general las partes más utilizadas como alimento. Los saucos son fuente de compuestos bioactivos cada vez más importantes desde el punto de vista nutricional, tales como compuestos fenólicos, flavonoides o vitamina C (Veberic y cols., 2008; Kaack y Austed, 1998). Además contienen fitohemaglutininas (Girbes y cols., 2004).

La especie más estudiada es el saúco común o saúco negro, *Sambucus nigra* L. de porte arbustivo arbóreo (Font-Quer, 1990). Se trata de un arbusto leñoso de 3-5 m de altura pero que en algunos casos puede llegar a alcanzar hasta 8 metros. Su corteza es suberosa y en ella se puede diferenciar la parte exterior o primaria y la interior o secundaria que es la que contiene lectinas, entre ellas la nigrina b (Ferrerías y cols., 2011). Sus hojas, son caducas, pecioladas, opuestas, compuestas de 2-4 pares de folíolos peciolados, opuestos, lanceolados, puntiagudos, dentados y lisos, de color verde oscuro por el haz y verde más claro por el envés.

En cuanto a las flores, son blancas, pequeñas, pedunculadas y reunidas en umbelas terminales. La floración se produce en primavera y los frutos maduros son bayas globulosas, carnosas de color vinoso a negro. El hábitat más frecuente del saúco son los suelos frescos de sotos y hondonadas, cercanos a los ríos y en zonas de clima templado y húmedo.



Figura 1.2. Detalles de *Sambucus nigra* L. Flores (parte superior) y ramas (parte inferior) del tipo de las utilizadas en este trabajo.

Aunque la composición química del saúco no ha sido estudiada exhaustivamente, diversos trabajos han permitido identificar numerosos compuestos químicos importantes, algunos de significación farmacológica. Quizás los fitoquímicos más característicos del saúco son sus pigmentos antociánicos: cianidin-3-glucósido, cianidin-3,5-diglucósido, cianidin-3-glucosa, cianidin-3-sambubiósido y cianidin-3-sambubiósido-5-glucósido (Timberlake y Bridle, 1976; Bridle y Garcia-Viguera, 1997).

El saúco contiene proteínas estructurales y funcionales características de las plantas. De entre las proteínas del saúco investigadas hasta la fecha, las más significativas y de mayor aplicación a la biomedicina son las proteínas inactivadoras de ribosomas y las lectinas (Ferrerías y cols., 2010).

1.4.2. APLICACIONES MÁS FRECUENTES DEL SAÚCO Y PARTES UTILIZADAS

Las aplicaciones actuales más frecuentes, según el vademécum de prescripción de plantas medicinales están basadas en las acciones farmacológicas atribuidas a las distintas partes del saúco (Vanaclocha y cols, 2003). Las más notables son las acciones diaforéticas, diuréticas, demulcentes, venotónicas, antirreumáticas y galactogénicas de las flores, y las purgantes y antirreumáticas de la corteza y los frutos. En cuanto a las indicaciones actuales son, por vía interna, resfriados, gripe, bronquitis, reumatismo, gota, oliguria, urolitiasis, cistitis y estreñimiento, y por vía externa, conjuntivitis, faringitis, vaginitis, dermatosis, heridas, quemaduras, neuralgias, forúnculos y urticaria.

Estudios científicos recientes relacionan específicamente al saúco con la terapia coadyuvante de la reducción de peso (Christensen y cols., 2010; Hasani-Ranjbar y cols., 2009; Chrubasik y cols., 2008) y como antigripal (Zakay-Rones y cols., 2004).

1.4.3. TOXICIDAD DEL SAUCO

Desde antiguo se sabe que el consumo directo de corteza y frutos verdes o brotes de hojas de saúco provoca náuseas y vómitos cuya intensidad es dependiente del grado de madurez de los frutos (Font-Quer, 1990). Los efectos pueden ser violentos e incluso llegar a causar serias intoxicaciones gastrointestinales que recuerdan a los provocados por la ingestión de frutos de *Ricinus communis* (Vanaclocha y cols, 2003), debido a la presencia de ricina, una RIP extremadamente tóxica (Olsnes, 2004). La ingestión de corteza o de brotes de hojas de saúco provocan efectos gastrointestinales parecidos a los ocasionados por los frutos (Olsnes y Pihl, 1982).

En la etnobotánica se considera que la decocción de los frutos, incluso los muy verdes, y de la corteza o los brotes de hojas, elimina en gran parte la toxicidad (Font-Quer, 1990). Por el tipo de efectos se cree que dicha toxicidad podría estar relacionada con sustancias termolábiles presentes en mayor concentración en frutos verdes y corteza, tales como proteínas, aunque no pueden excluirse sustancias orgánicas de bajo peso molecular tales como sustancias cianogénicas que de hecho pueden liberar ácido cianhídrico al hidrolizarse. Sin embargo, ni su concentración, que no es lo suficientemente alta, ni los síntomas de intoxicación son suficientes para explicar intoxicación por cianhídrico.

Los efectos tóxicos descritos, náuseas, vómitos, dolor intestinal, hemorragias intestinales, etc., como resultado de la ingestión de frutos verdes, corteza verde y brotes de hojas, a nivel intestinal (Font-Quer, 1990; Vanaclocha y cols, 2003), son los mismos que se observan por acción de la nigrina y ebulina, lectinas ambas con actividad antirribosómica, administradas a ratones a alta concentración por vía intravenosa (Battelli y cols., 1997; Gayoso y cols., 2005).

1.4.4. LECTINAS (FITOHEMAGLUTININAS) DE *SAMBUCUS NIGRA*

De los saúcos se han aislado numerosas fitohemaglutininas o lectinas con actividad antirribosómica o sin ella. Las lectinas más importantes aisladas de *Sambucus nigra* son SNA-I, nigrina b y SNA-II en corteza y SNA-IV en frutos.

Las lectinas homodiméricas resultan de la unión de dos cadenas polipeptídicas idénticas unidas por un puente disulfuro. En las monoméricas, la correspondiente cisteína que forma el puente, desaparece por mutación y no puede formar el puente disulfuro y, por lo tanto, los dímeros (Citores y cols., 2008).

Las lectinas inactivadoras de ribosomas pueden tener diversos orígenes: de origen bacteriano, de algas, pero en su mayor parte son de origen vegetal. Estas lectinas, además de fijar azúcares sencillos y complejos, provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas llevada a

cabo por ribosomas de mamíferos, hongos, algunas plantas y algunas bacterias (Barbieri y cols., 1993; Girbés y cols., 1993a; Nielsen y Boston, 2001).

En la siguiente tabla se incluyen las lectinas con actividad antirribosómica descubiertas hasta el momento en la especie *Sambucus nigra*. En casi todos los casos se trata de isoformas parecidas que difieren únicamente en unos pocos aminoácidos. No obstante, se aprecian cambios en la actividad enzimática que en algunos casos son notables. En otros casos, se trata de proteínas prácticamente idénticas.

Tejido	Proteína	Mr aparente	
		Cadena A	Cadena B
Corteza	nigrina b	26000	32000
Corteza	nigrina bb	32000	32000
Corteza	SNA-I 2A-2B	35000	35000
Corteza	SNA-I' 2A-2B	32000	35000
Corteza	SNLRP1	32000	32000
Corteza	SNLRP2	32000	32000
Hojas	nigrina l1	26000	34000
Hojas	nigrina l2	26000	34000
Frutos	nigrina f	26300	31600
Semillas	nigrina s	26300	31600

Tabla 1.1. Lectinas con actividad RIP aisladas de *Sambucus nigra* hasta la fecha. La letra a la derecha de la proteína significa la fuente de la que se aísla la lectina.

Todas las lectinas antirribosómicas son del tipo dimérico A-B excepto SNA I, que es un tetrámero del tipo (A-B)₂. La unión entre las subunidades A y B se produce por puentes disulfuro intercatenarios.

La nigrina, junto con la ebulina, fue la primera lectina antirribosómica descubierta en la familia *Sambucaceae* (Girbés y cols., 1993c). Se trataba de definir el patrón de lectinas de *Sambucus nigra* L. Por aquel entonces este patrón contaba con cuatro lectinas descritas diferentes: las denominadas SNA I (*Sambucus nigra* agglutinin I), SNA II, SNA III y SNA IV (Barbieri y cols., 1993), y de *Sambucus ebulus*, se conocía sólo una, SEA en la corteza. Lo único que se sabía de ellas era que aglutinaban los glóbulos rojos de la sangre. Se sabía que en ambos saúcos, la ingestión de partes de estas plantas, en ciertas condiciones, podía provocar intoxicaciones graves.

1.4.5. ESTRUCTURA DE LA NIGRINA

Diversos estudios han permitido elucidar las estructuras de los genes que codifican la ebulina I (Pascal y cols., 2001), la nigrina b (Van Damme y cols., 1996) y la ricina (Lord y cols., 1994). Su estudio comparado, sugiere que nigrina b y ebulina f, consideradas RIPs no tóxicas, se sintetizan y procesan siguiendo el modelo establecido de ricina. El análisis de las secuencias de dichos genes, ha permitido determinar la secuencia proteica precisa de dichas RIPs (Figura 1.3.)

		0	20	30	40	50					
1	NIGRINA B	MR-VVAAAML	YFYIVVLA	ICSVGIQG	-----ID	-----YPSV	SFNLDG 37				
2	EBULINA L	MR-VVKAAML	YLHIVVLA	IYISVGIQG	-----ID	-----YPSV	SFNLAG 37				
3	RICINA	MKPGGNTI	VIWYAVAT	WLCFGST	SGWSFTLE	NNIFPKQY	PIINFTTAG 50				
		60	70	80	90	100					
1	NIGRINA B	AKSATYRDF	LSNLRKTV	ATGTYEVN	GLPVLRR	ESEVQVKS	SRFVLVPLTNY 87				
2	EBULINA L	AKSTTYRDF	LKNLDRV	ATGTYEVN	GLPVLRR	ESEVQVKN	RFLVRLTNY 87				
3	RICINA	ATVQSYTN	FIRAVRGR	LTTGADVR	HEIPVLP	NRVGLP	INQRFILVELSNH 100				
		110	120	130	140	150					
1	NIGRINA B	NGNTVTLA	VDVTNLY	VVAFSGN	ANSYFFK	-DATEVQK	--SNLFGTK-QN 133				
2	EBULINA L	NGDTVTS	AVDVTN	LYLVAFS	ANGNSY	FFK-DATE	LQK--SNLFLGTT-QH 133				
3	RICINA	AELSVTL	ALDVTN	AYVVG	YRAGNS	AYFFHPD	NQEDAEAITHLFTDVQNR 150				
		160	170	180	190	200					
1	NIGRINA B	TLSTFTGN	YDNLETA	ANTRRES	IELGSP	PLDGAIT	SLYHGDS-----VA 176				
2	EBULINA L	TLSTFTGN	YDNLETA	AGTRRES	IELGPN	PLDGAIT	SLWYDGG-----VA 176				
3	RICINA	TFAFGGN	YDRLEQ	LAGNLRE	NIELGN	GLEEAI	SALYYYSTGGTQLPTLA 200				
		210	220	230	240	250					
1	NIGRINA B	RSLLVVI	IQMVSE	AARFRY	IEQEVR	RSLQQAT	SFTP	NALMLSMENN	WSSMS 226		
2	EBULINA L	RSLLVLI	IQMVPE	AARFRY	IEQEVR	RSLQQLT	SFTP	NALMLSMENN	WSSMS 226		
3	RICINA	RSFIICI	QMISE	AARFYI	EGERM	TRIRYN	RRSAP	DP	SVITLENS	WGRLS 250	
		260	270	280	290	300					
1	NIGRINA B	LEIQQAG	NNVSP	FFGTVQ	LLNYD	HTRLVD	NFEELY	KITGIA	ILLFRC	SS 276	
2	EBULINA L	LEVQLS	GDNV	SPFSG	TVQLQ	NYDHT	PRLVD	NFEELY	KITGIA	ILLFRC	V 276
3	RICINA	TAIQES	--NQ	AFAS	PIQLQ	RRNGS	KFSVY	DVSIL	IP	--IALM	VYRCAP 296
		310	320	330							
1	NIGRINA B	-PSNDNA	IRMP	LDLAGE	DNKYN					297	
2	EBULINA L	TKTTHN	AIRMP	HVLVGE	DNKFN					298	
3	RICINA	PPSSQF	-----							302	

Figura 1.3. Estructura primaria de la cadena A de nigrina b deducida de la correspondiente secuencia de genes en comparación con las determinadas para ebulina l y ricina.

		10	20	30	40	50	
1	NIGRINA b	DGETCTLRTSFTRNIVGRDGLCVDVRNGYD	TDGTPQLWPCG--TQRNQR				48
2	EBULINA l	DGETCAIPAPFTRRIVGRDGLCVDVRNGYD	TDGTPQLWPCG--TQRNQQ				48
3	RICINA	-ADVCMDEPEIVR-IVGRNGLCVDVRDGRFHNGNAIQLWPCKSN	TANQL				48
		60	70	80	90	100	
1	NIGRINA b	WTFDSDDTIRSMGKCMTANGLNNGSNIVIFNCSTAAENA	IKWEVPIDGSI				98
2	EBULINA l	WTFYNDKTIRSMGKCMTANGLNSGSYIMITDCSTAAEDATKWEVLIDGSI					98
3	RICINA	WTLKRDNTIRSNKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATD	ATRWQIWDNGTI				98
		110	120	130	140	150	
1	NIGRINA b	INPSSGLVMTAPRAASRTIILLLEDNIYAASQGW	TVTNNVKPIVASIVGYK				148
2	EBULINA l	INPSSGLVMTAPSGASRTTLLLENNIHAASQGW	TVSNDVQPIATLIVGYN				148
3	RICINA	INPRSSLVLAATSGNSGTTLTVTQNIYAVSQGWLPTNNTQPFVTTIVGLY					148
		160	170	180	190	200	
1	NIGRINA b	EMCLQSNGENNGVWVWEDCEATSLOQQWALYGDRTIRVNST	RGLCVTTNGY				198
2	EBULINA l	EMCLQANGENNNVWVWEDCDVTSVQQQWALFDDRTIRVNN	SRGLCVTSNGY				198
3	RICINA	GLCLQAN--SGQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSN					196
		210	220	230	240	250	
1	NIGRINA b	NSKDLIIILKCQGLPS-QRWFN	SDGAI	VNPKSRHVM	DVRASNVSLREII		247
2	EBULINA l	VSKDLIVIRKCQGLAT-QRWFN	SDGSV	VNLKSTRVMDV	KESDVSLQEVI		247
3	RICINA	IRETVVKILSCGPASSGQRWMFKNDGTILNLYSGLVLDV	RASDP	SLKQII			246
		260	270	280			
1	NIGRINA b	IFPATGNPNQQWVTQVLPS					266
2	EBULINA l	IFPATGNPNQQWRTQVPQI					266
3	RICINA	LYPLHGDPNQIWLPLF---					262

Figura 1.4. Estructura primaria de la cadena B de nigrina, ebulina l y ricina. La disposición de los distintos dominios y cadenas es parecida a la de la ricina: un péptido señal en el extremo amino terminal de la cadena A, seguido por la cadena A completa, después un péptido de conexión que conecta el extremo carboxilo terminal de la cadena A con el extremo amino terminal de la cadena B y a continuación la cadena B.

Al determinar la estructura molecular por difracción de rayos X de cristales de ebulina l utilizando como ligando la D-galactosa a la escala de 2,8 Å, se comprobó que encaja perfectamente con la determinada a partir de la secuencia del gen correspondiente (Pascal y cols., 2001). El análisis

de dicha estructura ha permitido también el estudio de la interacción comparada de los derivados de galactosa con los sitios de unión en la cadena B de la ebulina y nigrina y de los sitios de unión en la cadena B con la ricina. La estructura molecular de ricina y nigrina/ebulina son muy similares. La cadena A es prácticamente idéntica en ricina y nigrina/ebulina, sin embargo, la cadena B presenta algunas diferencias.

La cadena B es la responsable de la fijación a receptores de membrana y por tanto de la conducción de la proteína a través del citoplasma. La cadena B posee dos dominios estructurales (1 y 2) y cada uno de ellos se encuentra dividido en tres subdominios (α , β y γ), de manera que existen seis subdominios en total. Los subdominios que según los estudios de cristalografía de rayos X tienen capacidad contrastada para fijarse a galactósidos serían el 1α y el 2γ (Rutenber y cols., 1987).

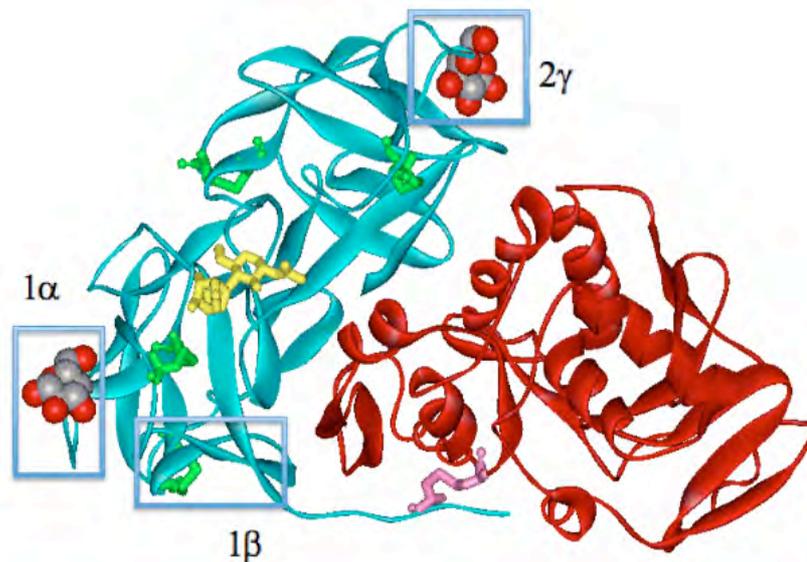


Figura 1.5. Estructura tridimensional de la ebulina I determinada por difracción de rayos X. Los cuadrados indican los sitios de fijación de azúcares, de alta afinidad 1α y 2γ el sitio 1β cuya significación todavía no está clara.

La secuencia aminoacídica en estos tres subdominios presenta algunas diferencias lo que hace que no se cumplan todos los requisitos para la óptima fijación de D-galactosa y por tanto la unión sea mucho más débil. En la figura 1.6. se muestra el subdominio 2 γ , el más importante en dicha unión, donde puede observarse que nigrina posee un resto Fen en la posición 249 mientras que la ricina posee una Tir.

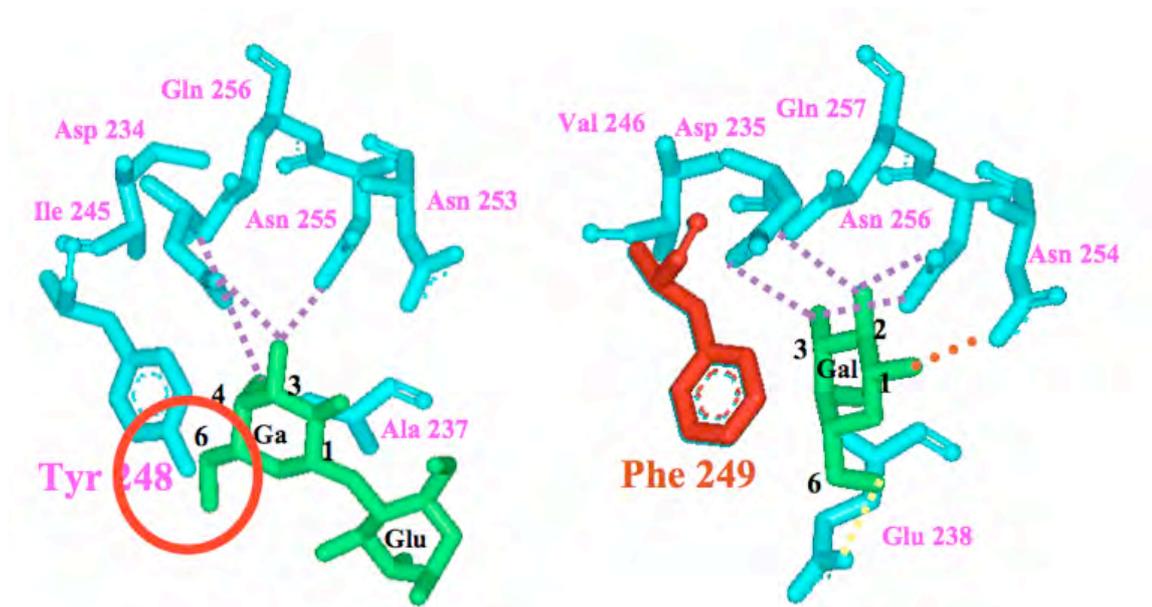


Figura 1.6. Detalle de la secuencia de aminoácidos y la conformación espacial del subdominio 2 γ de ricina y de nigrina o ebulina.

Es probable que la sustitución de Tir por Fen sea la responsable de la menor afinidad por galactosa de ebulina o nigrina y por lo tanto la capacidad de interactuar con receptores de tránsito a través del retículo endoplásmico como la ricina. De hecho se ha demostrado que la ricina se fija 5,7 veces más que la nigrina b a las células HeLa (Battelli y cols., 1997).

1.4.6. TRÁNSITO INTRACELULAR DE LAS LECTINAS ANTIRRIBOSÓMICAS VEGETALES SAMBUCUS

Las lectinas antirribosómicas (RIPs de tipo 2) ricina, abrina, volkensina, modicina, viscumina, lanceolina y stenodactylina, son extremadamente tóxicas para las células intactas debido a la presencia de la cadena B translocadora, que es capaz de internalizar al dímero atravesando la membrana celular al reconocer y unirse a receptores de membrana. Una vez internalizada, sigue ruta trans-Golgi en el citosol, en donde se disocia liberando la cadena A, que es la especie activa (Sandvig y Van Deurs, 2002; Lord y cols., 1994; Stirpe y cols., 2007).

Las moléculas de ricina se internalizan y después pasan por compartimentos endosómicos sensibles al NH_4Cl . Desde allí la ricina atraviesa compartimentos sensibles a temperatura que se bloquean a 18°C . Finalmente, la ricina es translocada en el aparato de Golgi en un proceso que es sensible a la brefeldina, droga conocida por su efecto desorganizador del aparato de Golgi (Battelli y cols., 1997).

La diferencia fundamental entre ricina y nigrina o ebulina reside únicamente en la cadena B, que es responsable de la interacción de estas RIPs con los receptores de membrana plasmática (Svinth y cols., 1998; Pascal y cols., 2001). En el caso de la nigrina y ebulina, la toxicidad es menor debido a la diferente afinidad de la cadena B por los galactósidos (Pascal y cols., 2001) de los receptores de membrana, y a que sigue una ruta intracelular distinta de la ricina y en vez de liberarse al citosol se degrada en los lisosomas de la célula.

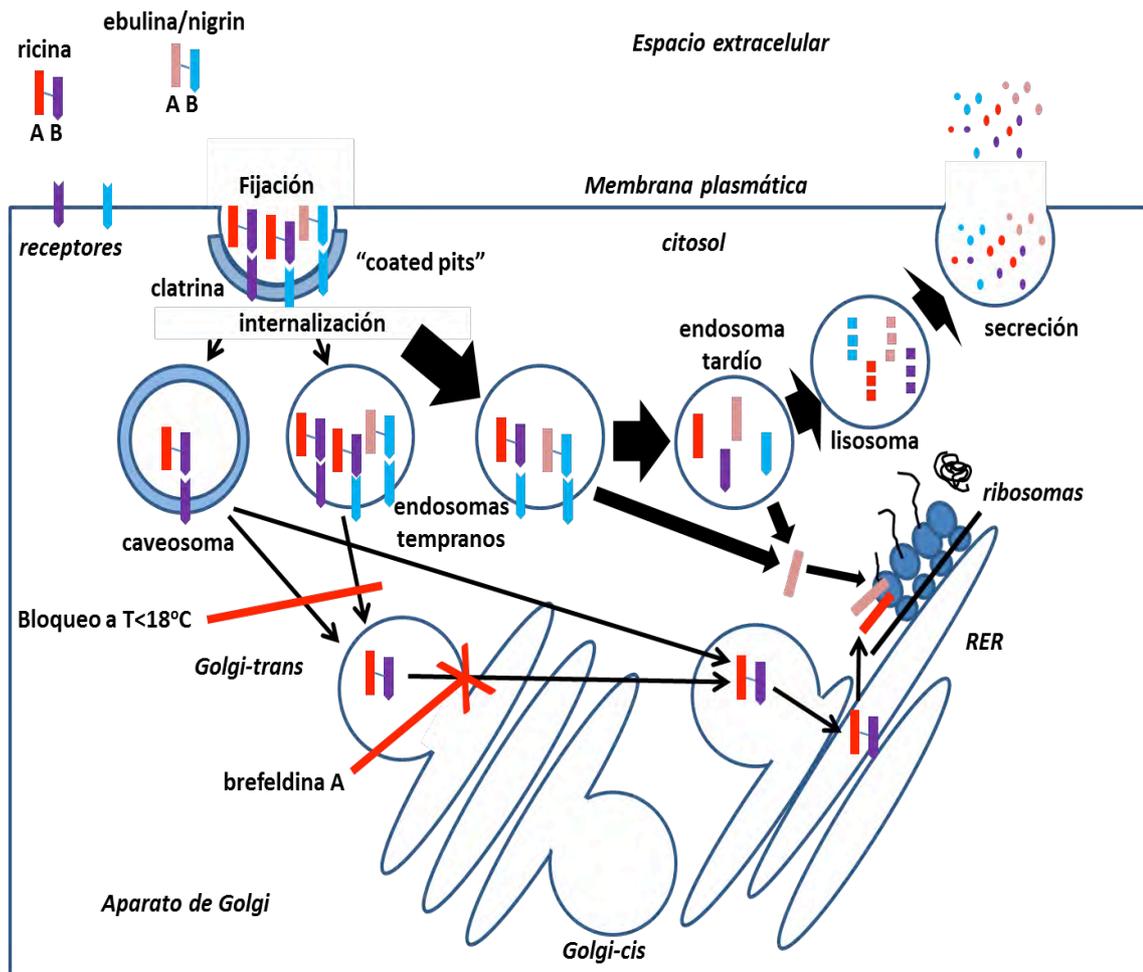


Figura 1.7. Rutas intracelulares seguidas por ebulina-nigrina y ricina. En la figura se muestra un modelo hipotético para las primeras etapas del tráfico intracelular de estas proteínas.

La mayor parte de la ricina internalizada se degrada totalmente en los lisosomas, por lo que solo unas cuantas moléculas logran alcanzar el citosol, a través del aparato de Golgi e inactivar los ribosomas. La nigrina se internaliza inicialmente también a través de endosomas sensibles a NH_4Cl y se degrada también en su mayor parte en los lisosomas, pero sin alcanzar el aparato de Golgi.

A partir de los endosomas, la ruta seguida por la nigrina b es diferente a la seguida por la ricina ya que los efectos antirribosómicos obtenidos a altas concentraciones son independientes de temperatura e insensibles a brefeldina. Prácticamente todas las moléculas de nigrina b son transportadas desde los endosomas hacia los lisosomas, donde se degradan (Battelli y cols., 1997; Battelli y cols., 2004).

Sólo a concentraciones 4 o 5 órdenes de magnitud superiores a la ricina se acumulan suficientes moléculas de nigrina en los endosomas como para que se produzca la translocación espontánea de nigrina desde el endosoma al citosol. La razón de la diferente ruta intracelular seguida por la nigrina puede estar en que los receptores de unión de ambas proteínas sobre la membrana plasmática, son diferentes (Muñoz y cols., 2001).

Además, la diferencia de toxicidad entre ricina y nigrina también podría estar relacionada con un hallazgo reciente, en el que la toxicidad de la ricina se ha atribuido a una actividad lipasa inherente a las subunidades A-B (Morlon-Guyot y cols., 2003). Dicha actividad ayudaría a algunas moléculas de ricina a alcanzar el retículo endoplasmático y finalmente el citosol. El lugar de actividad lipasa está conformado con residuos específicos pertenecientes a ambas subunidades de la ricina. La baja toxicidad de las lectinas antirribosómicas no tóxicas podría deberse también a la ausencia de este sitio con actividad lipasa (Morlon-Guyot y cols., 2003). La ausencia de esta actividad lipasa forzaría a la ebulina y nigrina a seguir únicamente la ruta degradativa lisosómica.

1.4.7. MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR ANTIRRIBOSÓMICO DE LAS RIPS

A pesar de que la ricina se descubrió en 1888 por Stillmark (Olsnes, 2004), no fue hasta 1987 cuando se elucidó el mecanismo molecular mediante el cual la ricina y otras RIPS ejercen su efecto sobre el ribosoma. La ricina y las toxinas Shiga actúan como N-glicosidasas sobre el ARN mayor de los ribosomas de mamíferos y, en algunos casos, de plantas, bacterias y hongos (Barbieri y cols., 1993; Stirpe y Battelli, 2006).

El mecanismo de acción esquematizado en la figura 1.8. es similar en todos estos sistemas y transcurre mediante un proceso de depurinación o hidrólisis del ácido ribonucleico ribosómico mayor del ribosoma.

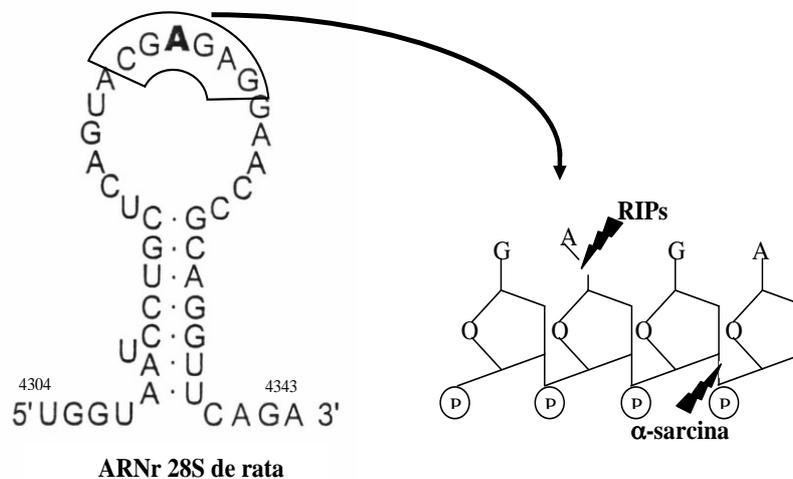


Figura 1.8. Secuencia de nucleótidos del bucle del rARN responsable de la interacción del factor de elongación 2. En la parte izquierda se muestra la estructura secundaria del rARN 28S de la subunidad 60S del ribosoma de la ratona sobre el que actúan las lectinas antirribosómicas. El blanco específico es el enlace N-glicosídico que une la adenina resaltada en negro (A_{4324}) con el esqueleto poli-ribosafosfato del rARN; el rARN depurinado no interacciona con el factor y por tanto la etapa de translocación se bloquea.

Etapa afectada de la biosíntesis de proteínas

La elongación de las cadenas polipeptídicas es un complejo proceso (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007; Youngman y Green, 2007; Wilson y Nierhaus, 2006), que consta de tres etapas parciales (figura 1.9.):

- a) fijación de aminoacil-tRNA al sitio ribosómico aceptor o sitio A, que se encuentra vacío,
- b) formación del enlace peptídico entre el peptidil-tRNA presente en el sitio ribosómico donador, o sitio P, y el aminoacil-tRNA presente en el sitio ribosómico aceptor,
- c) translocación del nuevo peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P, que cursa con la eyección del tRNA deacilado presente en el sitio P y el avance del ribosoma respecto al ARN mensajero en la longitud de un codón.

La fijación de aminoacil-tARN se produce en forma de complejo ternario con factor de elongación 1 en eucariontes y Tu en procariontes, y GTP con una estequiometría es de 1:1:1. En este proceso se hidroliza GTP a GDP y ortofosfato, utilizándose la energía liberada en la separación rápida de los factores de elongación 1 o Tu.

En los casos bien estudiados se trata de la eliminación de al menos una adenina (A₄₃₂₄ en el rARN 28S de rata) responsable de la interacción del factor de elongación 2 (EF-2) en eucariotas o G (EF-G), en procariotas, en ambos caso en forma de complejos binarios factor-GTP (Iglesias y cols., 1993).

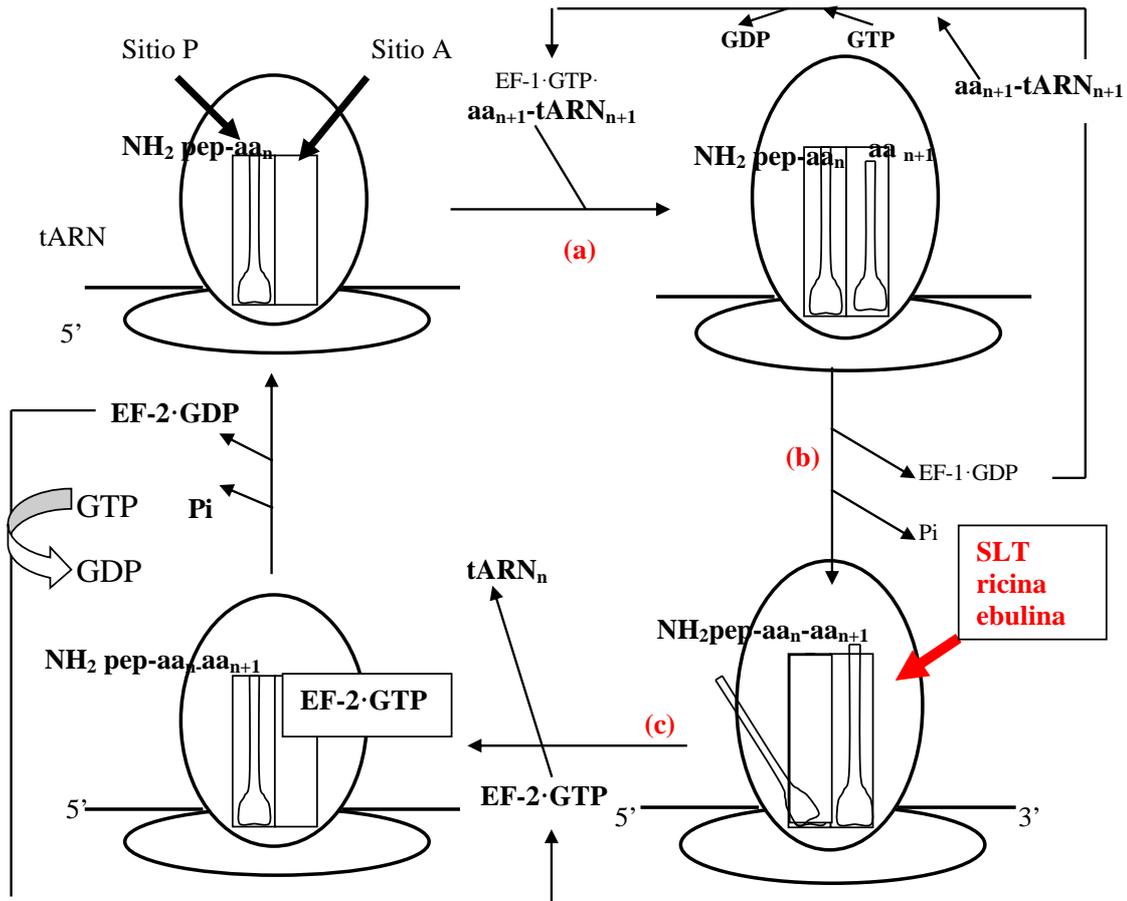


Figura 1.9. Elongación en la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos: etapa afectada por la acción catalítica de las proteínas inactivadoras de ribosomas nigrina, ebulina y ricina. La interacción de las RIPs con el ARN ribosómico mayor de la subunidad 60S, se produce porque actúan como N-glicosidasas, en concreto, actúan depurinando un bucle altamente conservado del rARN. Esto provoca la inactivación del ribosoma para permitir correctamente su interacción con complejo binario factor de elongación 2 (EF-2)-GTP, interrumpiendo así la síntesis de proteínas ya que no es posible la translocación del peptidil-tARN del sitio ribosómico aceptor (A) al sitio donador (P).

La adenina liberada está localizada en el centro de un bucle altamente conservado a lo largo de la evolución, tal y como se indica en la figura 1.10., en donde se presentan las secuencias nucleotídicas del rARN mayor de diversas especies animales, vegetales y microbianas.

Animales	
<i>Rathus norvegicus</i>	UGGU <u>AAUCCUGCUC</u> AGUACGAGAGGAACCGCAGGUUCAGA
<i>Homo sapien</i>	UGGU <u>AAUCCUGCUC</u> AGUACGAGAGGAACCGCAGGUUCAGA
<i>Xenopus laevis</i>	UAGU <u>AAUCCUGCUC</u> AGUACGAGAGGAACCGC <u>ACCUUC</u> AGA
Levaduras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UAGU <u>AAUUGAACUC</u> AGUACGAGAGGAACAGC <u>ACCUUC</u> GGA
Plantas	
<i>Cucumis melo</i>	CAGU <u>AAUUCAACCU</u> AGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCGGA
<i>Cucumis sativus</i>	UAGU <u>AAUUCAACCU</u> AGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCACA
<i>Triticum aestivum</i>	CAGU <u>AAUUCAACCU</u> AGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCACA
<i>Vicia sp.</i>	UAGU <u>AAUUCAACCU</u> AGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCACA
Bacterias	
<i>Escherichia coli</i>	GGGGGGCUGC <u>UCCUAGUAC</u> GAGAGGACCGGAGUGGACGCA
<i>Agrobacterinm tumefacilus</i>	CAGGAUCUGUCC <u>CUAGUAC</u> GAGAGGACCGGGAUGGACAUA
<i>Streptomyces lividans</i>	GAAGGGCUGUCC <u>CUAGUAC</u> GAGAGGACCGGGACGGACGAA

Figura 1.10. Secuencias homólogas pertenecientes a ribosomas sensibles a la acción de las RIPs. Los nucleótidos subrayados a la derecha de la adenina son complementarios de los situados a su izquierda (Ferrerías y cols., 2000).

La adenina afectada por estas proteínas es adyacente al sitio de actuación de un grupo de ARNasas de hongos altamente específicas, como la α -sarcina de *Aspergillus giganteus* (Endo y Wool, 1982), y las restrictocina y mitogilina de *Aspergillus restrictus* (López-Otín y cols., 1984; Fando y cols., 1985). En estos casos, la síntesis de proteínas también resulta inhibida de manera irreversible, al igual que ocurre con las proteínas inactivadoras de ribosomas SLT de *Escherichia coli*, ricina de *Ricinus communis* y ebulina de *Sambucus ebulus*. Aunque la eliminación de una adenina es condición necesaria, existen RIPs que eliminan más de una adenina, si bien no se sabe que significación funcional pudiera tener este proceso de multidepuración (Iglesias y cols., 1993).

1.4.8. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE NIGRINA B

La nigrina b administrada por vía intravenosa a ratones a dosis letales de 16 mg/kg, produce una mortalidad similar a la producida por ricina a dosis de 8 µg/kg (Gayoso y cols., 2005). Un estudio histológico detallado realizado tras la administración intravenosa de dosis sub-letales de nigrina b (5 mg/kg de peso corporal) demostró que 24 h después de la administración, los daños se producían específicamente a nivel intestinal, provocado daños reversibles en las criptas del intestino delgado. Las células dañadas se localizan en el tercio medio mientras que el epitelio de los villi no resulta afectado.

Después de tres días, las criptas del intestino delgado recuperan su epitelio mientras que los villi pierden su epitelio y a la vez lo recuperan por la base. En este tiempo el intestino grueso está muy dañado y gran parte de su epitelio se ha desprendido (Gayoso y cols., 2005).

1.5. VITAMINA B₆

La vitamina B₆ actúa como cofactor en muchas rutas bioquímicas vitales para el metabolismo de aminoácidos o lípidos así como para la síntesis de neurotransmisores, histamina, hemoglobina y otros procesos biológicos (Combs, 2008). El hombre no es capaz de sintetizar dicha vitamina por lo que ha de obtenerla de la dieta y del metabolismo de la flora saprofita de intestino grueso.

El aislamiento y cristalización de la vitamina B₆ fue realizada en 1938 y su estructura fue propuesta en 1939. Bajo el término vitamina B₆ se engloban en realidad diversas entidades químicas, todas ellas con similar actividad y que erróneamente se denominan también de manera genérica como piridoxina.

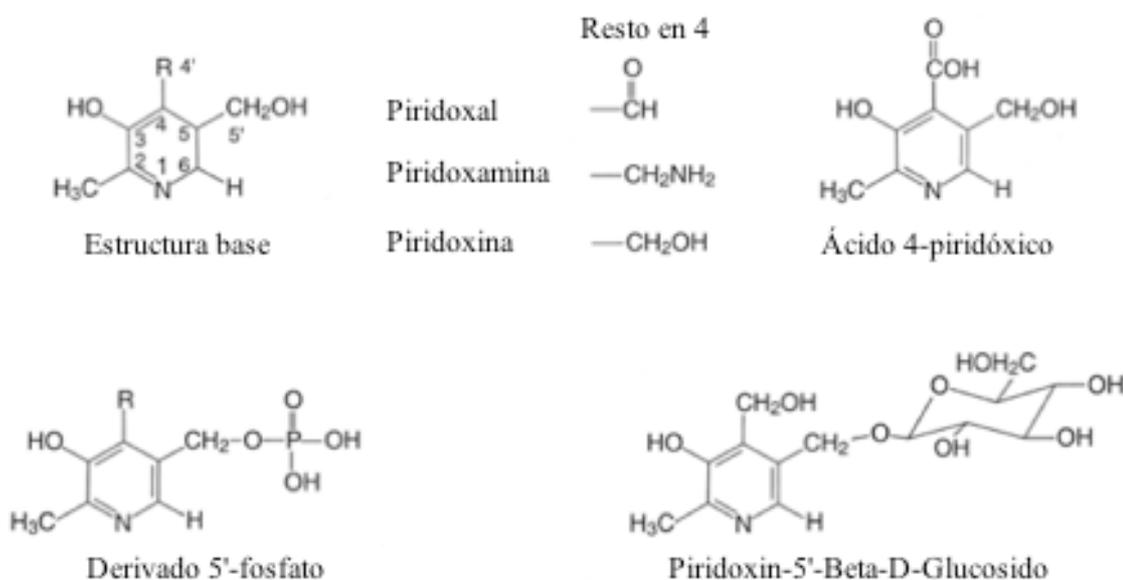


Figura 1.11. Vitámeros de la vitamina B₆, metabolito principal de la vitamina B₆ y forma en la que se encuentra dicha vitamina en las plantas.

La vitamina B₆ existe como tres vitámeros derivados de la 2-metil-3-hidroxi-5-hidroximetil-piridina que en posición cuatro puede estar sustituida por un grupo hidroximetil (piridoxina -PN- o piridoxol), un aldehído (piridoxal -PL-) o un grupo aminometil (piridoxamina -PM-). Los tres vitámeros coexisten de manera fisiológica con su homólogo 5'-fosfato. La vitamina B₆ de origen vegetal aparece habitualmente como piridoxina-5'-d-glucósido. El ácido 4-piridóxico (4-PA) es el principal metabolito inactivo de la vitamina B₆.

1.5.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA VITAMINA B₆

Las necesidades diarias de piridoxina se cubren suficientemente con 2-3 mg/día; así, la dosis diaria recomendada oscila entre 1,4-2,1 mg/día, aunque los requerimientos aumentan durante el embarazo y la lactancia. Con toda seguridad, su aporte es deficitario en el alcohólico con problemas de nutrición.

Debe administrarse a pacientes que reciben tratamiento con fármacos que alteran la actividad de la piridoxina: isoniazida, cicloserina, penicilamina, hidralazina y estrógenos, aumentando la dosis hasta 50 mg/día.

Hay una anemia sideroblástica que responde a la piridoxina, requiriendo dosis muy altas: 50-5000 mg/día, lo cual supone una dosis de hasta 67 mg/kg para un individuo medio de 75 kg de peso (Bor y cols., 2003).

En los errores congénitos del metabolismo caracterizados por homocistinuria, aciduria xantinúrica y cistationinuria, se necesitan también dosis altas de piridoxina.

Jurna y cols. (1990) demostraron en estudios realizados con dosis de vitamina B₆ de 189 mg/kg frente a la asociación de B₁, B₆ y B₁₂ comercializada como Neurobion[®], que la vitamina B₆ sola es capaz, con una ED₅₀ de 40 mg/kg, de disminuir la actividad nociceptiva en neuronas de tálamo, aconsejándose su asociación a morfina y derivados en este tipo de tratamiento.

1.5.2. REACCIONES ADVERSAS DE LA VITAMINA B₆

Diversos estudios pusieron de manifiesto que dosis altas de vitamina B₆ provocaban efectos neurotóxicos de diversa severidad si bien los datos obtenidos no eran concluyentes. La mayoría de los efectos neuronales observados como consecuencia de la sobredosis de vitamina B₆, son muy similares a los observados por su deficiencia. Este hecho ha sido relacionado con bajos niveles plasmáticos de PLP por sobredosis, un aumento de PLP en glóbulos rojos así como un aumento de la alanina amino transferasa de estas células, un descenso de la PLP muscular, y un aumento de la PL y vitamina B₆ total en riñón, plasma y eritrocitos, con un aumento de la actividad fosforilasa (Schaeffer y cols., 1989).

Bender (1999), en una revisión que ha servido de referencia a los toxicólogos, estableció que dosis orales de vitamina B₆ < 500 mg/día no provocan signos de neuropatías, mientras que dosis > 1000 mg/día si que estaría demostrado que provoca una neuropatía sensorial o síndromes neuropáticos, con inestabilidad de la marcha, adormecimiento de pies, manos y región perioral.

Estudios más recientes elaborados por Fukuwatari y cols., (2009) demuestran que la NOAEL de la PN-HCl es de 90 mg/kg/día y la LOAEL se corresponde con dosis orales de 450 mg/kg/día. Por otra parte, se ha establecido una LD₅₀ de 5,5 g/kg.

1.5.3. PRINCIPALES ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DE LA VITAMINA B₆

ABSORCIÓN

Tras su administración oral, la absorción intestinal de la vitamina B₆ se piensa que tiene lugar en el yeyuno mediante un mecanismo de difusión pasiva no saturable de las formas no fosforiladas (Leklem, 1991).

Sin embargo, los estudios realizados por Said y colaboradores (2003, 2004 y 2008) han puesto de manifiesto que además de este mecanismo pasivo, existe un segundo mecanismo de transporte activo saturable mediado por receptores tanto en intestino delgado como intestino grueso, regulado por factores extra e intracelulares y que posee las siguientes características:

- implica el intercambio de protones,
- se ve favorecido por el pH ácido,
- aumenta la temperatura en cultivos celulares,
- implica un consumo de energía,
- es independiente del Na⁺,
- está mediado por una proteína quinasa intracelular,
- es sensible a amilorida.

Sakurai y colaboradores (1988) marcaron radiactivamente PN, la administraron vía oral a ratones y analizaron los seis vitámeros en porta y sangre periférica, poniendo de manifiesto que tras la administración de dosis de 1,4-14,0 nmol/L de [H³]-PN, la cantidad circulante de PN es insignificante mientras que dosis de 46-140 nmol/L demostraban la presencia de PN junto a PL y PLP.

DISTRIBUCIÓN

La vitamina B₆ en su forma de piridoxal, constituye aproximadamente el 80% de los diferentes vitámeros en circulación sanguínea y de esta manera se distribuye ligada a la albúmina plasmática o al grupo hemo de los eritrocitos (Ink y cols., 1982; Coburn y cols., 1988). Anderson y colaboradores (1989) demostraron que tras la administración intravenosa en humanos de dosis de PN comprendidas entre 8-22 mg, aproximadamente el 60% era captada por los eritrocitos en un minuto y en tan sólo en tres minutos los niveles volvían a ser similares a los basales como consecuencia de la transformación en PL y su distribución a otros tejidos.

Por otra parte se ha puesto de manifiesto que la presencia de piridoxina ligada a los eritrocitos circulantes, si bien no aparece convenientemente descrito en la literatura consultada el mecanismo de inclusión a los eritrocitos, si se ha demostrado que su retención a este nivel se ve favorecida por una rápida fosforilación y unión a la hemoglobina (Fonda y Harker, 1982). Anderson y colaboradores (1989), han cuantificado la absorción y el aclaramiento de PN por parte de los eritrocitos demostrando que en torno al 50-60 % de la dosis de PN administrada vía oral aparece en un minuto en los glóbulos rojos.

El hígado es el órgano principal de la transformación de los vitámeros no fosforilados de la vitamina B₆ en sus formas fosforiladas. Para ello emplea una quinasa que usa ATP y zinc como cosustrato. El paso de piridoxamina fosfato (PMP) y piridoxina fosfato (PNP) a piridoxal fosfato (PLP), se realiza por mediación de una fosfatasa oxidasa hepática

fuertemente regulada para evitar una producción excesiva de PLP. La defosforilación de todos los vitámeros a nivel hepático y en el resto del organismo se lleva a cabo por fosfatasas no específicas (McCormick y Chen, 1999; Merrill y Henderson, 1990; Van Hoof y De Broe, 1994; Fonda, 1992). El principal metabolito de la vitamina B₆ es el ácido 4-piridóxico.

Como ya se ha comentado, el piridoxal (PL) y el PLP son las vitámeros preponderantes de las formas circulantes de vitamina B₆. Su ciclo se ha descrito usando un modelo compartimental que incluye cinco compartimentos: músculo, hígado, plasma, eritrocitos y el resto de tejidos (Coburn, 1990).

La concentración total de vitamina B₆ en una persona adulta se ha estimado en 1000 µmol del cual aproximadamente el 80% se encuentra en el músculo en forma de PLP. En general se asume que niveles plasmáticos de PLP superiores a 20 nmol/L implican un nivel de vitamina B₆ adecuado en el individuo (Food and Nutrition Board, 1998).

EXCRECIÓN

La semivida de la PN ha sido estimada en 15-25 días. El metabolito principal es el ácido 4-piridóxico (4-PA) aunque es frecuente la aparición de otros metabolitos secundarios. La vitamina B₆ se excreta además en heces, pero es difícil determinar en que porcentaje debido a la producción de B₆ por la flora bacteriana.

1.6. MODELOS QUÍMICOS DE DAÑO-REGENERACIÓN INTESTINAL EN RATÓN

Los daños intestinales ocasionados en humanos por las enfermedades inflamatorias intestinales incluyen daño intestinal, sangrado rectal, diarrea, pérdida de peso, alteraciones oculares y epidérmicas entre otras alteraciones (Matarese y Steiger, 2006). A nivel molecular estas enfermedades conllevan cambios en la mucosa intestinal, por ejemplo, en la enfermedad de Crohn se produce una reducción en las defensinas producidas por las células de Paneth (Wehkamp y cols. 2005), concomitante con la reducción de la autofagia en las células de Paneth (Klionsky, 2009) y una serie de alteraciones en proteínas tales como cadherinas e integrinas entre otras (Zab y cols., 2004). Resulta lógico pensar que las alteraciones en la mucosa producen procesos de malabsorción de nutrientes y fármacos.

Para poder abordar los estudios sobre los mecanismos de desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales y las terapias más adecuadas, se han desarrollado modelos animales que reproducen o mimetizan en cierto modo las patologías humanas de origen intestinal. Los modelos animales de inflamación y patología intestinal utilizados en la actualidad son de tipo químico, es decir, se administra un compuesto químico tóxico por vía oral (dextran sulfato sódico- DSS) o rectal (ácido 2,4,6-trinitro benceno sulfónico-TNBS y oxazolona) y después de un cierto tiempo el animal desarrolla una colitis que se utiliza como modelo de patologías humanas de tipo inflamatorio tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Wirtz y cols., 2007).

El modelo más utilizado actualmente es el que utiliza TNBS. Este modelo ha resultado útil para el estudio de los efectos de la fibra sobre la recuperación de la mucosa colónica y la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias (Rodríguez-Cabezas y cols., 2002) y los efectos de péptidos antiinflamatorios urocortina y adrenomedulina (Gonzalez-Rey y cols., 2006). Los tres modelos químicos provocan un efecto difícilmente reversible y en la mayor parte de los casos irreversible, derivada de la agresión de la mucosa desde el lumen intestinal.

El modelo de nigrina b en ratones es de tipo enzimático, se realiza desde el plasma, es reversible y se solapa con el ciclo fisiológico de destrucción regeneración de la mucosa intestinal. Por ello creemos que es un modelo ideal para el estudio comparativo con los modelos químicos y para el estudio de la regeneración intestinal por la simple razón de que la nigrina b produce ablación solo de células de las criptas que están en proceso de diferenciación y migración sin afectar a los otros tipos celulares, fundamentalmente enterocitos.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La reversibilidad de los efectos de la administración intravenosa de nigrina b a ratones llevó a considerar la posibilidad de que dichos efectos pudieran constituir un modelo de daño-regeneración intestinal diferente al de los modelos químicos. El modelo de nigrina b en ratones es de tipo enzimático, se realiza desde el plasma, es reversible y se solapa con el ciclo fisiológico de destrucción regeneración de la mucosa intestinal.

Nuestra hipótesis de trabajo de partida fue que la administración intraperitoneal de nigrina b a los ratones, produce un cuadro intestinal reversible que puede utilizarse para estudiar la absorción de nutrientes y fármacos. Por ello creemos que es un modelo ideal para el estudio comparativo con los modelos químicos y para el estudio de la regeneración intestinal por la simple razón de que la nigrina b produce ablación solo de determinada células de las criptas que están en proceso de diferenciación y migración sin afectar a los otros tipos celulares, fundamentalmente enterocitos y células de Paneth.

En base a la información presentada en la introducción se plantearon los siguientes objetivos generales:

1. Obtener y caracterizar la nigrina b de *Sambucus nigra* L utilizando corteza seca como material de partida.
 2. Caracterización del daño-regeneración intestinal promovido por la administración intraperitoneal de nigrina b como modelo intestinal reversible.
 3. Desarrollar un procedimiento de determinación de vitamina B₆ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
 4. Aplicación del modelo de administración intraperitoneal de nigrina b a la absorción de nutrientes o fármacos, en este caso la vitamina B₆.
-

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS

Todos los reactivos utilizados en este trabajo han sido de la mayor pureza disponible en el mercado.

REACTIVO	ORIGEN
Acetato de sodio	Merck
Acetato de magnesio	Merck
Acetonitrilo	Merck
Acetonitrilo (HPLC-Isocrático 254nm)	Scharlb
Acido acético	Merck
Acido bórico	Boehringer
Acido clorhídrico	Merck
Acido etilendiamino tetracético	Merck
Acido trifluoracético	Merck
Acido tricloroacético	Carlo Erba
Acrilamida	Amresco
Albúmina sérica bovina	Boehringer
Anhidrasa carbónica	Boehringer
Azida sódica	Merck

Azul de bromofenol	Sigma
Azul de Evans	Sigma
Bisacrilamida	Amresco
Bicarbonato potásico	Merck
Bicarbonato sódico	Merck
Carbonato sódico	Merck
Clorhidrato de piridoxina	Disproquima
Cloruro de magnesio	Merck
Cloruro potásico	Sigma
Cloruro sódico	Merck
Coomassie Brilliant-Blue R-250	Sigma
Dodecil sulfato de sodio	Merck
Etanol	Merck
Fosfato monopotásico	Merck
Fosfato monosódico	Merck
D-Galactosa	Sigma
Hidróxido sódico	Sigma
Hidróxido potásico	Sigma
Inhibidor de tripsina	Sigma
Lactosa	Sigma
L-Glutamato deshidrogenasa	Sigma

Metanol	Merck
Metanol (HPLC-Isocrático 254nm)	Scharlb
2-Mercaptoetanol	Merck
Piridoxamina estándar HPLC	Sigma
Persulfato amónico	Sigma
Reactivo de Folin	Merck

Todas las soluciones se preparan con agua Mill-Q (Millipore) y se esterilizan cuando es necesario en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

3.1.2. MATERIALES BIOLÓGICOS

3.1.2.1. Vegetales

Para la obtención de la nigrina b se recolectaron ramas de *Sambucus nigra* L. en los meses de primavera en la localidad de Mansilla de las Mulas (León).

3.1.2.2. Animales de experimentación

Se han empleado ratones blancos tipo Swiss, hembras de aproximadamente 30 g de peso de entre 6-7 semanas mantenidos con pellets Harlam 2014 y acceso libre a agua hasta su sacrificio.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. **OBTENCIÓN DE NIGRINA DE LA CORTEZA DE *SAMBUCUS NIGRA* L.**

3.2.1.1. Proceso de extracción

Las ramas utilizadas fueron de 2,5 cm de diámetro como máximo y la corteza secundaria se obtuvo de manera mecánica con ayuda de una cuchilla, tal y como se indica en la figura 3.1. La corteza secundaria es la de color verde. La corteza gris es suberosa y no contiene material vivo. Al cortar la corteza secundaria se arrastra la primaria y algo de material celulósico que no interfieren en el proceso de extracción.



Figura 3.1. Corte de corteza secundaria de *S. nigra* utilizada para la obtención de nigrina b.

La corteza obtenida se dejó secar en condiciones ambientales, con aireación continua y volteos periódicos. La corteza se pulverizó en el momento de su uso en un molinillo de café convencional a bajas revoluciones para no incrementar la temperatura del material.

A partir del material pulverulento se realiza el siguiente protocolo:

- A. Mezclar 100 g de material pulverulento con 1200 mL de medio extractor (NaCl 0,14 M, fosfato monosódico 5 mM (pH=7,5)) y dejar en agitación constante a 4°C durante 12 horas.
- B. Clarificación del extracto a través de una malla doble de nylon, manteniendo el filtrado en un baño de hielo hasta finalizar el proceso. De esta manera se elimina el material grosero y se obtiene un filtrado más limpio para los procesos sucesivos, optimizando notablemente el rendimiento del proceso.
- C. Centrifugación durante 45 min. a 3500 r.p.m. a 2°C en una centrífuga Digicen-R y obtención del sobrenadante.
- D. Centrifugación del sobrenadante anterior durante 30 min. a 3500 r.p.m. a 2°C en el mismo equipo y obtención del sobrenadante.
- E. Filtración del sobrenadante final a través de un filtro de celulosa de doble capa (Anoia de 73 g/m²) y obtención del extracto crudo final (850 mL).

3.2.1.2. Aislamiento de las lectinas de la corteza de *S. nigra*

Este método somete el extracto obtenido en el proceso anterior a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de flujo rápido de Sepharose. Este polímero posee partículas de agarosa que una vez activadas en medio ácido dejan restos libres de D-galactosa a los que se unirán proteínas con afinidad por este azúcar.

3.2.1.2.1. Preparación del relleno cromatográfico

El protocolo de preparación del gel que se siguió es el siguiente:

- A. Se parte de 200 mL de gel AT-Sepharose 6B (Ref.: GE-17-0110-01; Pharmacia GE) y se elimina el etanol mediante succión a vacío.
 - B. Se incorporan en agitación moderada 200 mL de agua Milli-Q, y se deja sedimentar para mediante vacío para eliminar el etanol.
 - C. Se repite el punto anterior cuatro veces más para asegurar la correcta eliminación del etanol.
 - D. Sobre el volumen de gel de AT-Sepharose 6B remanente, incorporar el mismo volumen de HCl 0,2M e introducir la mezcla resultante en un baño termostático a 50°C durante 3 horas. Remover de cuando en cuando.
 - E. Se lava con el mismo volumen de agua Milli-Q dejando sedimentar la resina y desechando el sobrenadante. Repetir el proceso hasta que el pH esté entre 6,0 – 6,5 y almacenar a 4°C hasta su uso.
-

3.2.1.2.2. Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose 6B

Se disponen 200 mL del gel de AT-Sepharose 6B previamente activado en una columna GE-Pharmacia KX50 (5 x 15 cm) con camisa de refrigeración acoplada a un baño de agua-hielo con recirculación mediante bomba peristáltica.

Una vez equilibrado el sistema, se incorpora el extracto crudo y posteriormente se añade tampón salino (NaCl 0,28 M, fosfato monosódico 5 mM (pH=7,5)) hasta que la señal espectrofotométrica a 280 nm obtenida en las fracciones resultantes es menor a 0,1.

A continuación, se eluyen las proteínas con el mismo tampón salino al cual se le ha incorporado previamente lactosa 0,2M. Por último, las alícuotas de 10 mL obtenidas son concentradas hasta la mitad de su volumen en una celda de filtración Amicon equipada con una membrana YM-10.

3.2.1.2.3. Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75

La muestra obtenida en el apartado anterior, se carga en una columna Superdex 75 HiLoad 26/60 (preparative grade) de GE-Pharmacia previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 5 mM (pH 7,5) y NaCl 0,14 M a una velocidad de 2,5 mL/min. Se recogen fracciones 5 mL que se dializan por separado en agua Milli-Q (4L/12 h un total de cuatro pases), para eliminar los restos de sales y lactosa. Por último, las alícuotas obtenidas son concentradas en una celda de filtración Amicon equipada con una membrana YM-10.

3.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS

3.2.2.1. Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr

Para el cálculo de la concentración de proteínas en las fracciones obtenidas en las etapas de purificación y para el cálculo de la concentración de RIPs puras y extractos crudos, se ha utilizado la formula desarrollada por Kalb y Bernlohr (1977) basada en un procedimiento espectrofotométrico. Se aplica la formula siguiente:

$$C = 183 (A_{230} - A_{320}) - 75,8 (A_{260} - A_{320})$$

en donde C es la concentración de proteína expresada en $\mu\text{g/mL}$ y A_{230} , A_{320} y A_{260} , son las medidas de las absorbancias de la muestra a las longitudes de onda 230, 320 y 260 nm respectivamente, realizadas en un espectrofotómetro Thermo Helios- α .

3.2.2.2. Determinación de la actividad aglutinante de eritrocitos

El protocolo del ensayo es el siguiente:

- Disponer 50 μL de soluciones de proteína de concentraciones crecientes en una placa de 96 pocillos con el fondo redondo (Nunc).

 - Añadir en cada pocillo 50 μL de una suspensión de eritrocitos humanos del grupo 0 al 1% (v/v) en tampón (NaCl 0,14M, fosfato monosódico 5mM (pH=7,5)).
-

- Mezclar y dejar reposar a 25°C durante 20 minutos.

En los pocillos con concentraciones de proteína superiores a la mínima concentración necesaria para provocar la aglutinación de los eritrocitos, se apreciará una suspensión de aspecto rosado mientras que en el resto de pocillos los eritrocitos precipitarán formando un botón de coloración rojo intenso.

3.2.2.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

El método utilizado para la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (EGPA-SDS) es el de Laemmli (1970). Se utiliza un sistema de electroforesis miniVE-Amersham Biosciences con minigeles (70 x 80 x 0,75 mm) formados por dos fases con distinta concentración de poliacrilamida.

Para geles del 15% el gel separador se forma con una mezcla de un 14,6% (p/v) de acrilamida y un 0,4% (p/v) de bis-acrilamida, Tris-HCl 375 mM (pH=8,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,1% (p/v) y TEMED 0,07% (v/v). Por su parte, el gel de apilamiento o de “stacking” está formado por 3,9% (p/v) de acrilamida 0,1% (p/v) bis-acrilamida, Tris-HCl 125mM (pH=6,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,08% (p/v) y TEMED 0,08% (v/v).

Antes de su introducción al sistema electroforético, las muestras se incuban durante 5 minutos a 100°C en una solución formada por tampón Tris-HCl 62,5 mM (pH=6,8), SDS al 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) y 0,025% (p/v) de azul de bromofenol. Una vez las muestras son depositadas en los pocillos, se completa el volumen de los dos compartimentos de la

cubeta con tampón Tris-HCl 25 mM (pH=8,3), glicina 192 mM y SDS 0,1 %(p/v) y se aplica una corriente eléctrica de 25 mA de intensidad. El proceso se realiza a 20°C y finaliza cuando el frente alcanza el extremo inferior del gel.

Las bandas de proteínas, una vez terminada la electroforesis, se visualizan tiñendo los geles con una solución de azul de Coomassie brillante R-250 (azul de Coomassie R-250 al 1%, metanol, ácido acético, agua Milli-Q -12,5:50:10:100 v:v:v:v). La tinción se realiza con agitación suave durante dos horas.

Por último, se dispone el gel en solución decolorante compuesta por ácido acético, metanol y agua Helix-Millipore (10:10:80 partes en volumen) y se incuba en agitación suave durante 12 horas para eliminar el exceso de coloración y que sólo queden teñidas las proteínas, cambiando la solución decolorante tantas veces como sea necesario.

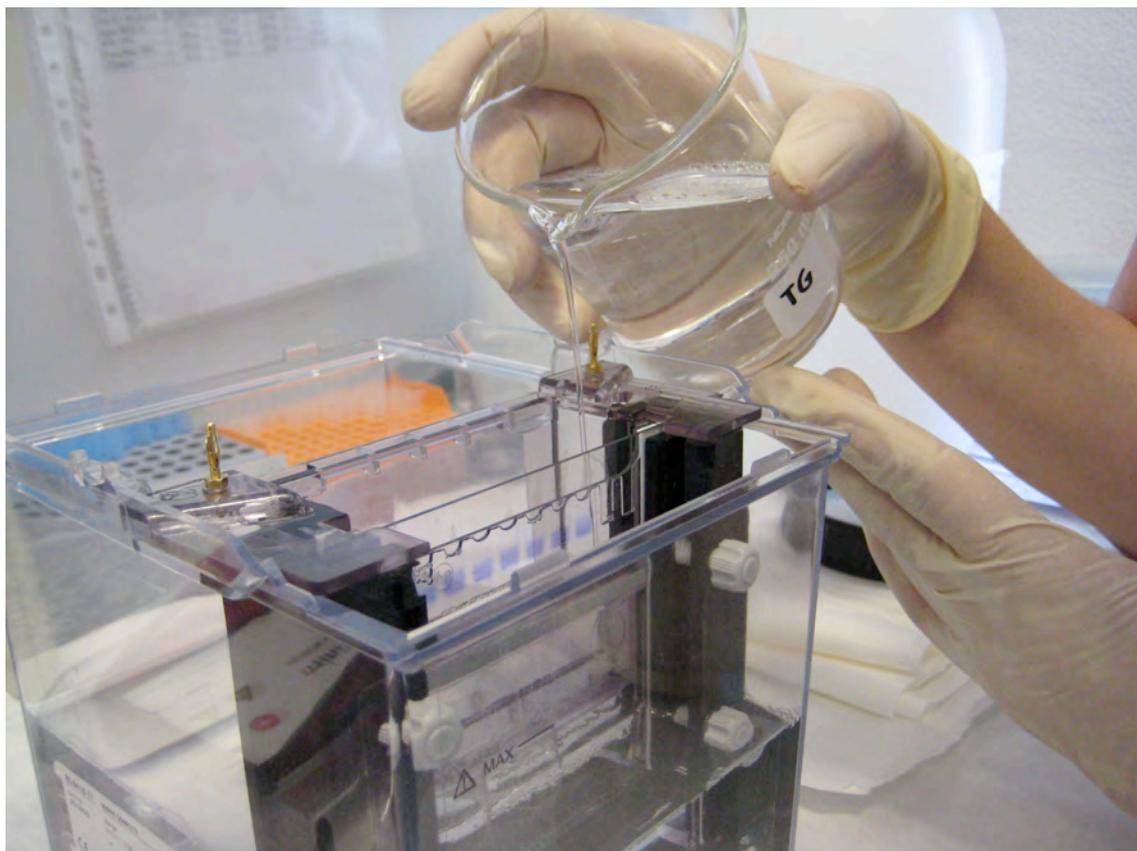


Figura 3.2. Detalle del sistema electroforético empleado

3.2.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Una vez sacrificado el animal, se le inyecta vía intraperitoneal 0,5 mL de solución de heparina al 1% y 0,5 mL de nitrito sódico al 1%. Posteriormente el animal es diseccionado, se le circula una solución tamponada de paraformaldehído al 4% para fijar los tejidos y se extraen muestras de intestino de aproximadamente 1 cm de longitud.



Figura 3.3. Equipo de histología utilizado del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología. Procesador automático de tejidos Leica TP-1020 (parte superior izquierda); sistema modular de inclusión Oxford Trade (parte superior derecha); micrótopo de rotación Microm (parte inferior).

El tratamiento de las muestras obtenidas consta de los siguientes pasos:

- Deshidratación de los tejidos por inmersión en etanol de graduación creciente en un procesador automático de tejidos Leica TP-1020 (Leica Microsystem GmbH).
- Aclaramiento con xilol en el mismo dispositivo.
- Infiltración del tejido en parafina e inclusión de la muestra en un sistema modular de inclusión Oxford Trade.
- Realización de los cortes histológicos en un micrótopo de rotación Microm (Microm International GmbH).
- Tinción hematoxilina- eosina.

3.2.4. TINCIÓN CON AZUL DE EVANS

En el estudio se utilizaron cuatro grupos de animales: control, 24 h, 48 h y 72 h. Cada grupo de animales se estabularon en una única jaula (n= 5), identificando cada animal con marcas en la oreja.

Día	Control	24 h	48 h	72 h
1	Ensayo	nig b	nig b	nig b
2	X	Ensayo	-----	-----
3	X	X	Ensayo	-----
4	X	X	X	Ensayo

Se utilizó el procedimiento que se indica a continuación.

1) Administración intraperitoneal de una solución de nigrina b (10 mg/kg) en todos los animales salvo aquellos pertenecientes al grupo control.

2) Dejar transcurrir el tiempo necesario a cada grupo según el diseño experimental antes de proceder como sigue:

- Retirada de la alimentación sólida.
- Ayuno de 2h.
- Administración I.V. en cola de 100 μ L de la solución de Azul de Evans al 5%.
- Distribución durante 1h. El animal tiene acceso ilimitado a agua pero no a alimento sólido.
- Sacrificio en cámara hermética por inhalación de isofluorano.
- Escisión quirúrgica del aparato digestivo desde el estómago hasta el ano, ambas porciones incluidas.
- Medición de la longitud del intestino delgado en su totalidad y del intestino grueso.
- Dividir el intestino delgado en tres porciones.
- Limpiar el contenido insuflando agua y ejercer presión con material romo si es necesario.
- Disponer las cinco partes (estómago, 1^{er} tercio de intestino delgado, 2^o tercio, 3^{er} tercio y colon).
- Introducir cada parte en 3 mL de dimetil formamida (DMF) y dejar extraer durante 12h.
- Medir la absorbancia de la solución resultante.

3) Contrastar las absorbancias problema frente a una recta de calibrado de azul de Evans en DMF.

3.2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El sistema cromatográfico modular que se ha empleado en este estudio está formado por los siguientes componentes:

- Desgasificador a vacío Shimadzu GT-154
- Módulo de mezcla para gradientes a baja presión Shimadzu FCV-10ALVP
- Bomba Shimadzu LC-10ADVP
- Válvula de inyección Rheodyne 7725i con un loop de 20 μ L
- Detector UV/Vis Shimadzu SPD-10AVP
- Controlador Shimadzu SCL-10AVP acoplado a un software Shimadzu Class-VP
- Colector de fracciones ISCO Foxy Jr.

Como fase estacionaria se empleó una columna C18 LunaTM RP 250 mm \times 4,6 mm (i.d.) de 5 μ m de tamaño de partícula con una precolumna C18 LunaTM de 4 mm \times 3 mm Phenomenex (Microm Analítica SA). Los parámetros fueron:

Temperatura de análisis: ambiente

Fase móvil: composición isocrática acetato amónico 0,05M:CH₃OH (75:25)

Flujo: 1,0 mL/min

Detección: 220 nm

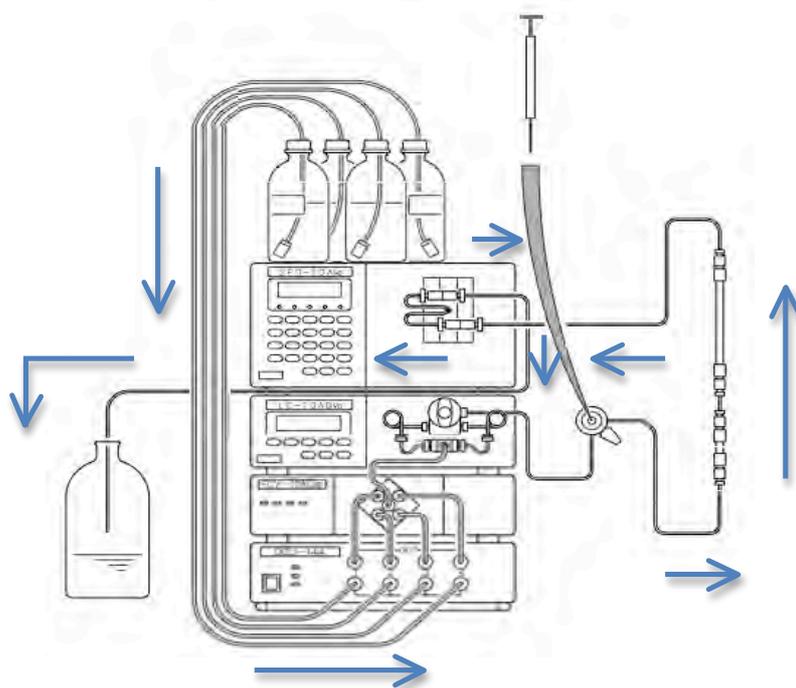


Figura 3.4. Esquema del sistema modular cromatográfico utilizado. Las flechas indican el flujo de solventes.

Todos los reactivos y disolventes utilizados en la optimización del método analítico fueron de calidad HPLC y fueron adquiridos a Scharlb SL (Madrid) o a Merck Group (Madrid). Se empleó un patrón de trabajo secundario de piridoxina que fue amablemente cedido por Disproquima SA con una pureza del 99,8 %. El agua utilizada fue agua ultrapura de grado laboratorio Milli-Q.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN DE NIGRINA DE LA CORTEZA DE *SAMBUCUS NIGRA* L.

La obtención de nigrina b por afinidad viene determinada por distintos factores (Girbés y cols., 1993b). Entre los más importantes están el proceso de extracción a partir de la corteza y la calidad de la cromatografía de afinidad.

En cuanto al proceso de extracción se partió de corteza seca de *Sambucus nigra* de primavera ya que en trabajos previos del grupo del profesor Girbés, se había determinado que la desecación de la corteza a temperaturas no superiores a 28°C permitía obtener nigrina b sin merma de la actividad biológica.

La corteza se trituró mecánicamente en un molinillo de café convencional obteniéndose fragmentos groseros. Como puede observarse después de la extracción con tampón (figura 4.1.-izquierda), quedan tres capas netamente definidas. La superior esta constituida por material suberoso celulósico y que por tanto flota, la segunda por un material más fino y la parte inferior por un extracto menos particulado con consistencia de jarabe. El proceso de clarificación a través de gasa permite eliminar las estaquillas y el material particulado grosero (figura 4.1. derecha), mientras que la centrifugación permite eliminar material particulado más fino y un mucílago blanquecino.



Figura 4.1. Detalle del proceso de extracción sobre la corteza de *S. nigra* para la obtención de nigrina b. En la parte izquierda se observa el extracto crudo obtenido en una de las preparaciones y en la parte derecha puede apreciarse como se ha realizado la clarificación del mismo.

En la figura 4.2. se muestra el detalle de una de las alícuotas del extracto crudo obtenido después de centrifugar, a los efectos de identificar las distintas capas y en particular, la capa de sedimento blanquecino que es un material mucilaginoso muy plástico y que se adhiere fácilmente a todo tipo de superficies y que mediante el procedimiento aquí utilizado se separa perfectamente aumentando, no solo el rendimiento, sino también la preservación de los materiales utilizados y las columnas de cromatografía.

Cuanto más limpio esté el extracto crudo de material particulado y mucílago plástico más eficaz será el proceso cromatográfico. En la figura 4.3. puede verse el aspecto de la columna antes de pasar el extracto (izquierda) y después pasar toda la muestra de extracto crudo (derecha).



Figura 4.2. Aspecto que ofrece el material centrifugado a partir del extracto crudo de corteza de *S. nigra* utilizada para la obtención de **nigrina b**. Izquierda: sobrenadante y sedimento sin separar; derecha: aspecto del sedimento.

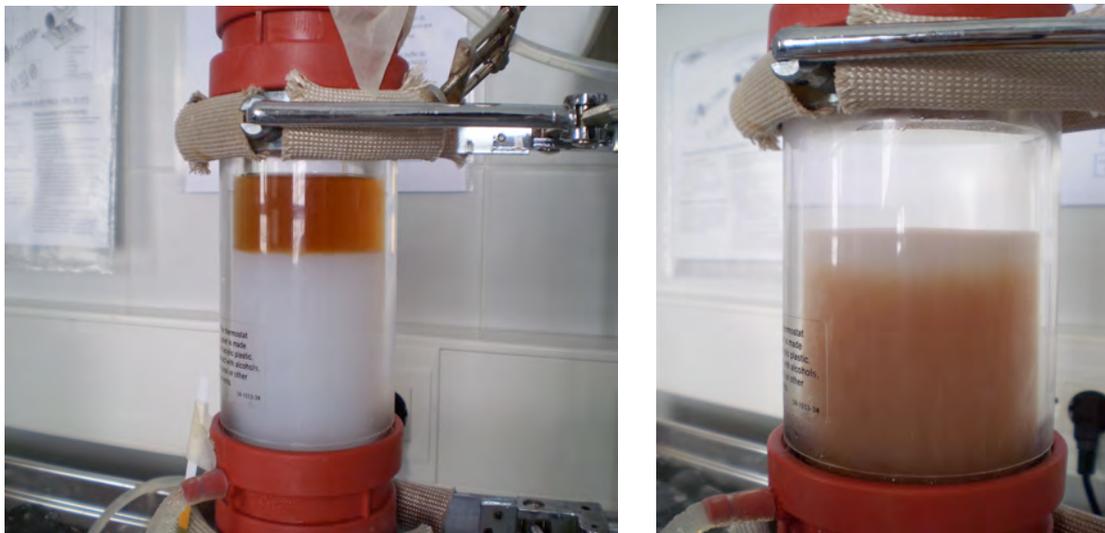


Figura 4.3. Columna GE-Pharmacia KX50 (5 x 15 cm) con camisa de refrigeración rellena con AT-Sepharose 6B. Izquierda: aplicación de la muestra; derecha: fin de la carga de proteína.

Como puede apreciarse, la resina queda perfectamente limpia sin material particulado en la superficie, tal y como queda aplicando el primer procedimiento de afinidad que se utilizó (Girbés y cols., 1993b).

La cromatografía de afinidad permite obtener un conjunto de lectinas específicas de D-galactosa como son SNA-I, SNA-II y nigrina b (Girbés y cols., 1993c) en contraste del procedimiento de aislamiento por intercambio iónico que permite aislar únicamente nigrina b (Ferrerías y cols., 2011).

Como puede observarse en la figura 4.4, el extracto contiene lectinas que se fijan a la resina AT-Sepharose 6B que contiene cadenas glucídicas con D-galactosa terminal y que al eluir con lactosa en el tampón se separa de la columna. El material que sale inicialmente de la columna está constituido por una proteína inespecífica que desaparece con la elución. Después aparece un pico relativamente simétrico constituido por las tres lectinas.

Esta cromatografía de afinidad debe realizarse entre 2-4°C para asegurar la máxima fijación de las proteínas a la resina. De hecho, se ha demostrado que la temperatura desempeña un papel importante en la interacción estable de las lectinas de *Sambucus ebulus* con la resina, siendo máxima en este intervalo e inexistente a 20°C (Citores y cols., 1998).

El eluato de la columna de afinidad se concentró en Amicon hasta unos 8 mL y se aplicó posteriormente a una columna de exclusión molecular Superdex 75. En el proceso de exclusión no afecta la presencia de lactosa.

Los resultados se indican en la figura 4.4. (parte inferior) en donde pueden apreciarse tres picos nítidamente diferenciados. El primero es la lectina antirribosómica SNA-I, el segundo es la lectina antirribosómica nigrina b y el tercero en salir de la columna es lectina no antirribosómica SNA-II. Las fracciones de cada pico se recogieron por separado excepto las fracciones que separan cada pico para reducir en la medida de lo posible la contaminación cruzada de las proteínas. Finalmente, cada proteína se dializó extensivamente frente a agua para eliminar la lactosa y finalmente se concentró y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Según hemos podido comprobar el procedimiento descrito en Materiales y Métodos permite eliminar la lactosa y preserva la actividad de las proteínas durante tiempo indeterminado. Por lo tanto, el proceso de congelación no afecta a la actividad de nuestras proteínas.

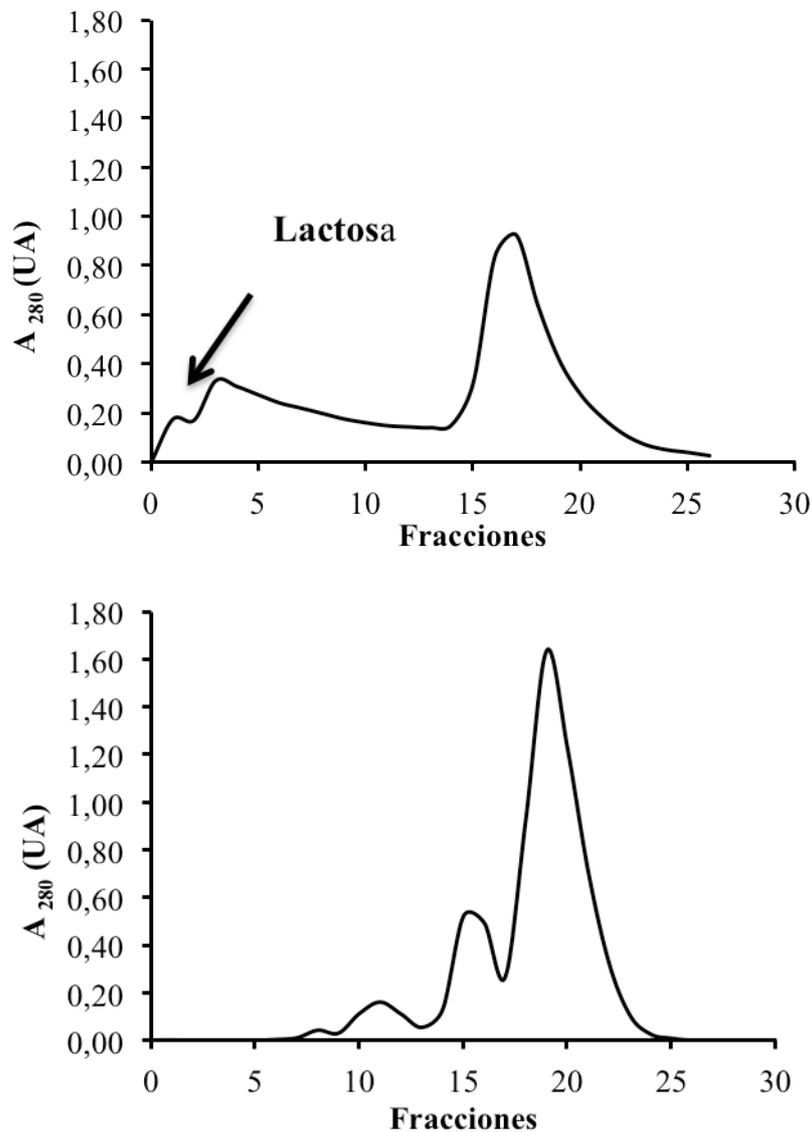


Figura 4.4. Cromatografía de los extractos crudos de *S. nigra* L. clarificados por centrifugación y filtrado. Parte superior: cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose 6B; la flecha indica la adición de lactosa. Parte inferior: cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75. La concentración de las proteínas SNA-I, SNA-II y nigrina b por el método de Kalb y Bernlohr ha sido 4,90, 18,89 y 15,97 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS

La caracterización de las lectinas de *Sambucus nigra* se realiza estructuralmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS a efectos de determinar la masa molecular relativa aparente (M_r) y funcionalmente mediante el análisis de la hemoaglutinación de sangre humana y la toxicidad en ratones (Girbés y cols., 1993a; Battelli y cols., 1997). La caracterización estructural permite además determinar la existencia de puentes disulfuro intracatenarios. La hemoaglutinación permite determinar la actividad lectina de las cadenas B de la SNA-I y de nigrina b así como la actividad de la SNA-II. El análisis de la toxicidad permite determinar fundamentalmente la actividad de la cadena enzimática o cadena A (actividad N-glicosidasa de los ácidos nucleicos).

4.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS DE *S. NIGRA* POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

La electroforesis se realizó con proteínas purificadas con concentraciones que permitiesen determinar con claridad, no solamente la M_r sino también su pureza (ausencia de contaminación cruzada con otras lectinas).

Como se indica en la figura 4.5. la nigrina se encuentra a homogeneidad electroforética y en presencia de 2-mercaptoetanol se reduce a las cadenas

A (Mr 26000) y B (Mr 32000). La cadena B se tiñe más que la cadena A aún siendo la nigrina un dímero A-B.

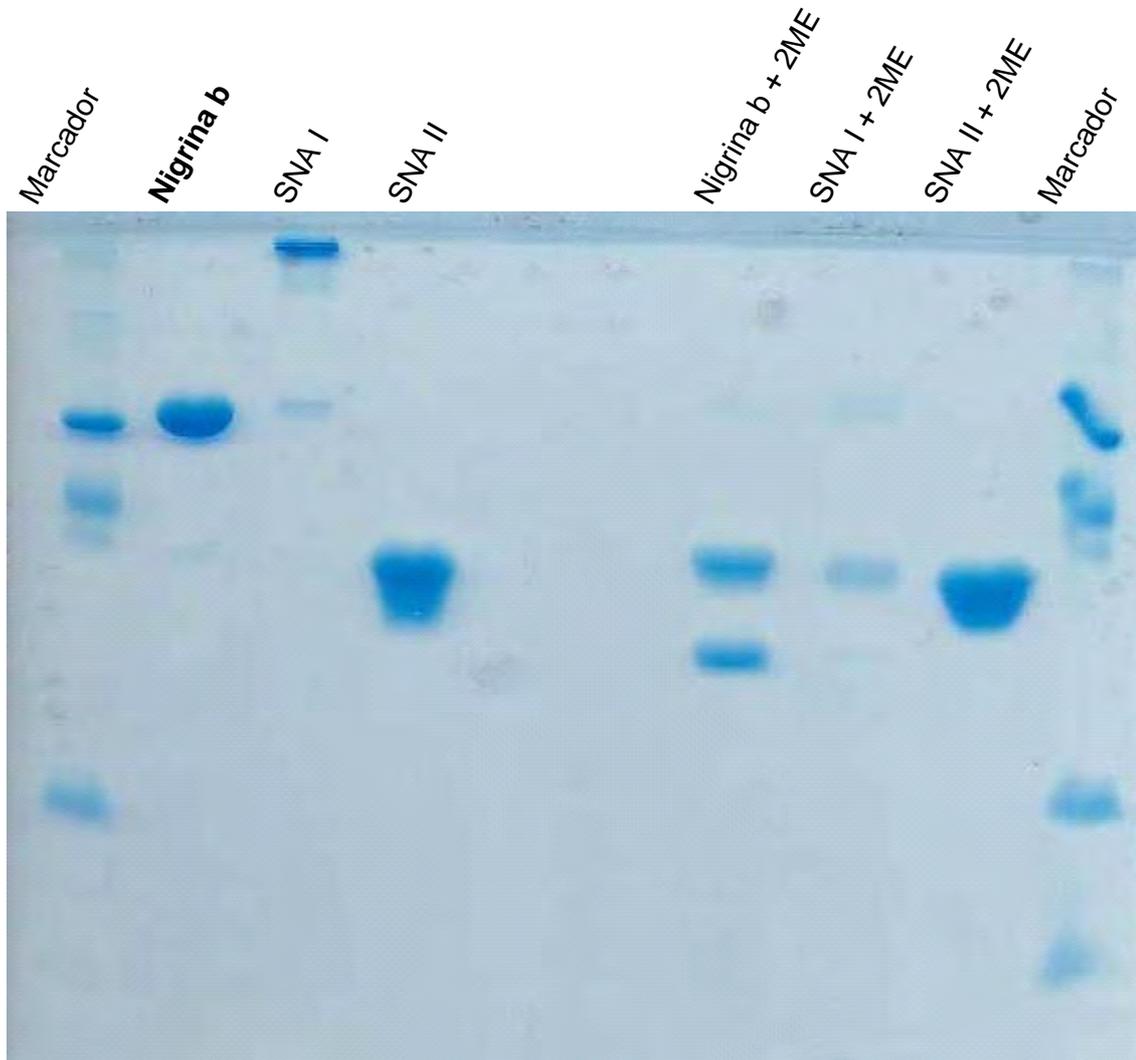


Figura 4.5. Electroforesis de las lectinas de la corteza de *S. nigra* en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. El proceso se llevó a cabo en ausencia (calles de la izquierda) y presencia de 2-mercaptoetanol (calles de la derecha). Los geles son del 15%. Los marcadores de peso molecular son alfa-lactoalbúmina (14 kD), inhibidor de tripsina de soja (20 kD), ovoalbúmina (45 kD) y BSA (66 kD) y se añadieron 16 μ g de cada una.

La razón puede estar basada en el hecho que la cadena B de la nigrina está fuertemente glicosilada, lo que aumenta la intensidad de la tinción con el azul de Coomasie.

La SNA-I se presenta también a homogeneidad electroforética y aunque aparece una banda en la zona de Mr 60.000, ésta obedece a una reducción parcial del tetrámero (A-B)₂ como lo demuestra el hecho de que en presencia de mercaptoetanol las bandas coinciden con las bandas A y B de la SNA-I y no de la nigrina.

La SNA-II se encuentra también a homogeneidad electroforética presentando una cierta heterogeneidad en la zona de la cadena B que muy probablemente obedece a la existencia de isoformas que teniendo la misma cadena polipeptídica poseen distintos grados de glucosilación.

4.2.2. HEMOAGLUTINACIÓN POR LECTINAS DE *SAMBUCUS* DE CÉLULAS ROJAS DE LA SANGRE HUMANA

Las lectinas de *S. nigra* aglutinan células rojas de la sangre humana a baja concentración. Esta es una actividad que permite seguir el estado de dichas lectinas y la eficacia de su aislamiento (Girbés y cols., 1993b). Como se indica en la figura 4.6., las lectinas obtenidas en este trabajo promueven la aglutinación a concentraciones de 20,1 µg/mL (nigrina b) y 0,4 µg/mL (SNA-I) y 38,0 µg/mL (SNA-II).

Estos valores están en consonancia con los publicados anteriormente (Girbés y cols., 1993b) y para la ebulina (Citores y cols., 1998).

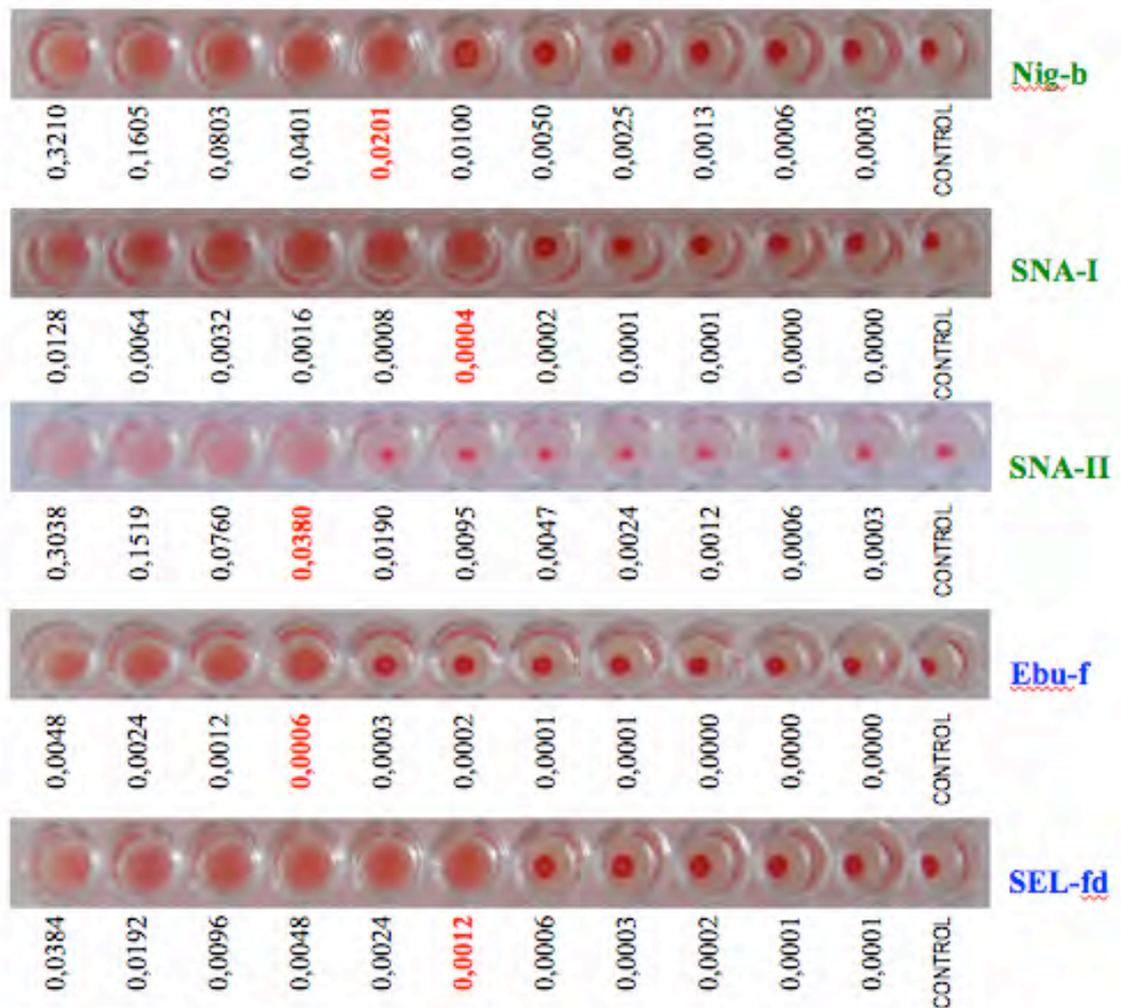


Figura 4.6 Hemaglutinación de células rojas de sangre humana O⁺. En la parte superior se presenta la aglutinación por nigrina b, SNA-I y SNA-II con valores para la aglutinación total de 20,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,4 $\mu\text{g/mL}$ y 38,0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Como comparación presentamos la aglutinación promovida por ebulina f y SELfd (parte inferior. En ausencia de aglutinación las células rojas sedimentan formando un botón en el fondo del pocillo, mientras que en la aglutinación total las células interactúan unas con otras formando una superestructura en forma de capa que no sedimenta y que presenta una tonalidad rosada.

4.2.3. ESTUDIOS DE LA TOXICIDAD EN RATONES PROVOCADA POR LA ADMINISTRACIÓN IP DE NIGRINA B DE CORTEZA DE *SAMBUCUS NIGRA*

Se sabía que la administración IV de dosis subletales de nigrina b (5 mg/kg) promovían daño intestinal reversible después de 9-12 días (Gayoso y cols., 2005). La administración IV implica la disposición inmediata e íntegra de la totalidad de la dosis de nigrina en torrente circulatorio. Ello implica que la biodisponibilidad en magnitud es total y en velocidad es instantánea. Por lo tanto, la nigrina alcanza rápidamente los tejidos diana que en este caso son los intestinos.

La dosis IP subletal de nigrina b que produce la misma toxicidad que la administración de 5 mg/kg de la vía IV, es 10 mg/kg (datos no publicados del grupo del Profesor Girbés). La administración IP de nigrina implica la acumulación de la totalidad de la dosis en el lugar de la inyección y la posterior difusión y captación por los tejidos adyacentes, que finalmente conlleva la aparición en plasma. Durante este complejo proceso (serie ADME: administración, distribución, metabolismo y excreción), se puede producir la degradación proteolítica y/o la reducción del puente disulfuro que mantiene a las dos cadenas unidas. Por ello la biodisponibilidad plasmática de nigrina b es menor que por la vía intravenosa.

4.2.3.1. Análisis histológicos

La administración IP de nigrina b (10 mg/kg de peso corporal) si bien no mató a los animales, produjo un fuerte efecto tóxico en el intestino delgado cuya reversibilidad encontramos dependiente del tiempo después de la administración. En la figura 4.7. se muestran los efectos de la

administración IP de nigrina b 10 mg/kg a ratones Swiss sobre el intestino delgado. 24 horas después de la administración se produjo una atrofia importante del epitelio intestinal fundamentada en una fuerte destrucción de las criptas de Lieberkühn. Como puede observarse, las criptas han perdido su forma característica de bolsa cilíndrica alargada, cuya característica más importante es la presencia de un grupo de células localizadas en el tercio medio denominadas células TAC (*transit amplifying compartment*), que son precursores de proliferación derivados directamente de las células madre totipotentes de las criptas (Simons y Clevers, 2011; Potten y cols, 2009). El tratamiento con nigrina conlleva la destrucción de la mayor parte de estas células pero no totalmente, permitiendo que las remanentes regeneren las criptas con el tiempo y por ello el efecto es reversible.

Como muestra la figura 4.7., las criptas afectadas poseen forma de bolsa redondeada y contienen en su interior células muertas y restos celulares, todo ello con apariencia apoptótica. Por el contrario, los villi muestran una estructura relativamente bien conservada con la disposición característica de enterocitos alineados y distribución cilindrocónica (figura 4.8.).

Respecto al intestino grueso (figura 4.9.), se observa una estructura no muy dañada, pero con algunas apoptosis.

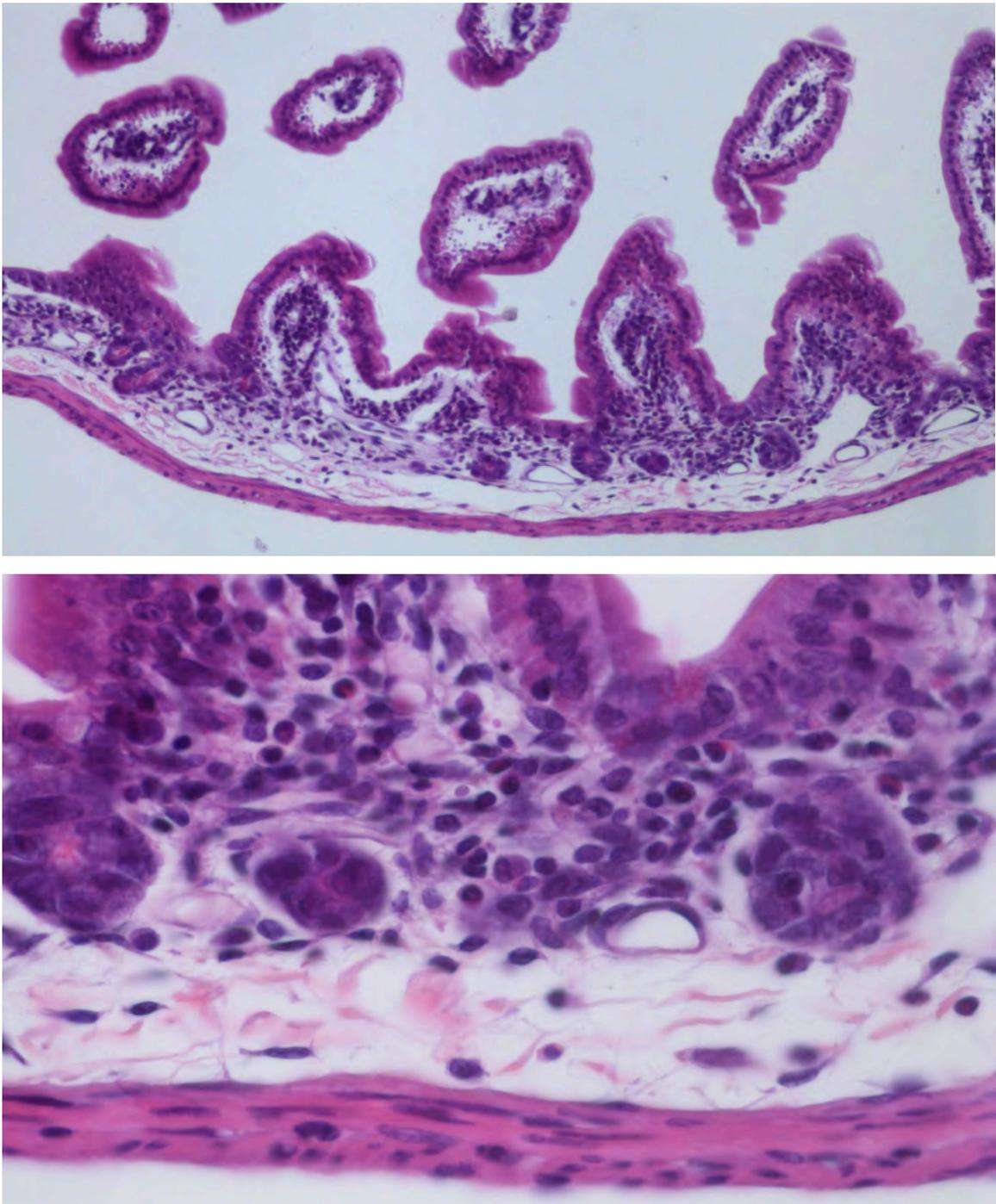


Figura 4.7. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre el intestino. En la parte superior se muestra una visión general de las criptas de Lieberkühn y de los villi (179 aumentos). En la parte inferior se muestra en detalle las criptas (680 aumentos).

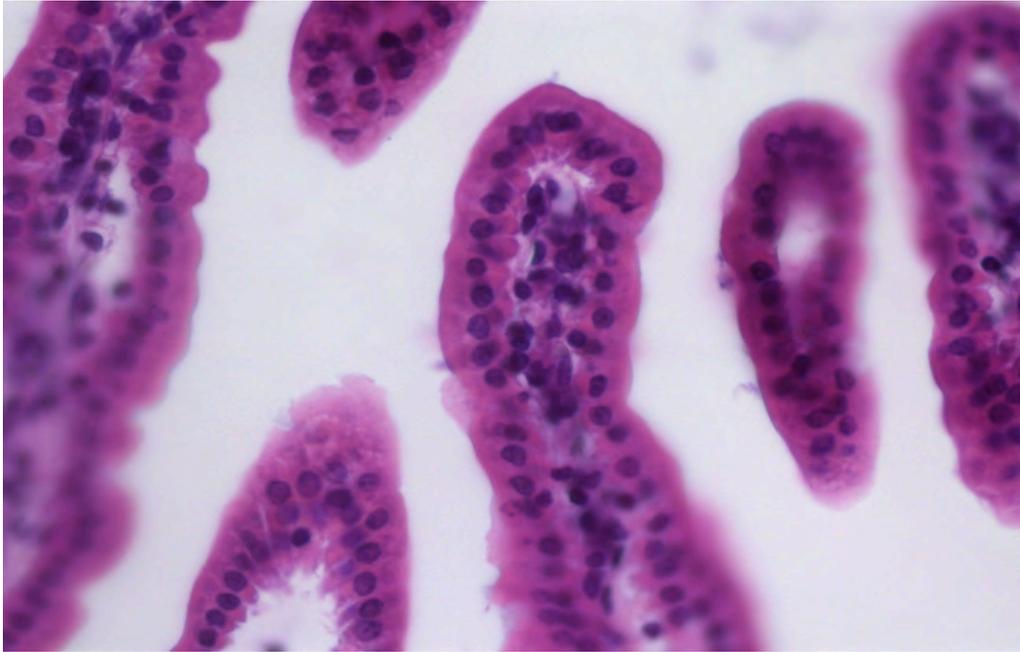


Figura 4.8. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre los villi. (680 aumentos).

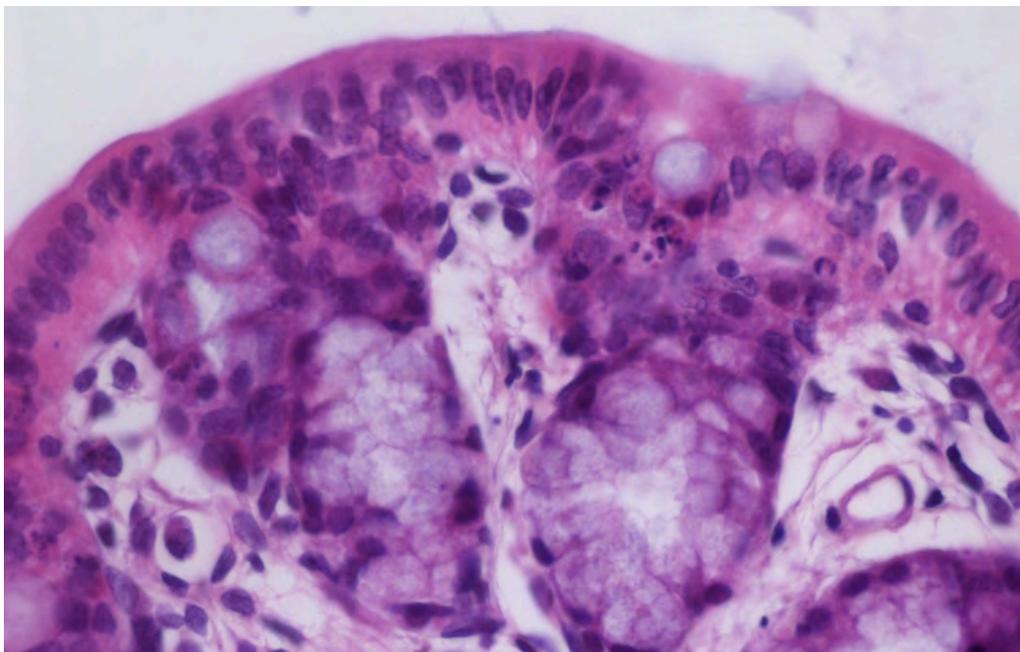


Figura 4.9. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre el intestino grueso. (680 aumentos).

A las 48 horas después de la administración IP de nigrina 10 mg/kg como puede observarse en la figura 4.10., las criptas del intestino delgado empiezan a recuperarse, siendo más numerosas y con estructura más cilíndrica que a las 24 h. Por su parte los villi muestran una apariencia más desestructurada que a las 24 h.

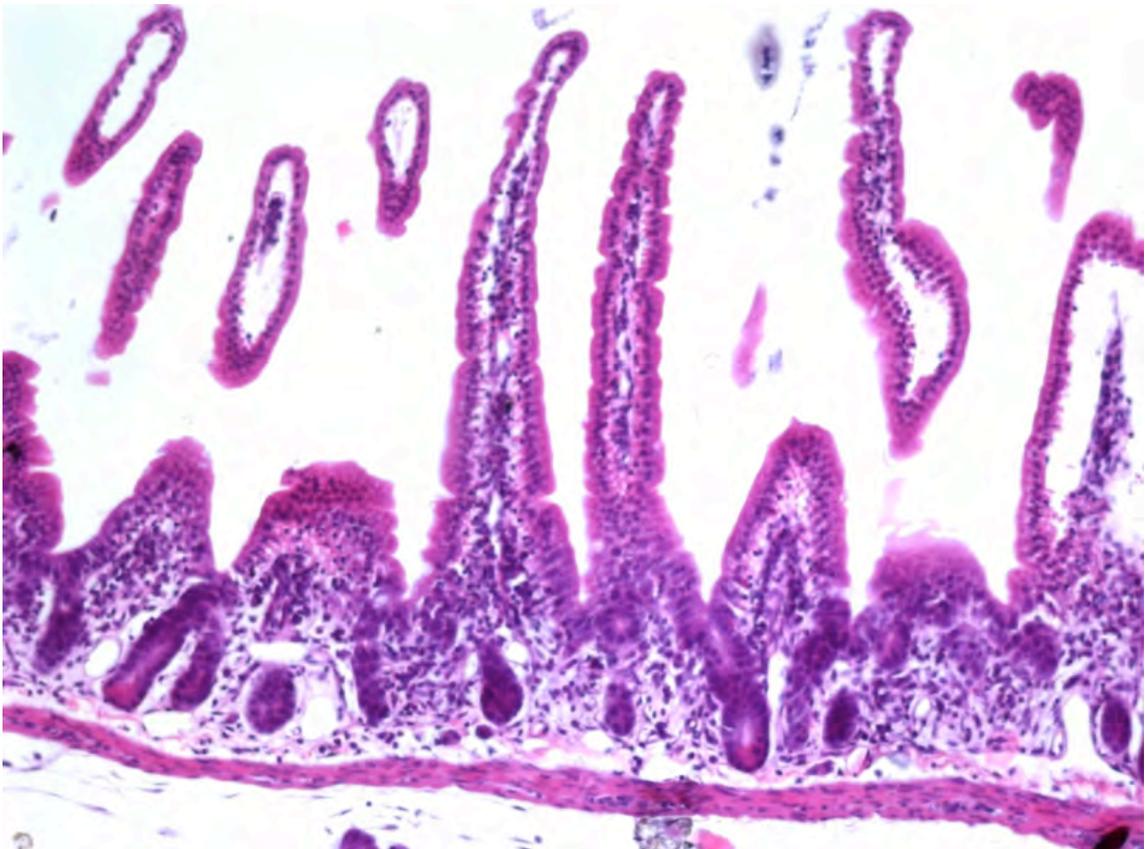


Figura 4.10. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 48 h sobre el intestino. (170 aumentos).

Respecto al intestino grueso se aprecian apoptosis pero la apariencia general no es mala.

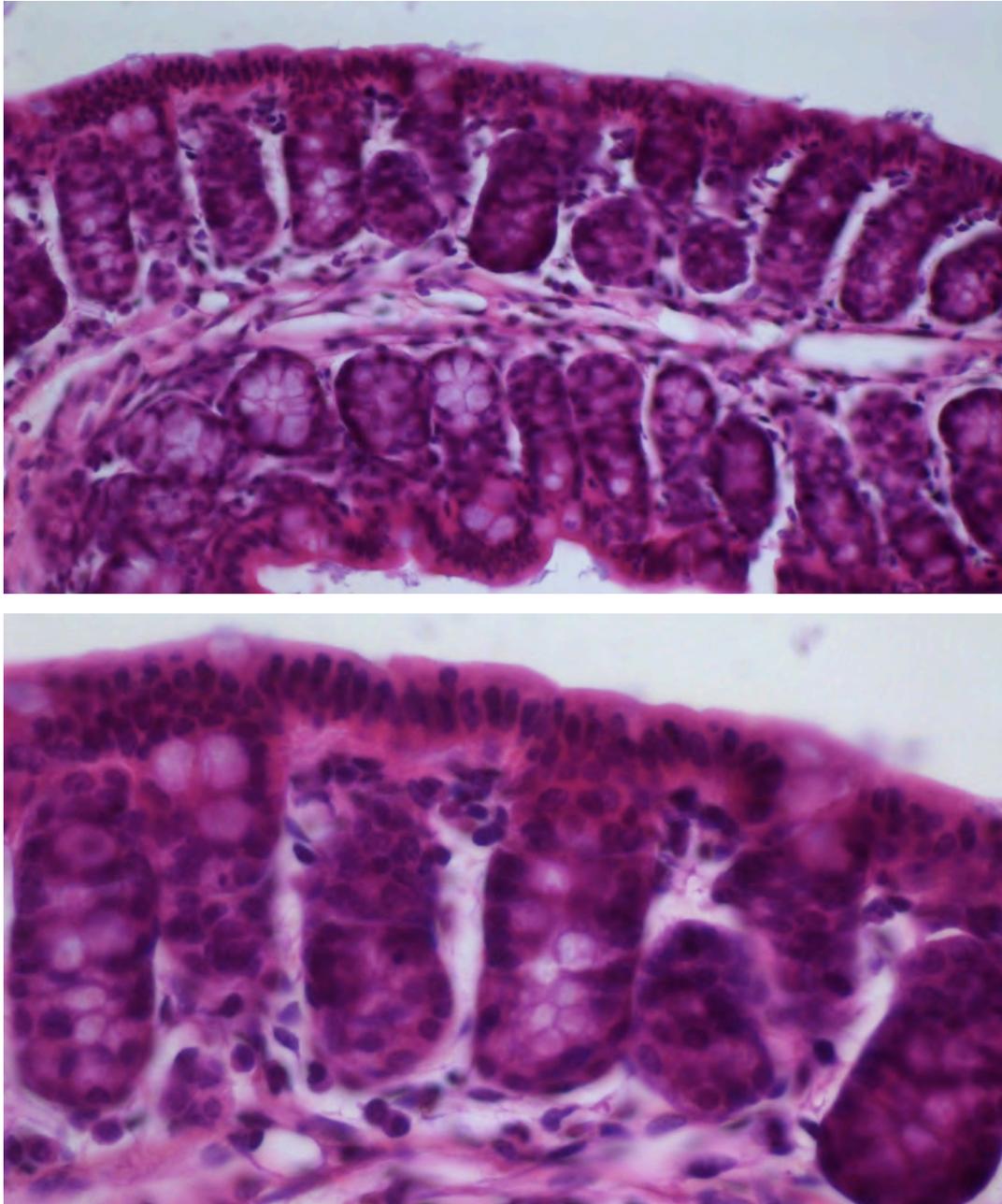


Figura 4.11. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 48 h sobre el intestino grueso. Parte superior: epitelio del intestino grueso (340 aumentos); parte inferior: detalle de las criptas (680 aumentos).

Como puede verse en la figura 4.12. a las 72 h después de la administración IP de nigrina, se observa una regeneración total de criptas (que aparecen más numerosas y alargadas) y de los villi.

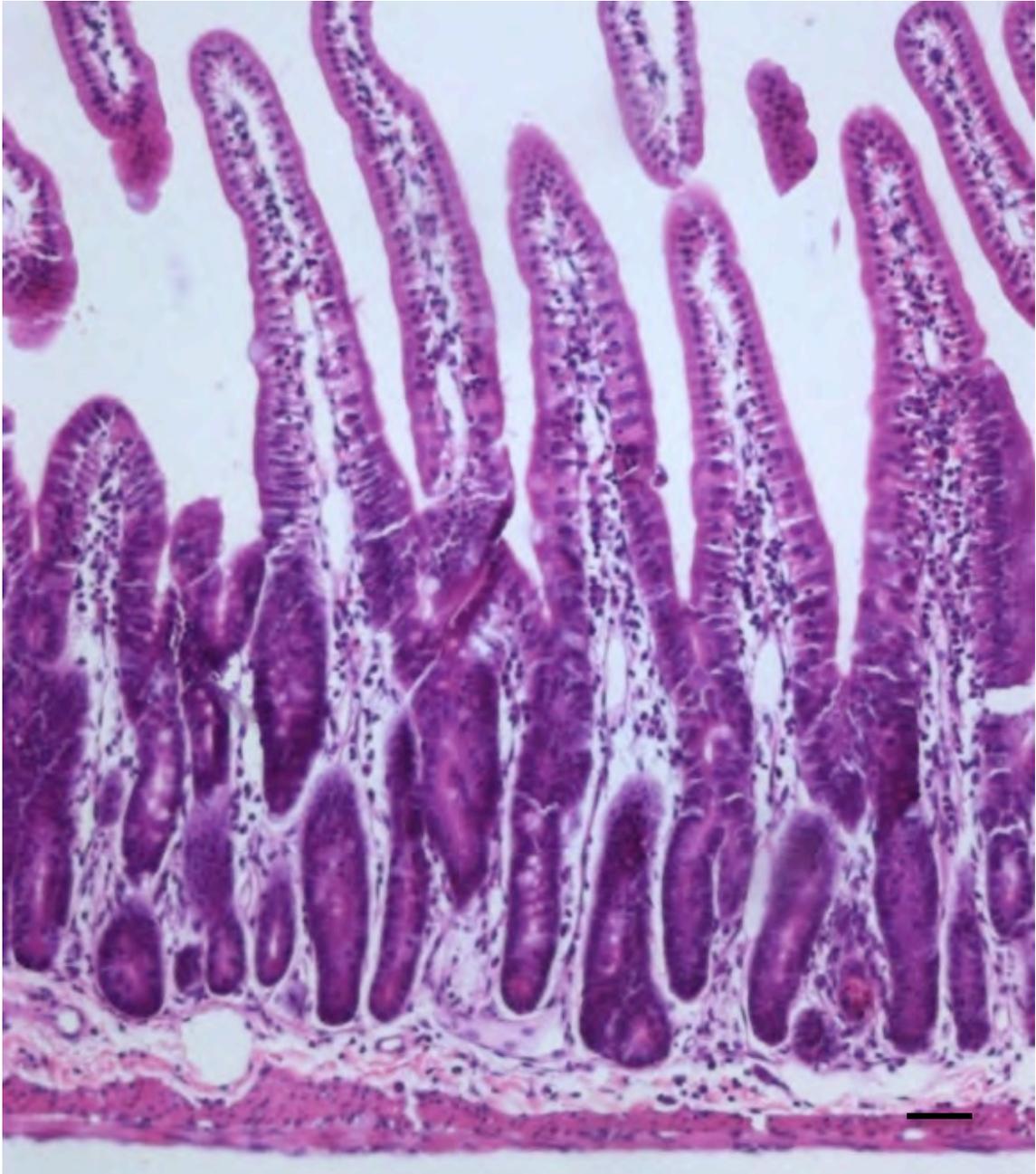


Figura 4.12. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 72 h sobre el intestino delgado. Vista general de criptas y villi (450 aumentos).

El aspecto del intestino grueso muestra también una disposición normal con criptas alargadas y bien constituidas. No obstante, se observa alguna apoptosis que pudiera ser resultado de una actividad fisiológica de recambio

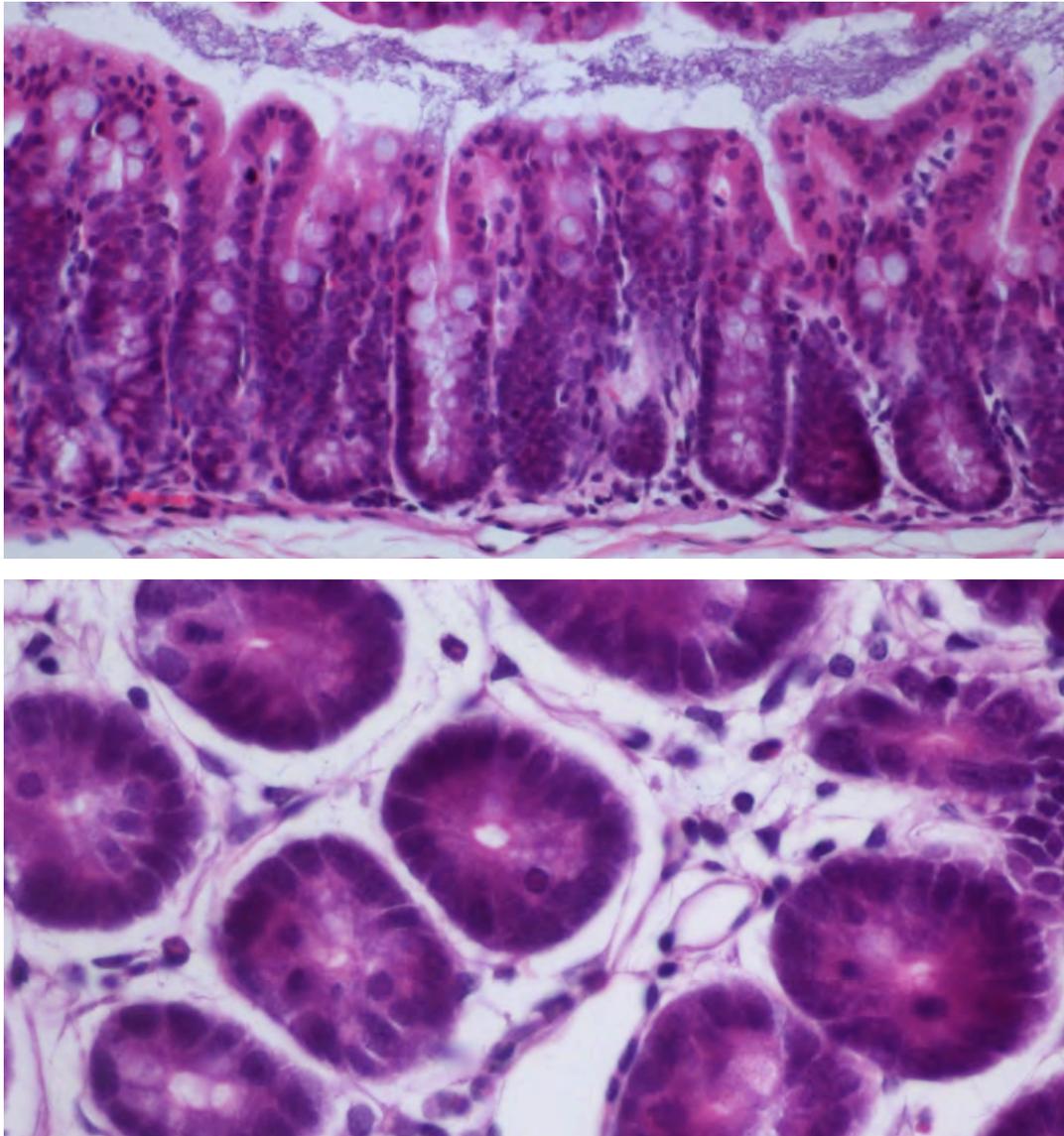


Figura 4.13. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 72 h sobre el intestino grueso. Parte superior: detalle de las criptas en corte longitudinal (340 aumentos); parte inferior: detalle de las criptas en corte en sección (680 aumentos).

4.2.3.2. Variación del peso corporal

Como se muestra en la figura 4.14. la administración IP de nigrina en dosis subletales, produce una reducción media del peso de los animales ensayados de hasta un 13% a las 48 h que se mantiene hasta los 8 días y que tiende a recuperarse después.

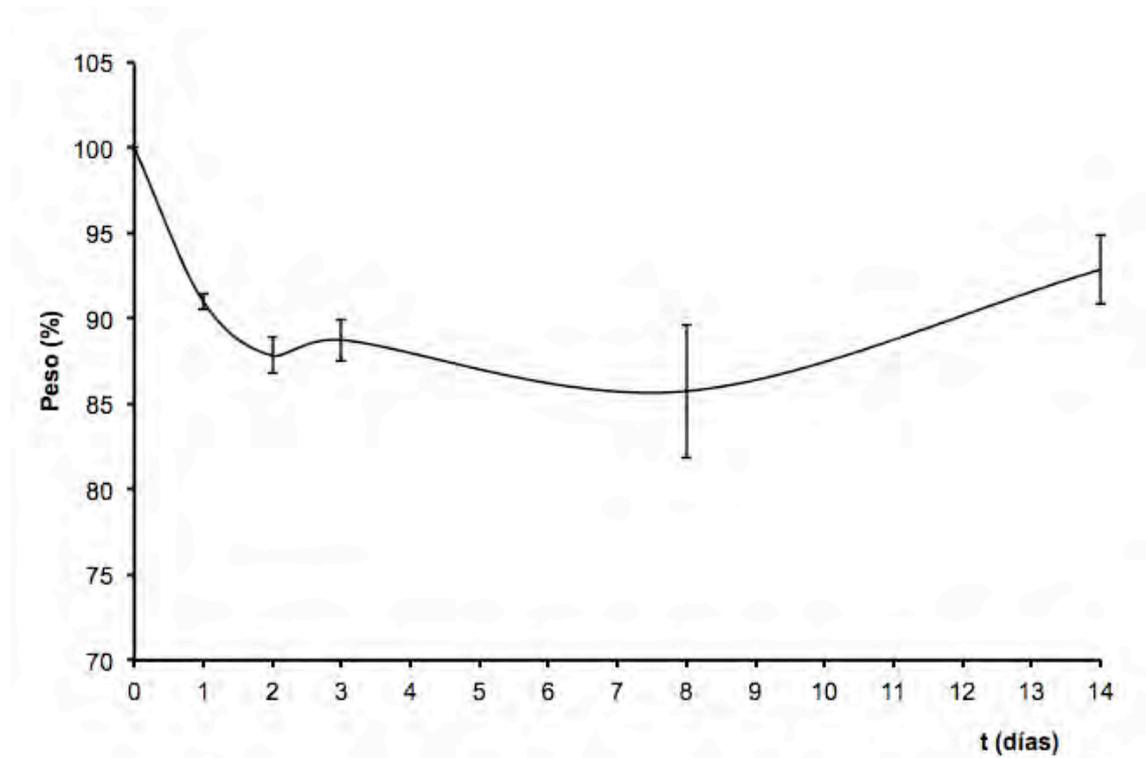


Figura 4.14. Evolución del peso de los animales ensayados a lo largo del tiempo tras la administración intraperitoneal de dosis subletales de nigrina b. Valores medios expresados en porcentaje, más menos error estándar.

4.2.3.3. Tinción con azul de Evans

El objetivo de este estudio es determinar si la administración de dosis subletales de nigrina b en ratones, afecta a la permeabilidad vascular del epitelio intestinal y por tanto, las posibles modificaciones provocadas en la absorción de xenobióticos son debidos a una discontinuidad de la barrera intestinal.

En teoría, el azul de Evans debe distribuirse por vena por todo el aparato circulatorio y líquido intersticial sin acceder a tejidos. Se ha descrito que sólo en los tejidos que tengan dañada su permeabilidad debería aparecer tinción (Ogawa y cols., 2002). Nuestra hipótesis de partida era que los animales afectados en mayor medida por nigrina b deberían tener la barrera intestinal dañada y por tanto se deberían teñir en mayor o menor grado en función del daño intestinal.

En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos desglosados para cada grupo de animales:

GRUPO CONTROL															
PESOS	ANIMAL 1			ANIMAL 2			ANIMAL 3			ANIMAL 4			ANIMAL 5		
	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)
P _{0h} (g):	30,89			40,99			33,31			27,12			41,68		
Estómago	0,28	NA	0,047	0,29	NA	0,084	0,28	NA	0,055	0,28	NA	0,088	0,37	NA	0,109
Duodeno	0,59		0,034	0,56		0,031	0,53		0,051	0,28		0,016	0,39		0,108
Yeyuno	0,47	49,0	0,055	0,40	49,5	0,022	0,46	48,5	0,030	0,42	43,0	0,104	0,49	51,0	0,094
Ileon	0,48		0,106 ⁽¹⁾	0,39		0,024	0,47		0,048	0,16		0,073	0,29		0,110
Colon	0,83	10,5	0,020	0,83	11	0,024	0,82	10,5	0,035	0,65	9,7	0,065	0,83	11,2	0,098
(1) Se observa turbidez en la muestra															
GRUPO Nig b-24 h															
PESOS	ANIMAL 1			ANIMAL 2			ANIMAL 3			ANIMAL 4			ANIMAL 5		
	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)
P _{0h} (g):	32,22			38,39			34,47			30,58			35,22		
P _{24h} (g):	30,67			36,07			31,38			27,73			34,69		
Estómago	0,28	NA	0,364	0,29	NA	0,293	0,27	NA	0,188	0,31	NA	0,486	0,21	NA	0,271
Duodeno	0,40		0,640	0,25		0,434	0,29		0,468	0,21		0,287	0,19		0,373
Yeyuno	0,29	42,5	0,424	0,37	45,0	0,355	0,27	42,0	0,220	0,23	36,0	0,343	0,24	41,0	0,331
Ileon	0,36		0,317	0,24		0,249	0,15		0,300	0,27		0,395	0,23		0,433
Colon	0,81	10,0	0,457	0,82	10,2	0,370	0,71	11,9	0,251	0,53	8,5	0,290	0,54	8,5	0,297

Tabla 4.1. Resultados desglosados del ensayo de tinción con azul de Evans. Grupo control y Grupo tras 24 h de la administración IP de dosis subletales (10 mg/kg) de nigrina b.

GRUPO Nig b-48 h															
PESOS	ANIMAL 1			ANIMAL 2			ANIMAL 3			ANIMAL 4			ANIMAL 5		
	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)
P _{0h} (g):	ND														
P _{48h} (g):	35,50			36,07			38,20			33,78			32,55		
Estómago	0,41	NA	0,343	0,24	NA	0,308	0,41	NA	0,453	0,36	NA	0,641	ND	NA	1,102
Duodeno	0,40		0,379	0,17		0,369	0,25		0,275	0,28		0,641	0,24		0,968
Yeyuno	0,32	39,5	0,491	0,17	41,0	0,281	0,20	41,5	0,218	0,31	45,0	0,641	0,21	42,0	1,075
Ileon	0,21		0,268	0,25		0,331	0,22		0,316	0,13		0,457	0,19		1,147
Colon	0,67	10,0	0,349	0,48	9,0	0,357	0,54	10,5	0,321	0,60	11,0	0,513	ND	8,5	1,161

GRUPO Nig b-72 h															
PESOS	ANIMAL 1			ANIMAL 2			ANIMAL 3			ANIMAL 4			ANIMAL 5		
	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)	P (g)	L (cm)	A (UA)
P _{0h} (g):	ND														
P _{72h} (g):	22,26			32,61			35,87			31,78			25,56		
Estómago	0,29	NA	0,192	0,34	NA	0,396	0,40	NA	0,180	0,39	NA	0,142	0,35	NA	0,105
Duodeno	0,31		0,275	0,34		0,094	0,50		0,117	0,29		0,243	0,29		0,135
Yeyuno	0,25	37,5	0,340	0,32	41,5	0,433	0,33	43,5	0,109	0,48	43,0	0,144	0,25	40,5	0,141
Ileon	0,19		0,380	0,21		0,218	0,44		0,154	0,52		0,142	0,17		0,097
Colon	0,44	7,7	0,354	0,58	7,8	0,257	0,75	8,7	0,311	0,74	9,0	0,250	0,81	9,0	0,375

Tabla 4.2. Resultados desglosados del ensayo de tinción con azul de Evans. Grupo tras 48 h y tras 72 h de la administración IP de dosis subletales (10 mg/kg) de nigrina b.

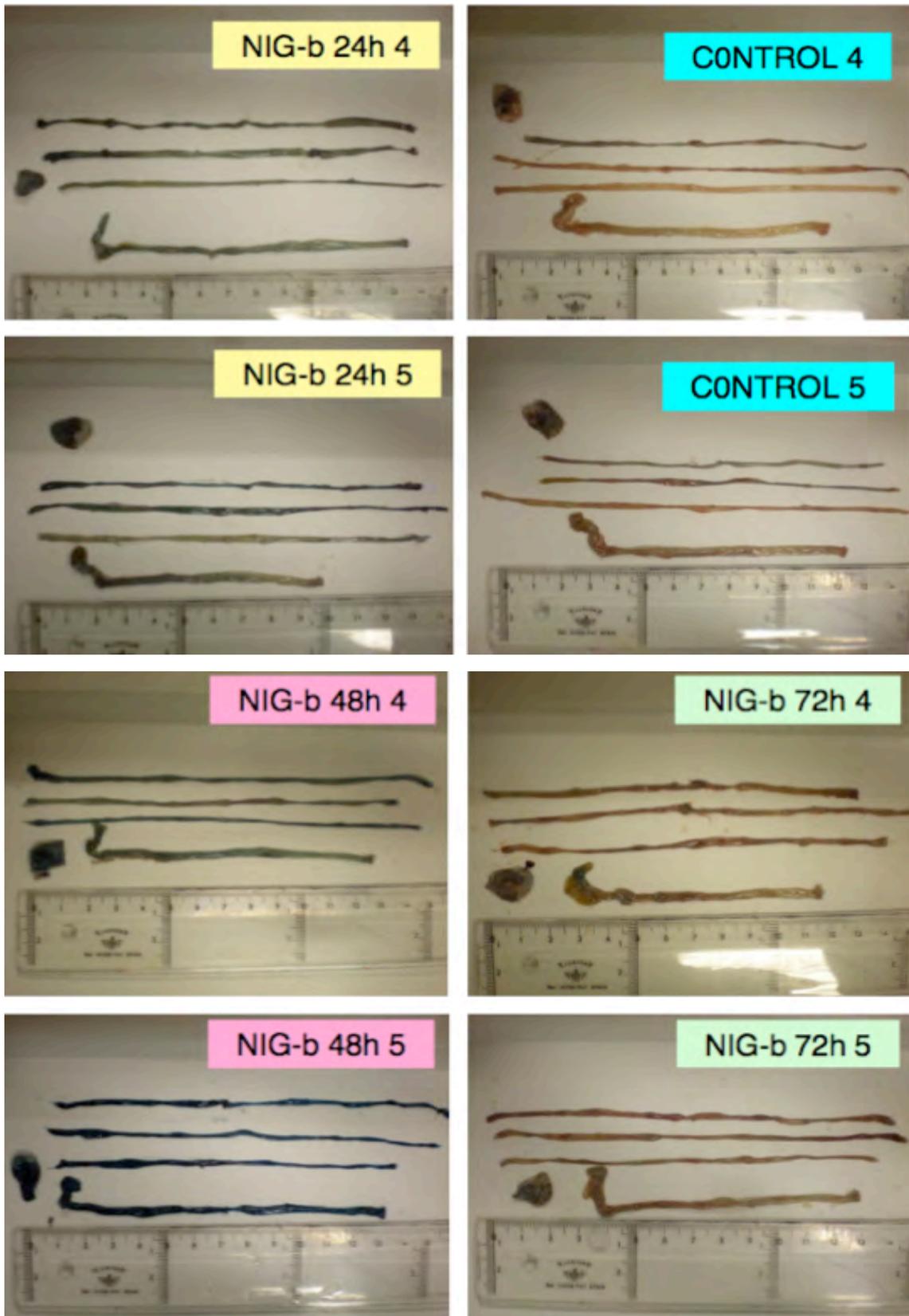


Figura 4.15. Aspecto de las diferentes partes del intestino evaluadas en los dos últimos animales de cada grupo.

En los animales control, la tonalidad del tejido es rosada. Sin embargo, los animales tratados previamente con nigrina b, muestran una tonalidad más azulada, variando entre animales dentro del mismo grupo.

El análisis de las absorbancias de las muestras obtenidas ha aportado los siguientes resultados:

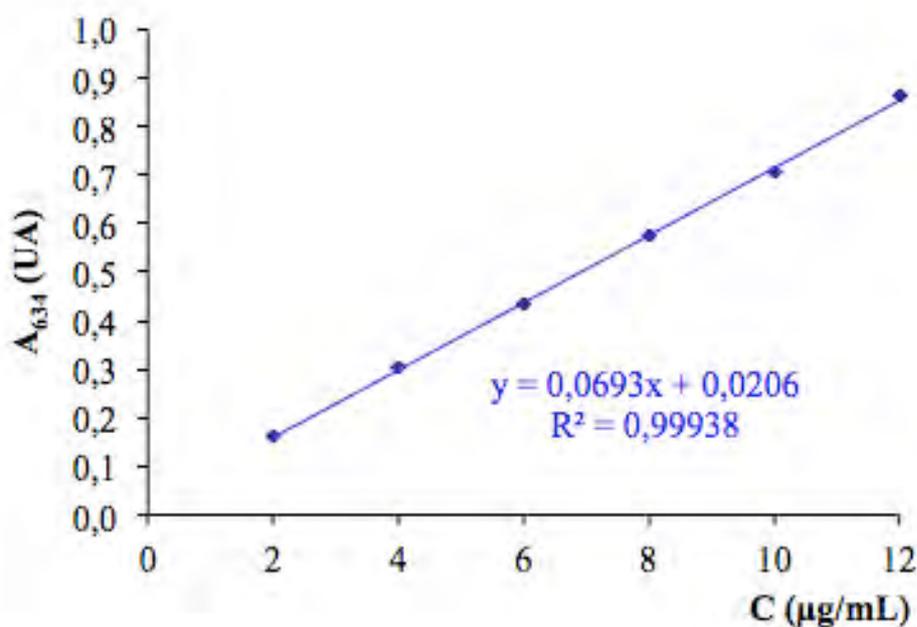


Figura 4.16. Recta de calibrado del colorante azul de Evans en dimetil formamida (DMF). El coeficiente de correlación muy próximo al valor 1 muestra una adecuada linealidad en el intervalo ensayado.

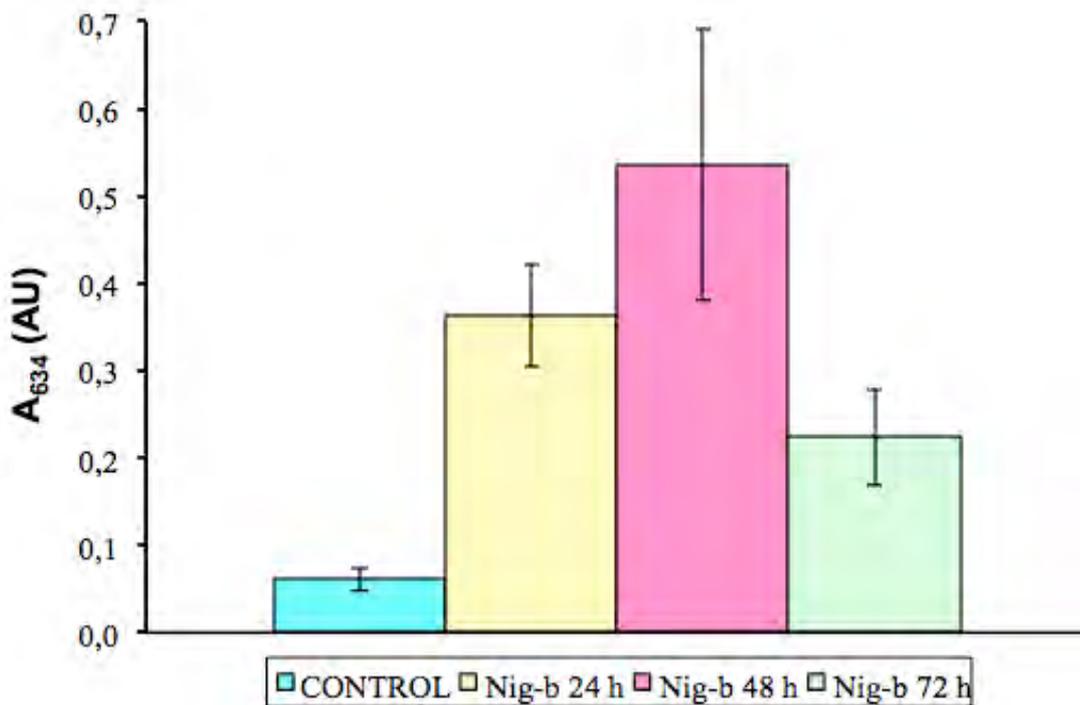


Figura 4.17. Absorbancias de azul de Evans en DMF a la longitud de máxima absorción obtenidas en el aparato digestivo de ratones tratados con dosis IP subletales (10 mg/kg) de nigrina b.

Tras 24 h de la administración de nigrina b en dosis subletales vía intraperitoneal, se observa un incremento de la permeabilidad vascular de seis veces el valor obtenido a niveles basales. A las 48 h se obtienen los valores máximos de permeabilidad vascular, si bien no se observan diferencias significativas con los resultados obtenidos a 24 h. En el último grupo estudiado, 72 h, se observa una reducción del 50% de la permeabilidad vascular respecto a los valores obtenidos a 48 h.

4.3. CUANTIFICACIÓN DE PIRIDOXINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El HPLC es una técnica analítica de referencia en el análisis de los diferentes vitámeros de vitamina B₆. De hecho, fue considerada en 2009 como la técnica de elección en la determinación de niveles plasmáticos de la población en USA según el estudio “National Health and Nutrition Examination Survey” realizado por el CDC de Atlanta (Rybak y Pfeiffer, 2009).

En nuestro estudio se ha tomado como referencia el método propuesto por Chatzimichalakis y colaboradores (2004) para la cuantificación de vitaminas del grupo B en fluidos biológicos de origen humano por HPLC con extracción en fase sólida como paso previo, debido a su adecuado límite de detección, sencillez y accesible sistema de detección. Los principales parámetros del método de referencia serían los siguientes:

- Fase estacionaria: Phenomenex Luna C-18 (150 x 4,6 mm)
- Temperatura de análisis: ambiente
- Fase móvil: A: 0,05 M CH₃COONH₄/ CH₃OH (99/1)
B: H₂O/CH₃OH (50/50)

Composición de la fase móvil respecto al tiempo de cromatograma:

t cromatograma (min)	Relación solventes A:B	Modalidad
0-4	99:1	Isocrática
4-22	0:100	Gradiente
22-30	0:100	Isocrática

Tras la inyección es necesario realizar un segundo gradiente durante 5 minutos para establecer de nuevo las condiciones iniciales

- Flujo: 0,8 mL/min
- Detección: PDA 257 nm
- V de inyección: 20 μ L

Las muestras de plasma fueron extraídas previamente en cartuchos de extracción en fase sólida Supelclean LC-18 (500 mg/3mL) según el siguiente protocolo:

- 40 μ L de plasma + 200 μ L ACN + 100 μ L estándar interno (solución de teobromina)
- centrifugación 4000 rpm – 15 min
- evaporación de la fase orgánica
- adición del sobrenadante al cartucho de extracción SPE previamente activado según las indicaciones del fabricante (1mL CH₃OH solvatar la fase estacionaria y después 1mL agua Milli Q para equilibrar)
- elución en 2 mL (agua:CH₃OH, 15:85 v/v)
- evaporación a sequedad del extracto a 50°C en atmósfera de nitrógeno
- reconstitución en 100 μ L de agua Milli-Q

El límite de detección para la vitamina B₆ en estas condiciones fue de 0,17 ng/mL y la respuesta se mantuvo lineal en el rango 0,5-25,0 ng/mL, lo cual implica una adecuada sensibilidad a pesar de utilizar un detector ultravioleta visible y similar a la obtenida con detectores más sensibles utilizados en este tipo de estudios.

No se consideran que sean necesarios estudios de estabilidad adicionales a los ya realizados en la validación de un método analítico cuando se

mejora un método previamente validado (Caturla y cols., 2001) por lo tanto, tras la implantación se hará una validación reducida del método para asegurar que las características de resolución de dicho método se ajustan a los requerimientos del estudio.

4.3.1. IMPLANTACIÓN DEL MÉTODO

4.3.1.1. Selección de la longitud de onda de máxima absorción

Para evaluar la capacidad de absorción de la piridoxina que va a ser empleada en la presente memoria, se procedió a efectuar un barrido espectrofotométrico de una solución de 10 $\mu\text{g/mL}$ de principio activo en agua Milli-Q en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a una velocidad de barrido de 120 nm/min. Tras ajustar los intervalos de dicho barrido el gráfico obtenido fue el siguiente:

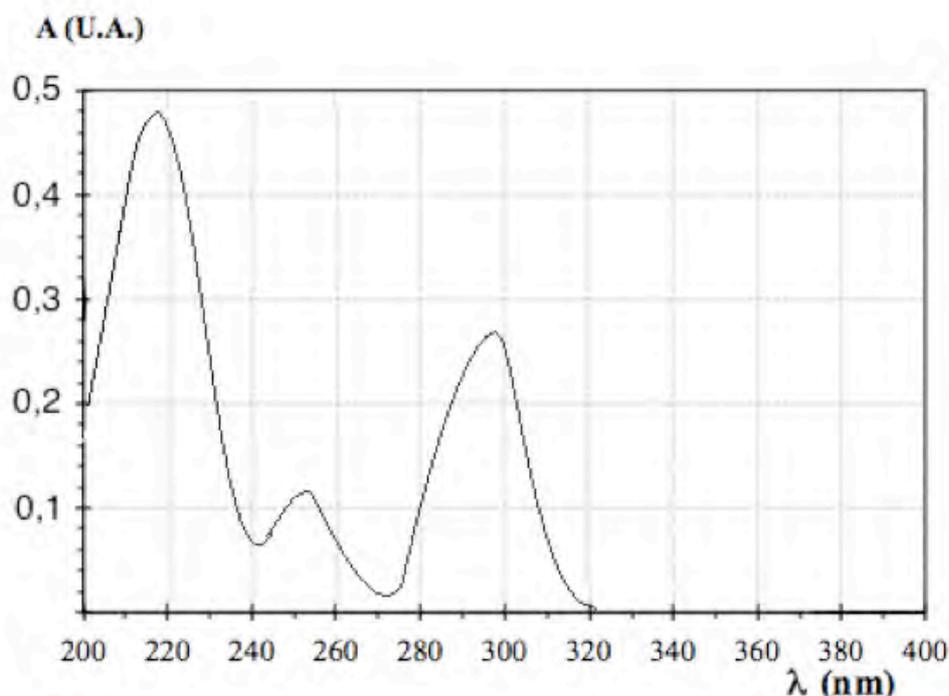


Figura 4.18. Barrido espectrofotométrico del estándar de piridoxina hidrocloreto.

Se observan tres máximos en la región ultravioleta del espectro a 219,8 nm (0,4775), 256,2 nm (0,1164) y 292,6 nm (0,2671). A pesar de que en el método descrito por Chatzimichalakis y colaboradores se trabajaba a 257 nm, en la implantación del método se ha seleccionado como longitud de trabajo la longitud de onda de máxima absorción (220 nm) al tratarse de la longitud de onda que proporciona mayor sensibilidad.

4.3.1.2. Estudio de la composición de la fase móvil

Se plantea si trabajar en isocrático o en gradiente. Para ello se estudian ambas condiciones y se demuestra como ha sido posible reducir el tiempo de cromatograma manteniendo constante la composición de la fase móvil acetato amónico 0,05M:CH₃OH (75:25) con una adecuada presión de columna (116 bar). En la siguiente figura se muestra el cromatograma obtenido en estas condiciones:

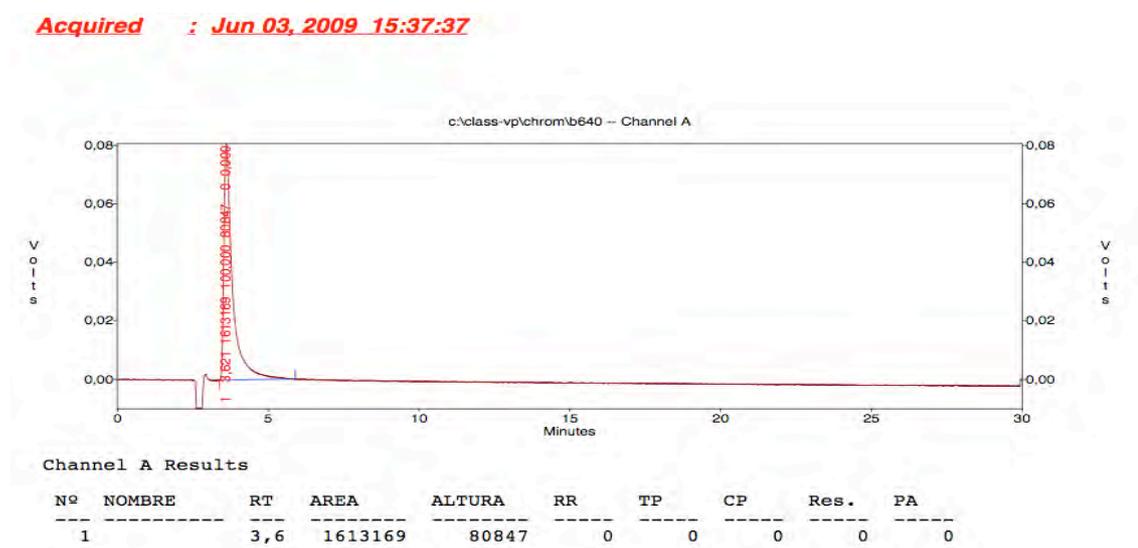


Figura 4.19. Estándar de vitamina B₆ en condiciones isocráticas de flujo de fase móvil.

4.3.1.3. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras es un paso crítico cuando se trabaja con matrices biológicas. Existen diversas técnicas, aunque la mayoría de ellas implican la precipitación de proteínas, centrifugado y clarificación de la muestra mediante filtración. Durante la implantación del método propuesto se ha seguido el siguiente protocolo:

- 40 μ L de plasma + 200 μ L ACN + 100 μ L estándar vitamina B6.
- Homogeneización de la muestra en un vórtex Heidolph Reax 200.
- Centrifugación 4000 rpm – 15 min en una centrífuga Biofuge Heraeus P160.
- Evaporación de la fase orgánica a 50 °C durante 10 min en un baño termostatzado Selecta.
- Adición del sobrenadante al cartucho de extracción SPE previamente activado según las indicaciones del fabricante (1mL CH₃OH para solvatar la fase estacionaria y después 1mL agua Milli Q para equilibrar). En nuestro caso se ha optado por sustituir el cartucho Supelclean LC-18 (500 mg/3 mL) de Supelco por el cartucho Strata C18E (55 μ m – 70Å también de 500 mg/ 3 mL) de Phenomenex.
- Elución en 6 mL (agua:CH₃OH, 15:85 v/v).
- Evaporación a sequedad del extracto a 45 °C a vacío.
- Reconstitución en 50 μ L de fase móvil.

Según este protocolo se realiza un diseño factorial de experimentos con las diferentes variables que se quieren contrastar manteniendo constante la proporción y composición de agente desproteinizante.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7
Plasma (μL)	40	0	40	40	40	40	40
ACN (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Estándar B ₆ (μL)	0	100	25	50	100	50	100
Agua Milli-Q (μL)	100	40	75	50	0	50	0
Extracción SPE	Si	Si	Si	Si	Si	No	No

Tabla 4.3. Diseño factorial realizado para optimizar la manera de preparación de las muestras de plasma.

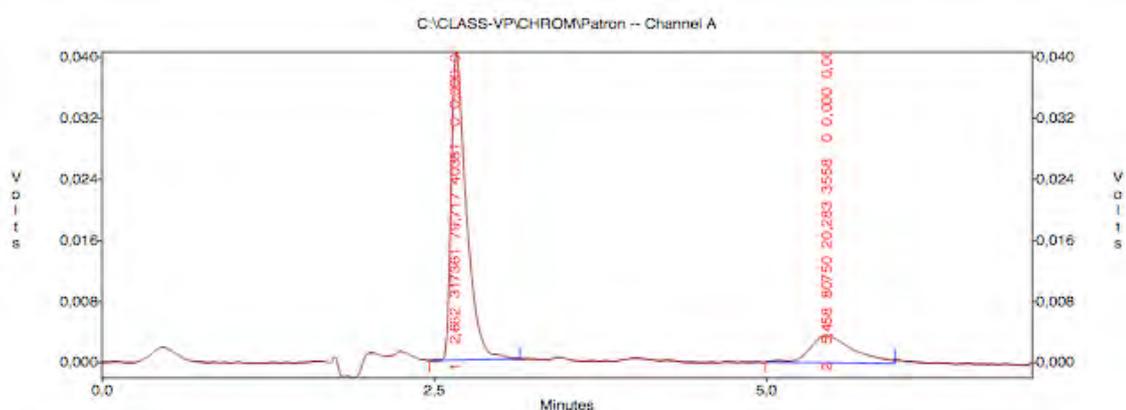


Figura 4.20. Cromatograma correspondiente a la muestra 2 del estudio de optimización de la manera de preparación de muestras plasmáticas de vitamina B₆.

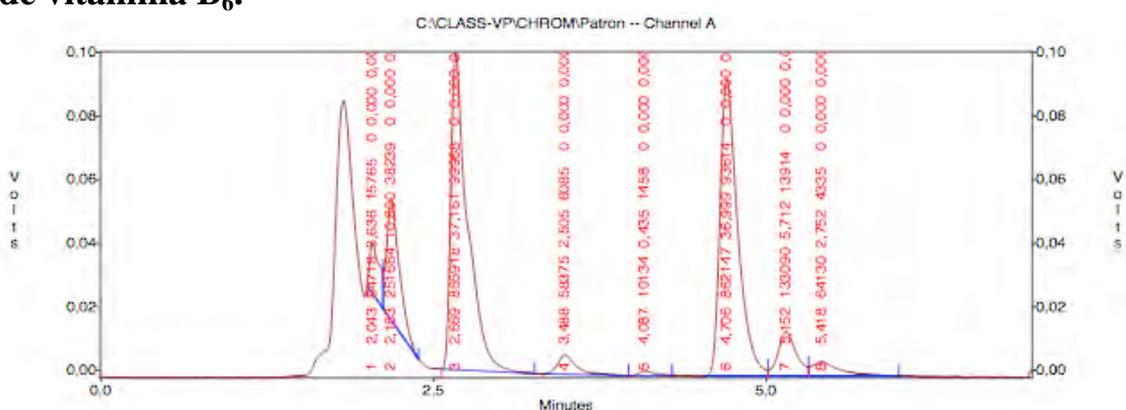


Figura 4.21. Cromatograma correspondiente a la muestra 5 del estudio de optimización de la manera de preparación de muestras plasmáticas de vitamina B₆.

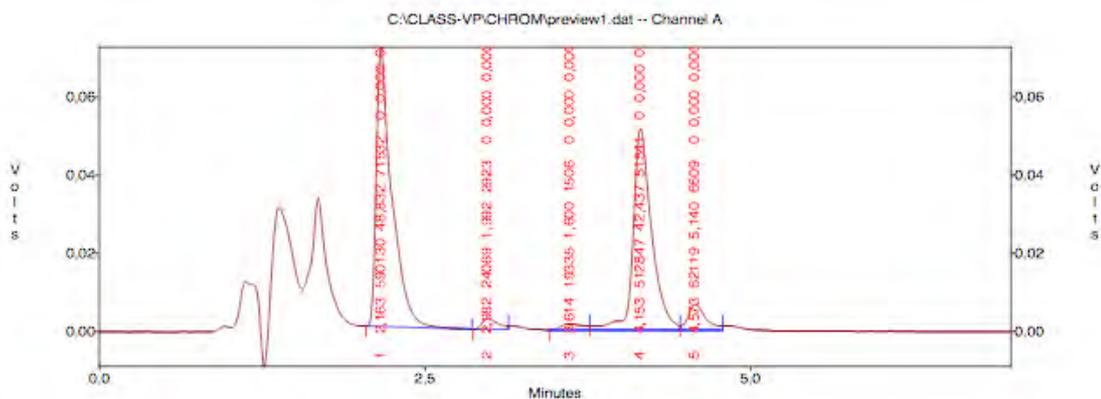


Figura 4.22. Cromatograma correspondiente a la muestra 7 del estudio de optimización de la manera de preparación de muestras plasmáticas de vitamina B₆.

Como se puede observar el pico de B₆ (tr 2,7 min) posee un factor de capacidad K' muy bajo (0,33) lo cual denota que la fase estacionaria no posee en las condiciones ensayadas, una adecuada capacidad de retención del analito. Sin embargo, si consideramos la resolución cromatográfica (Rs) entre la vitamina B₆ y los picos correspondientes del plasma, el resultado es de 1,33% lo que se traduce en una resolución de los picos en línea base superior al 95%. La recuperación obtenida respecto al patrón en estas condiciones es de un 20,32; 56,51 y 76,64% respectivamente, por lo que se plantea modificar el proceso de preparación de las muestras. Para ello se evalúan las siguientes posibilidades:

- sustituir el solvente desproteinizante ya que se ha demostrado que el ACN introduce interferencias en el método analítico,
- optimización del proceso de extracción,
- sustitución del proceso de extracción por una filtración esterilizante a través de filtros de membrana de 0,22 μm . Con ello se estaría reduciendo el nivel de selectividad del método pero se estaría incrementando la recuperación.

Tras la optimización de las diferentes variables se ha puesto de manifiesto que el metanol sería un desproteinizante adecuado en el método propuesto al no afectar a los diferentes parámetros cromatográficos evaluados; sin embargo, el empleo de filtros de membrana de nylon de 0,22 μm de diámetro de poro es una alternativa de desproteización adecuada y facilita el modo de preparación.

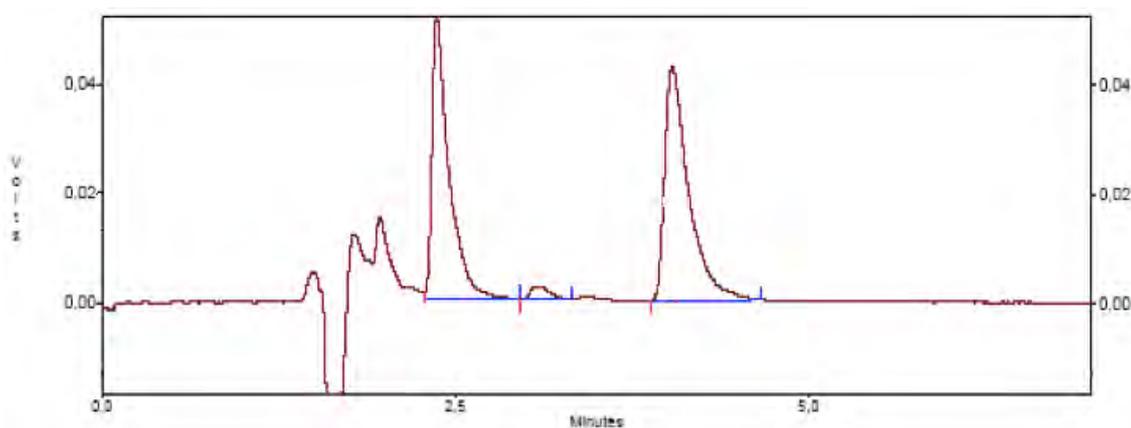


Figura 4.23. Cromatograma de plasma de ratón contaminado con patrón de vitamina B₆ preparado por filtración.

Los perfiles obtenidos demuestran unos adecuados parámetros cromatográficos y una resolución media del 101,32%.

4.3.1.4. Proporcionalidad

4.3.1.4.1. Recta de calibración

Tras haber seleccionado la longitud de onda adecuada, se realiza una recta de calibrado a partir de una serie de patrones de concentración definida de la misma naturaleza que el analito. En la representación gráfica de las absorbancias obtenidas frente a las distintas concentraciones, se escoge aquella zona donde se cumpla la Ley de Lambert-Beer. El ensayo se realizó por triplicado y se obtuvo una absorbancia media para cada valor de

concentración. Los datos resultantes quedan reflejados en las siguientes gráficas:

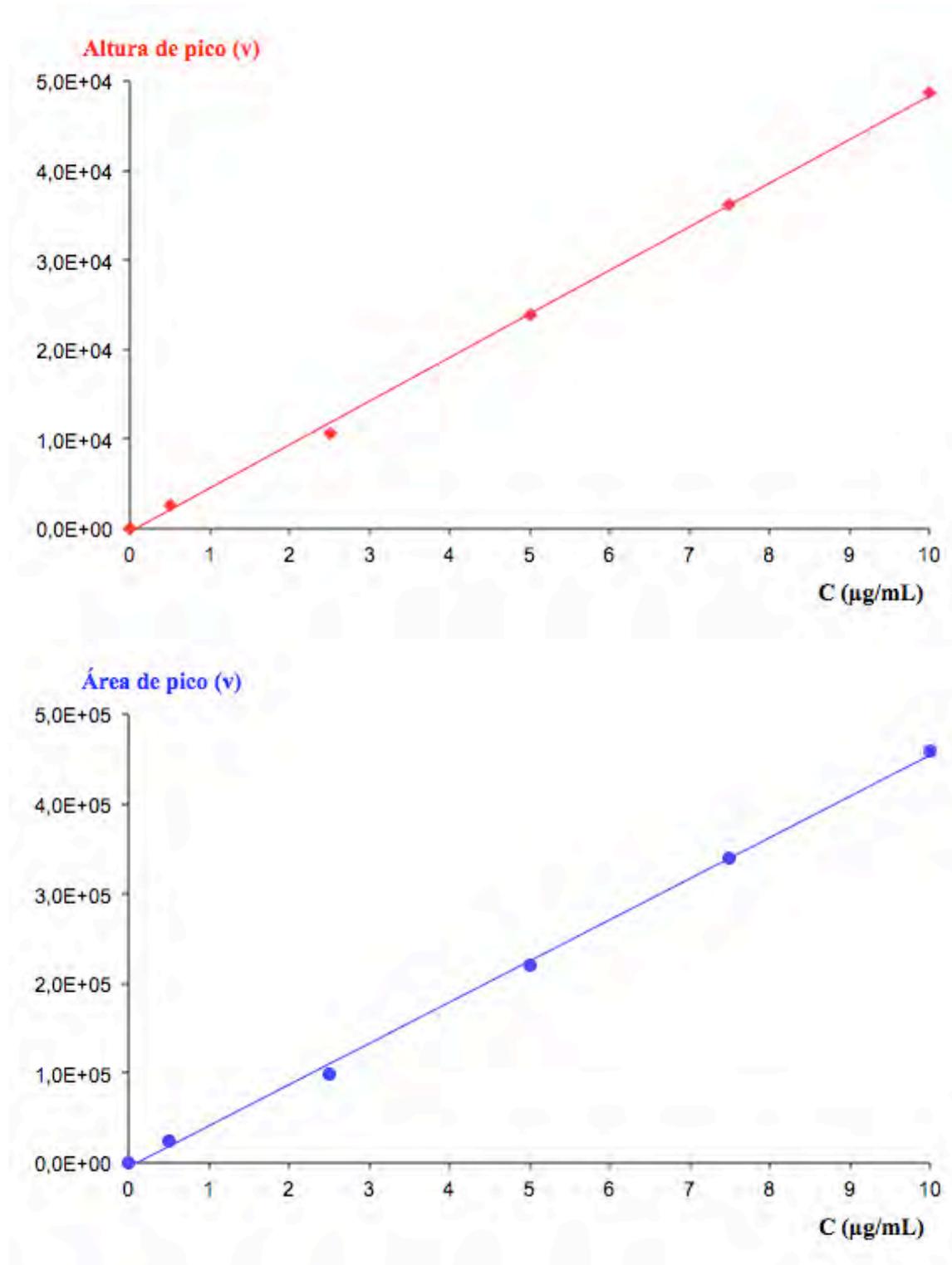


Figura 4.24. Rectas de calibrado obtenidas considerando alturas o áreas de pico.

Los resultados correspondientes al análisis de regresión de los pares de datos que constituyen la recta de calibrado son los siguientes:

Salida de regresión alturas

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de	0,999393994
Coefficiente de	0,998788356
R ² ajustado	0,998384475
Error típico	799,2772322
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media Cuadrado	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1579845237	1579845237	2472,97463	1,7906E-05
Residuos	3	1916532,28	638844,094		
Total	4	1581761769			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 99,0%	Superior 99,0%
Intercepción	-347,914543	501,894457	-0,6932026	0,53802925	-1945,1667	1249,33762	-3279,434549	2583,605464
Variable X 1	4866,809595	97,8666055	49,729012	1,7906E-05	4555,35438	5178,26481	4295,179628	5438,439562

Salida de regresión áreas

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de	0,999235915
Coefficiente de	0,998472414
R ² ajustado	0,997963218
Error típico	8470,918625
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media Cuadrado	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1,4071E+11	1,4071E+11	1960,88267	2,5351E-05
Residuos	3	215269387	71756462,4		
Total	4	1,4092E+11			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 99,0%	Superior 99,0%
Intercepción	-4828,83958	5319,18955	-0,9078149	0,4309024	-21756,875	12099,1956	-35897,74336	26240,0642
Variable X 1	45929,67766	1037,21214	44,2818549	2,5351E-05	42628,8057	49230,5496	39871,4156	51987,93973

Existe una relación lineal, con una correlación positiva y una probabilidad superior al 99,9%, entre los valores de absorbancia (A) y la concentración (C) en el intervalo y las condiciones estudiadas tanto si se evalúan áreas como si se evalúa la altura del pico.

Para evaluar cuál de las condiciones seleccionar se analizan varios replicados en el centro del rango de análisis y se observa que la mejor recuperación respecto al valor teórico se obtiene con la cuantificación por alturas.

4.3.1.4.2. Ensayo de linealidad

a) Varianza de la pendiente

La desviación estándar relativa o coeficiente de variación de la pendiente se calcula a partir de una ecuación en la que se relacionan la desviación estándar de la pendiente (S_b) con la pendiente (b). El resultado obtenido es de 2,011 %, inferior al 5%, con lo que se confirma la correcta linealidad del método.

El intervalo de confianza de la pendiente viene dado por la siguiente expresión: $[b \pm t \cdot S_b]$, donde t es el valor tabulado de t de student ($n-2$, $\alpha=0,05$). El resultado obtenido indica que intervalo de confianza no incluye el cero, confirmándose una vez más la relación lineal existente entre la absorbancia y la concentración en los pares de datos evaluados.

b) Análisis de varianza de la pendiente

La realización de dicho ANOVA tiene como objetivo establecer la probabilidad de que la pendiente sea igual a cero, en cuyo caso no habría regresión.

Dado que el valor de t obtenido experimentalmente ($t_{exp}= 49,73$) es mayor que el tabulado, se rechaza la hipótesis nula ($b= 0$), confirmando estadísticamente que la pendiente es significativamente diferente a cero con una probabilidad superior al 99,9%.

4.3.1.4.3. Ensayo de proporcionalidad

a) Intervalo de confianza de la ordenada en el origen

Para que exista una adecuada proporcionalidad entre concentración de analito y absorbancia, el cero debe estar incluido en el intervalo de confianza de la ordenada en el origen, que se calcula a partir de la expresión $[a \pm t \cdot S_a]$. El intervalo de confianza de la ordenada del origen obtenido ha sido el siguiente:

$$[-3279,434 \text{ — } 2583,605]$$

Al incluir el cero se puede decir que existe una adecuada proporcionalidad del método y que por tanto, no existe sesgo.

b) Análisis de varianza de la ordenada en el origen

Se trata de verificar la probabilidad de que la ordenada en el origen sea igual a cero.

Como la t experimental (-0,693) es menor que t tabulada, para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación de 0,001, se acepta la hipótesis nula ($a= 0$). De esta manera se puede afirmar que la ordenada en el origen no presenta una diferencia estadísticamente significativa con el cero. Por tanto, existe proporcionalidad en el intervalo objeto de estudio.

4.3.2. RELACIÓN ENTRE LA DOSIS DE VITAMINA B₆ ADMINISTRADA Y CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA

La vía de administración de la vitamina B₆, influye notablemente en la concentración plasmática de la misma (Figura 4.25. y 4.26.).

La concentración plasmática obtenida por vía intravenosa es más del triple de la obtenida por vía oral. Respecto al pico, como se puede observar, vía intravenosa el pico posee un hombro que sugiere la posibilidad de un solapamiento de compuestos. Descartados componentes del plasma a esos tiempos de retención, es probable que se trate de diferentes vitámeros de vitamina. Este hecho se observa de manera más acusada en el cromatograma obtenido con la administración por vía oral.

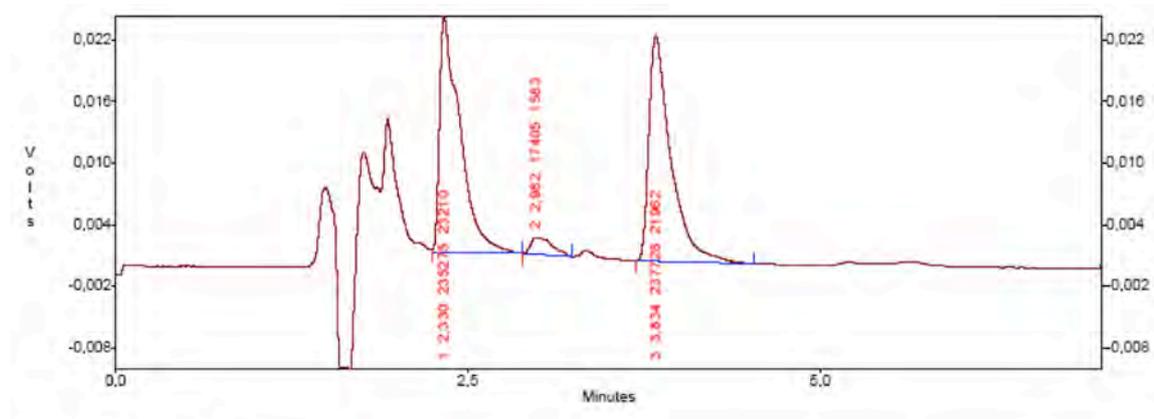


Figura 4.25. Cromatograma obtenido tras la administración intravenosa de 50 mg/kg de piridoxina hidroclorehidrato.

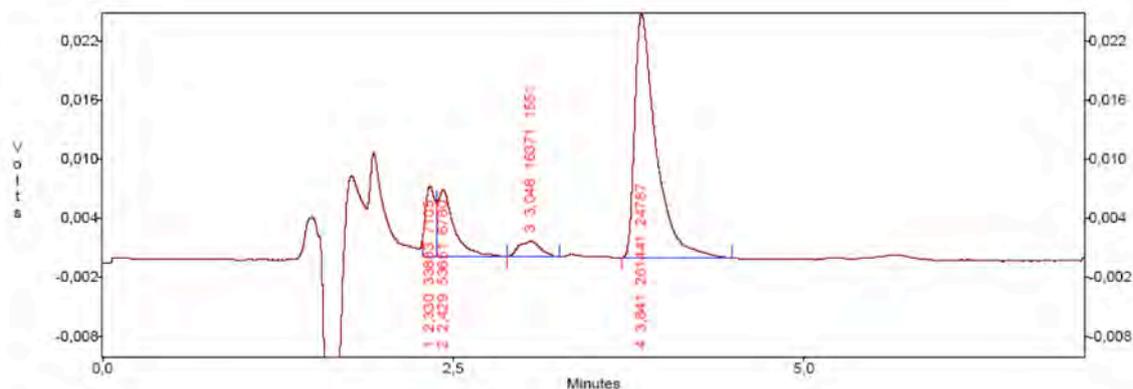


Figura 4.26. Cromatograma obtenido tras la administración oral de 50 mg/kg de piridoxina hidroclorehidrato.

Dado que el sistema cromatográfico no permite la realización de espectros en función del tiempo de cromatograma, se confirmó la naturaleza de los picos contaminando muestras con estándares de referencia.

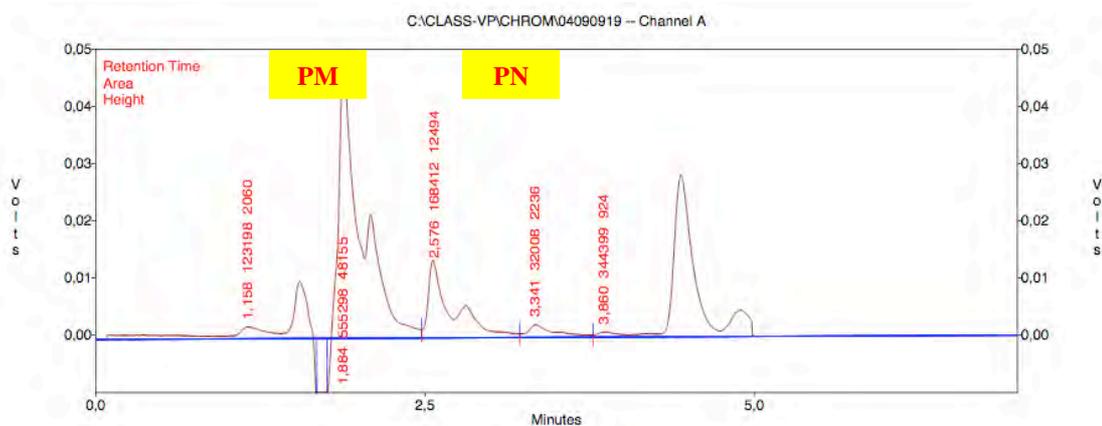


Figura 4.27. Cromatograma de plasma de ratón contaminado con patrón de piridoxina (PN) y piridoxamina (PM).

Para conocer en qué medida el método de HPLC implantado es adecuado para el estudio propuesto, es necesario determinar en primer lugar la relación entre la dosis de vitamina B₆ administrada vía oral y la

concentración plasmática obtenida. Para ello se procede conforme al siguiente protocolo:

- Determinar el peso de cada ratón para ajustar la dosis y marcar convenientemente cada animal.
- Retirada del alimento sólido para tratar de reducir en la medida de lo posible regurgitaciones de la dosis de vitamina administrada.
- Mantener en ayunas durante dos horas, permitiendo el acceso ilimitado a agua.
- Administración vía oral de un bolo único de 0,1 mL de vitamina B₆ en agua a concentraciones crecientes de 25, 50 y 100 mg/kg.
- Asegurar la absorción y distribución de la vitamina durante un 15, 30, 45 y 60 minutos tras la administración.
- Sacrificio y obtención del plasma mediante punción cardiaca.

Las variables de estudio han sido por tanto y el tiempo de distribución de dosis antes del sacrificio y la concentración de vitamina a administrar. Debido a las limitaciones del equipo de detección del sistema cromatográfico, se han ensayado dosis lo más elevadas posible pero que no produzcan efectos adversos a los animales ensayados.

El tiempo de distribución tras la administración oral de la vitamina, también repercute notablemente en las concentraciones de PN obtenidas.

En la siguiente figura se muestran los cromatogramas correspondientes a un tiempo de distribución de 60 min y 15 min tras la administración oral de un bolo único de 100 mg/kg de PN.

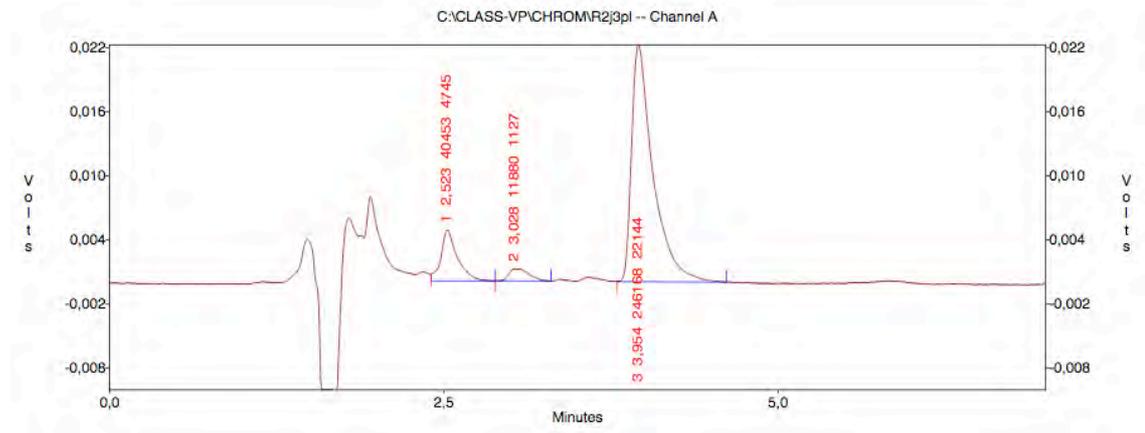


Figura 4.28. Cromatograma de plasma de ratón tras la administración oral de un bolo único de 100 mg/kg de PN y un tiempo de distribución de 60 minutos.

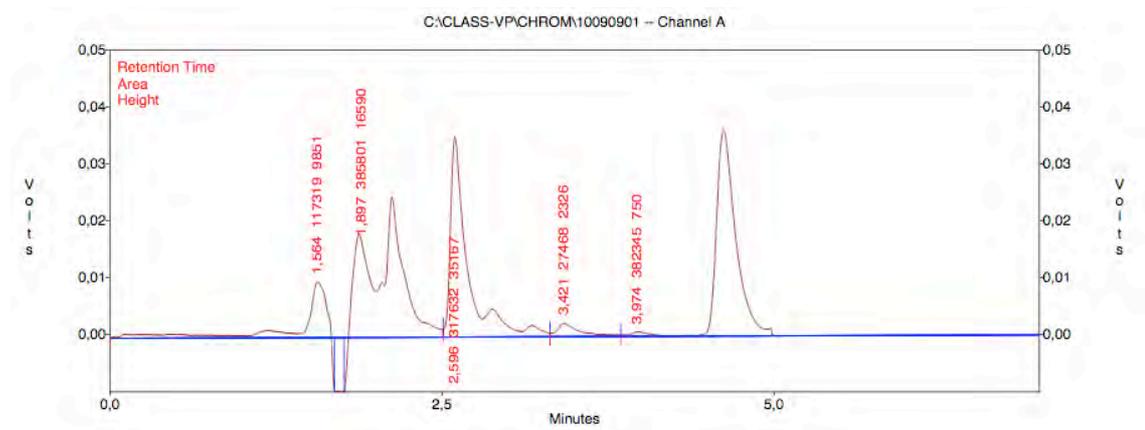


Figura 4.29. Cromatograma de plasma de ratón tras la administración oral de un bolo único de 100 mg/kg de PN y un tiempo de distribución de 15 minutos.

Por último se evalúa el efecto de la dosis oral de PN-HCl administrada con la concentración plasmática obtenida.

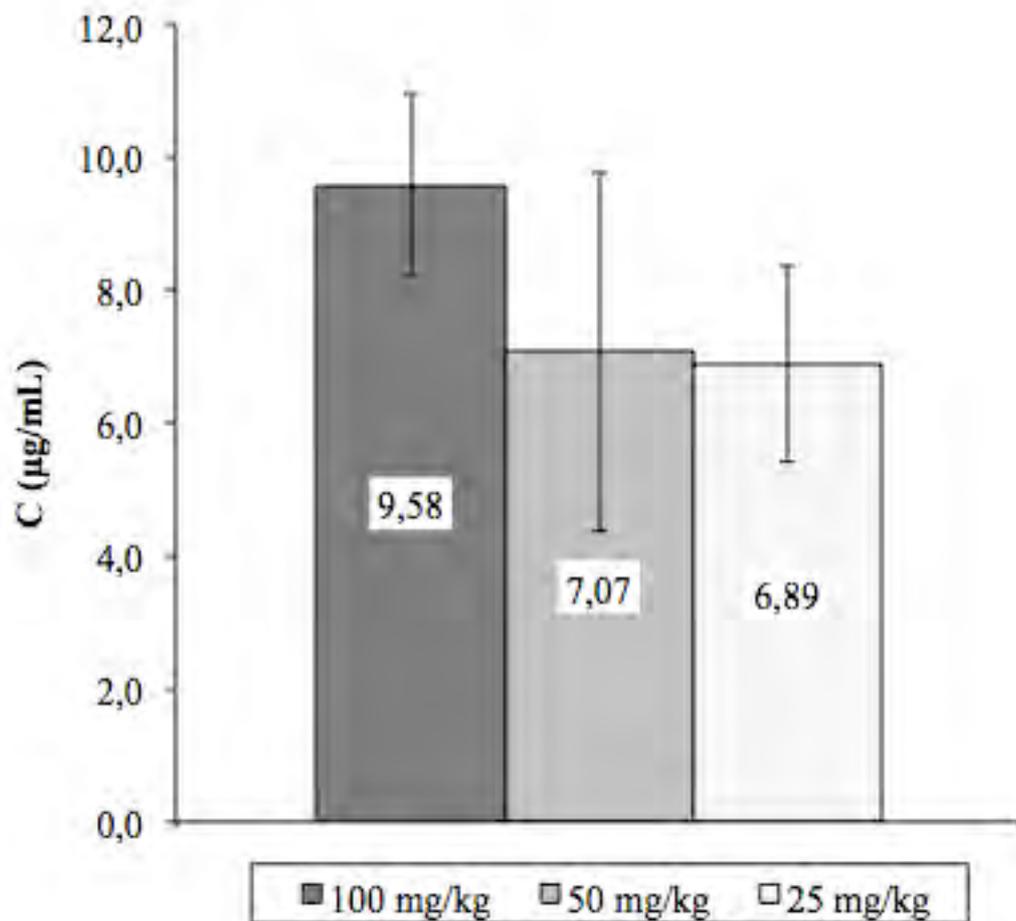


Figura 4.30. Concentraciones plasmáticas extrapoladas tras la administración de dosis orales de vitamina B₆ de 25, 50 y 100 mg/kg.

No existen diferencias estadísticamente significativa entre los datos obtenidos (n= 6), si bien, parece que existe una tendencia que a mayor dosis administrada se obtiene mayor concentración plasmática. Por lo tanto, se selecciona una dosis oral de 100 mg/kg de PN-HCl administrada en bolo único para la realización de los estudios con nigrina b, con un tiempo de distribución de 15 minutos.

4.4. ABSORCIÓN ORAL DE VITAMINA B₆ EN RATONES TRATADOS CON DOSIS IP SUBLETALES DE NIGRINA B

Respecto a la evolución de los niveles plasmáticos de vitamina B₆, en la siguiente gráfica se muestran los resultados obtenidos:

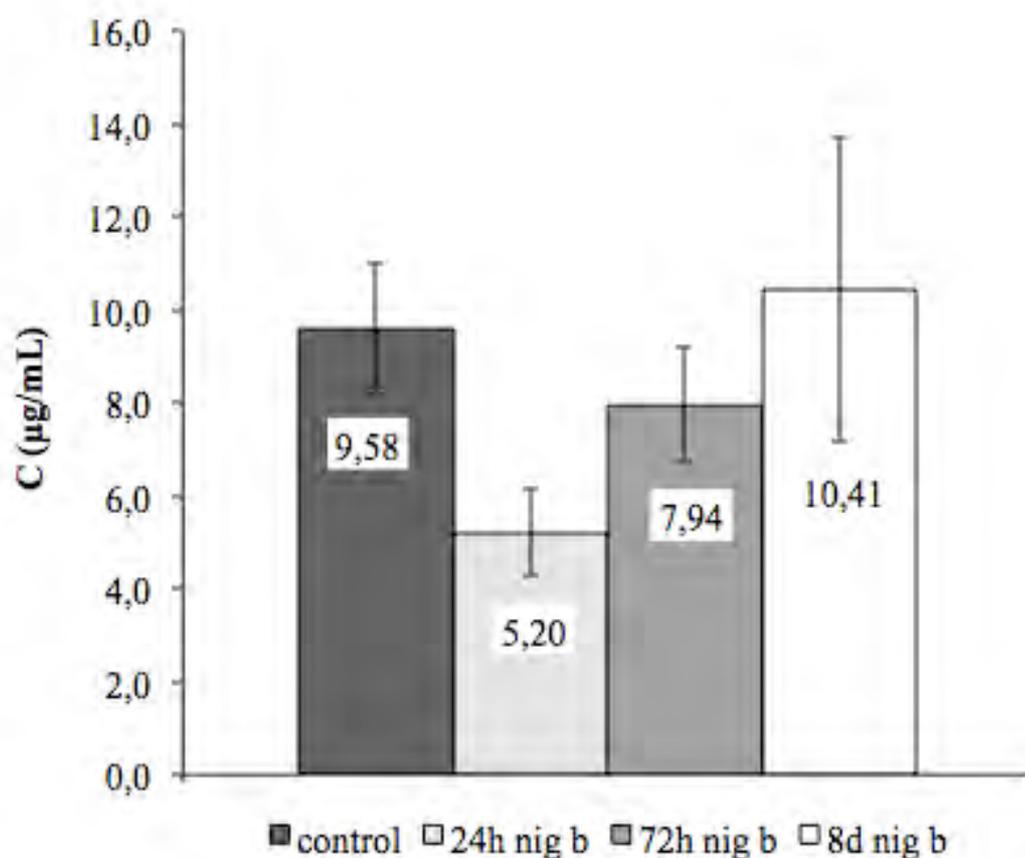


Figura 4.31. Efecto de la administración IP de nigrina 10 mg/kg sobre la absorción de vitamina B₆ administrada por vía oral.

Los resultados obtenidos muestran un descenso estadísticamente significativo con el grupo control y con los otros tiempos ensayados, en la cantidad de vitamina B₆ absorbida a las 24 h de la administración IP de dosis subletales de nigrina b. A las 72 h se aprecia una tendencia de recuperación de la absorción de vitamina B₆; de hecho no se aprecian

diferencias significativas entre el grupo control, 72 h y 8 días, en el que la recuperación es completa.

Según los estudios histológicos realizados, concordantes con los publicados por Gayoso y cols., (2005), tras 24 h de la administración IP de nigrina b, las criptas del intestino delgado aparecen completamente atrofiadas. Por su parte los villi aparecen ligeramente edematosos con alguna infiltración en lámina propia, mientras que las criptas de intestino grueso se mantienen inalteradas aunque aparecen algunas células apoptóticas despojadas en las glándulas y lumen intestinal. A las 72 h de efecto, se observa que las criptas de intestino delgado comienzan a regenerarse mientras que los villi se encuentran muy afectados y no muestran continuidad en el epitelio de cobertura. Las criptas de intestino grueso se muestran seriamente dañadas. Al cabo de 8 días la regeneración del epitelio es completa a todos los niveles.

A la vista de los resultados obtenidos es posible concluir:

- Los receptores de vitamina B₆ se encuentran fundamentalmente en las criptas del epitelio intestinal a nivel de intestino delgado.
 - El mecanismo de transporte activo supone un porcentaje importante de la vitamina B₆ capaz de alcanzar niveles plasmáticos cuando se administran dosis elevadas de vitamina, y no un mecanismo de transporte secundario como parecía hasta ahora.
 - La absorción de vitamina B₆ a nivel de intestino delgado es muy superior a la obtenida en intestino grueso cuando se administran niveles elevados de vitamina, lo cual coincide plenamente con lo descrito por el grupo del profesor Said (2003, 2004 y 2008).
-

5. DISCUSIÓN

Para que un modelo animal de una función fisiológica, en nuestro caso absorción de nutrientes o fármacos, pueda ser considerado como tal, debe reunir una serie de condiciones tales como definición fisiológica del modelo, esto es, funciones que se quieren estudiar y especificidad del blanco que se afecta, reproducibilidad del modelo y reversibilidad de los efectos que se estudian en el modelo, en nuestro caso el modelo de daño-regeneración de intestino promovido por nigrina-b.

La base del modelo es la lectina antirribosómica nigrina b cuyas dos propiedades, actividad lectina de la cadena B y actividad N-glicosidasa de la cadena A, deben estar garantizadas por el procedimiento de extracción y purificación. Se han descrito dos procedimientos de extracción y purificación de nigrina b uno basado en la afinidad de la actividad lectina por D-galactosa (Girbés y cols., 1993b) y otro basado en las propiedades iónicas de la proteína (Ferrerías y cols., 2011).

En el modelo de Girbés y colaboradores, la proteína que se activa es proteína que muestra actividad lectina, mientras que en el modelo de Ferrerías y colaboradores, aunque tiene mayor rendimiento, se aísla proteína total que puede contener proteína con distintos grados de actividad. Por lo tanto, para poder establecer el modelo de nigrina b como un modelo estándar y de fácil reproducción y manejo, se utilizó el procedimiento que implica aislamiento por afinidad (Girbés y cols., 1993b). La comodidad y sencillez de manejo del modelo es esencial para que sea útil. Por ello se escogió estudiar la vía de la administración intraperitoneal de nigrina b sobre la vía intravenosa, porque esta última exige una destreza y un control sobre el animal muy superior. Además la administración IV por la vena de la cola tiene riesgos de extravasación y por tanto de reproducibilidad.

Los aislamientos de nigrina b a partir de corteza se realizaron con material desecado a temperatura ambiente ya que en otro trabajo de tesis doctoral del mismo grupo de investigación, se había determinado que la desecación a temperatura inferior a 30°C no afecta a la actividad de la proteína pero permite un rendimiento notablemente superior de lectina, no solamente por el hecho de la pérdida de agua, sino también por la mayor capacidad de extracción en estas condiciones, como lo demuestra el hecho que la corrección por la humedad permite todavía un rendimiento dos veces superior partiendo de corteza seca que de corteza húmeda.

La extracción y purificación de nigrina b por este procedimiento permitió obtener preparaciones de alta calidad tanto estructural como funcional. El análisis electroforético en geles del 15% de poliacrilamida en presencia de SDS para determinar la homogeneidad de las proteínas, permitió asegurar su pureza. Este hecho es fundamental ávida cuenta que las dos proteínas que acompañan a nigrina b en el proceso de cromatografía de afinidad, SNA-I y SNA-II, son lectinas también de galactosa y presentan efectos específicos en la mucosa del intestino cuando se administran por vía oral en forma purificada y en grandes cantidades (Pusztai y cols., 1990). Además SNA-I es una lectina antirribosómica tetramérica pero que posee poca actividad sobre la síntesis de proteínas en comparación con la nigrina b (Van Damme y cols., 1996; Girbés y cols., 1993b).

El procedimiento utilizado incluye una mejora encontrada también en el grupo del profesor Girbés que permite eliminar un mucílago plástico con mucha tendencia a fijarse a todas las superficies, y cuya eliminación aumenta no solo el rendimiento en proteína sino la velocidad del proceso y

la estabilidad de la resina y demás materiales utilizados en la cromatografía.

La actividad de lectina que posee la nigrina b no solamente permite su aislamiento mediante matrices densas de D-galactosa, como por ejemplo la Sepharose 6B tratada con ácido, sino que permite también el análisis de la capacidad de hemoaglutinación. Los datos obtenidos tanto con nigrina b tanto con SNA-I y SNA-II son muy parecidos a los publicados previamente (Girbés y cols., 1993b). Además como control se estudio también la aglutinación por ebulina f y SELfd, dos lectinas presentes en los frutos de *Sambucus ebulus*, una de las cuales, ebulina f presenta también actividad antirribosómica y los resultados obtenidos son también muy parecidos a los anteriormente publicados (Citores y cols., 1997).

Aunque no se ha estudiado en este trabajo, muy probablemente la interacción de la nigrina con sus blancos está mediada por esta actividad lectina. A este respecto sería muy interesante estudiar la interacción histoquímica de la lectina con los distintos tejidos, en particular el intestino, que es el blanco sobre el que se ejerce la toxicidad de la nigrina administrada por vía IV (Gayoso y cols., 2005).

La otra actividad biológica de la nigrina b es la actividad enzimática de la cadena A, que es la responsable de la actividad tóxica que se observa en las células blanco, bien sea por inhibición de la síntesis de proteínas como se ha descrito (Girbés y cols., 1993b; Gayoso y cols., 2005; Ferreras y cols., 2011) o por la estimulación de citoquinas y factores como por ejemplo TNF- α (Licastro y cols., 1993), cuestión esta última que no hemos investigado pero que sería interesante explorar.

La actividad enzimática de la nigrina b se expresa in vivo en ratones como toxicidad (Battelli y cols., 1997; Battelli y cols., 2004), en particular sobre el intestino delgado (Gayoso y cols., 2005; Girbés y cols., 2003). Los estudios histológicos realizados hasta el momento han sido en ratones a los que se les administró nigrina por vía IV. La vía intraperitoneal, como ha sido previamente comentado, conduce a efectos retrasados en el tiempo porque la proteína inyectada debe difundirse, alcanzar tejidos vascularizados y finalmente penetrar en el lecho vascular desde donde su distribución permite alcanzar todos los tejidos incluso los tejidos diana. Por lo tanto, se podría pensar que los resultados de la administración IP podrían ser diferentes a los resultados obtenidos por la administración IV.

A pesar de que para la misma cantidad de nigrina administrada la concentración que alcanza el tejido blanco es menor que la que se alcanza por vía IV, los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que los efectos tóxicos de nigrina b son muy parecidos sino idénticos. La equivalencia para los mismos efectos en el intestino delgado se requieren 5 mg/kg de proteína por vía IV y 10 mg/kg por vía IP. Se analizaron también otros tejidos y al igual que sucede en la administración IV de dosis subletales, no se detectan mediante histología efectos sobre otros tejidos.

El efecto de la administración de la nigrina sobre los intestinos de ratón como ha quedado de manifiesto en los resultados, se produce de manera secuencial, primero sobre las criptas de intestino delgado, después sobre los villi y criptas de intestino grueso y por último regeneración. El seguimiento de la variación de los pesos de los animales tratados con nigrina indica también que se produce recuperación completa a las dos semanas. Por lo

tanto se trata de un comportamiento que podría utilizarse como sistema modelo animal in vivo que permitiría estudiar no solamente el proceso tóxico (toxocinética) y su regeneración sino también la absorción de fármacos, nutrientes y otros tóxicos.

Respecto al mecanismo de acción de la nigrina se ha descrito que la administración IV de esta lectina en ratones provoca la destrucción de las células de las criptas mediante apoptosis (Gayoso y cols., 2005). En el presente trabajo, los estudios histológicos indican que la administración IP de dosis subletales de nigrina provoca efectos similares de indudable carácter apoptótico como lo indica la condensación de la cromatina. Estas células apoptóticas se concentran fundamentalmente en el tercio medio de las criptas, que pierden su estructura cilíndrica para transformarse en estructuras tipo bolsa, con células muertas y restos celulares en su interior y células madre remanentes en las paredes.

Los efectos tóxicos temporales de nigrina b se superponen al proceso de regeneración fisiológica de las células del epitelio intestinal. El recambio de las células intestinales se produce de la siguiente manera:

- a) proliferación de células madre a células ligeramente diferenciadas que conforman el denominado *transit amplifying compartment*;
 - b) migración de estas células hasta la base de los villi;
 - c) fin de la diferenciación con la aparición de células Goblet, células enteroendocrinas y enterocitos;
 - d) migración de los enterocitos hasta el ápice de los villi;
 - e) muerte de los enterocitos y descamación al lumen intestinal.
-

Simultáneamente las células madre intestinales deben transformarse en células de Paneth que están especializadas en la secreción de proteínas antibióticas en el lumen intestinal.

Para que se den estas dos cadenas de procesos que permiten que las células madre intestinales de las criptas se transformen en los cuatro tipos de células diferenciadas, es necesario que las células madre posean un mecanismo de diferenciación y migración en la base de los villi que se desconoce en la actualidad. Potten y colaboradores (2009) en su reciente revisión en *Cell Proliferation* (The Stem Cells of Small Intestinal Crypts: Where are they?) plantea la cuestión sobre la localización de las células madre y su diferenciación en las células derivadas. Existen dos hipótesis fundamentales basadas en la detección de biomarcadores presuntamente específicos de células madre intestinales por un lado y de radiomarcaje y seguimiento del tránsito de las células en diferenciación por otro. La primera hipótesis supone que las células madre se encuentran en posición +4 contando desde el fondo de la cripta. La segunda hipótesis sugiere que las células madre estarían interdigitadas con las células de Paneth. Muy posiblemente las dos hipótesis sean correctas y la realidad sea una mezcla de ambas, difícil de visualizar, y que exige mucha más investigación.

Los experimentos con el modelo de nigrina posiblemente ayudarán a explorar el mecanismo de proliferación y migración, ávida cuenta de que lo que hace la nigrina es promover la ablación de las células poco diferenciadas a partir de la célula madre que se encuentran en el tercio medio de la cripta y esto a dosis subletales (10 mg/kg IP). La regeneración se produce porque las dosis subletales no destruyen completamente dichas células, por lo tanto al quedar algunas intactas, puede regenerarse el villi y

reconstruirse la arquitectura epitelial. A dosis letales, la destrucción masiva de dichas células provoca una destrucción del epitelio que es incompatible con la vida. En este caso la velocidad de regeneración y restauración de la mucosa es inferior al daño que se inflige con nigrina y los animales lógicamente mueren.

Tradicionalmente se ha asumido que el colorante azul de Evans tiñe células muertas del epitelio intestinal (Ogawa y cols., 2002). Ello significa que la acumulación de colorante se produce por una falta de vitalidad celular determinada por la abolición del potencial de membrana y/o alteraciones provocadas por sustancias tóxicas como por ejemplo el TNBS, la oxazolona y el dextran sulfato (Wirtz y cols., 2007). Nuestros resultados a concentraciones subletales de nigrina, indican que si bien se produce acumulación de azul de Evans, no se pierde la barrera de permeabilidad intestinal, lo que conduciría a la pérdida del epitelio y probablemente a la muerte del animal. Los resultados temporales de acumulación del colorante coinciden con los resultados temporales de la toxicidad analizada histológicamente.

Si la nigrina b provocase la pérdida de permeabilidad se produciría un flujo de sustancias xenobióticas mucho más libre que en su presencia. Los resultados obtenidos en la presente memoria sobre la absorción de vitamina B₆ que discutiremos después, indican que la nigrina, si bien promueve la destrucción de células de las criptas y por tanto la atrofia de la mucosa, no afecta a la permeabilidad del tejido en su conjunto. Las células del villi se encuentran en una situación de tránsito continuo, salen de las criptas, se convierten en villi y reemplazan a las células descamadas al lumen intestinal del vértice del villi. El resultado es que el villi se hace más

pequeño y si la concentración de nigrina es lo suficientemente elevada acaba por desaparecer por la drástica reducción en la transformación de las células de la cripta en células del villi y por la pérdida de células por descamación del villi. En el intestino grueso sucede algo parecido al intestino delgado.

Este modelo de ablación de las células de las criptas del intestino delgado puede ser incluso de mayor utilidad que los denominados modelos químicos, que actúan provocando un efecto tóxico sobre el epitelio intestinal de consecuencias caotrópicas que conlleva la destrucción del epitelio así como la pérdida de permeabilidad (Wirtz y cols., 2007). Estos modelos químicos de roedores se han utilizado mucho en la investigación de las denominadas patologías inflamatorias intestinales humanas como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (Wirtz y cols., 2007; González-Rey y cols. 2006).

La diferencia de los modelos químicos con el modelo de nigrina estriba precisamente en la naturaleza de la agresión, que en el caso de los modelos químicos es destructiva y de tipo cuantitativo mientras que en el caso de la nigrina es ablativa y de tipo enzimática.

Como prueba de concepto del modelo de nigrina de daño-regeneración, se ha estudiado la absorción de vitamina B₆ en animales tratados con nigrina (10 mg/kg IP). Para ello en primer lugar se implantó una metodología analítica de sensibilidad y especificidad adecuada (HPLC) para procesar muestras plasmáticas con dicha vitamina, mejorando la técnica de preparación de las muestras y optimizando por tanto el análisis.

Los resultados indican la utilidad de este modelo para investigar no solo los mecanismos de reposición de las células responsables de la absorción, sino también confirman el tipo de transporte de la vitamina B₆. Los datos disponibles del grupo del profesor Said (2003 y 2008) sugieren que el transporte de vitamina B₆ en cultivos celulares se produce por un mecanismo de transporte mediado por receptor de tipo concentrativo. Los efectos de la administración IP de 10 mg/kg de nigrina se ejercen fundamentalmente a tiempos tempranos, de manera que nuestra primera medida realizada a las 24 h después de la administración ya ofrece una reducción notable en la acumulación plasmática de vitamina B₆. En las siguientes medidas se observa una recuperación que es prácticamente total a las 72 h. Según los resultados obtenidos del estudio histológico, a las 24 h sólo se aprecia daño consistente en las criptas del intestino delgado mientras que los villi y las criptas de intestino grueso aparecen relativamente intactas.

Como ya se ha comentado se produce absorción de vitamina B₆ tanto en ingestión delgado (Leklem, 1990; Said y cols., 2008) como en intestino grueso (Said, 2004). En este último caso se supone que la vitamina B₆ procede fundamentalmente de la síntesis por la microflora bacteriana (Said y cols., 2003) aunque el componente mayoritario en el proceso de absorción no está bien estudiado. Por lo tanto, muy probablemente, y en base a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, la absorción mayoritaria parece producirse por las criptas del intestino delgado, ya que a las 72 h si bien se produce el deterioro de las criptas de intestino grueso, la absorción ya se ha recuperado.

6. CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de dosis subletales de nigrina b (10 mg/kg) provoca un cuadro tóxico en ratones equivalente al que se observa tras la administración intravenosa de 5 mg/kg.
2. El blanco de nigrina b intraperitoneal (10 mg/kg) es el intestino, afectándose más el delgado que el grueso.
3. El efecto tóxico de nigrina se ejerce de manera secuencial, primero sobre las criptas del intestino delgado y después sobre los villi y las criptas del intestino grueso.
4. Los efectos subletales de nigrina a la dosis indicada tras su administración intraperitoneal, son reversibles recuperándose el peso de los animales tratados a los nueve días.
5. La filtración a través de membrana de nylon de 0,22 μ m de diámetro es un recurso adecuado para la preparación y limpieza de muestras plasmáticas de ratón para la determinación de vitamina B₆ por cromatografía líquida de alta resolución.
6. La administración de 100 mg/kg en bolo oral de vitamina B₆ proporciona niveles plasmáticos sensibles para la detección mediante HPLC-UV.
7. El máximo de absorción del colorante azul de Evans administrado por vía IV por todo el tracto gastrointestinal en ratones tratados con nigrina b, coincide con los efectos

histológicos globales, es decir la degradación de criptas de intestino delgado, villi y criptas de intestino grueso, que es máxima a las 48 h.

8. La administración intraperitoneal de 10 mg/kg de nigrina b produce una notable reducción en los niveles plasmáticos de vitamina B₆ que coincide temporalmente con el daño de las criptas del intestino delgado y que se recupera cuando se recuperan éstas, indicando que el intestino delgado es el componente mayoritario en la absorción de la vitamina B₆.
9. Dosis orales de 100 mg/kg de vitamina B₆ proporcionan niveles plasmáticos equivalentes a dosis hasta cuatro veces inferiores. A pesar de ello, la nigrina es capaz de reducir la concentración plasmática de la vitamina, lo que demuestra claramente que la vitamina no se absorbe por difusión sino por un proceso mediado por transportador.
10. Nuestros resultados nos permiten afirmar que la nigrina a las 24 h después de su administración reduce el número de células de transportador de la vitamina B₆ en las criptas de intestino delgado y por lo tanto estas criptas son el lugar preferente de absorción.

7. REFERENCIAS

- Anderson, B.B.; Perry, G.M.; Clements, J.; Greany, M.F. (1989). Rapid uptake and clearance of pyridoxine by red blood cells in vivo. *American Journal of Clinical Nutrition*, 50: 1059-1063.
 - Aoyagi, K.; Iida, M.; Yao, T. (1997). Characteristic endoscopy features of intestinal lymphangiectasia. *Hepatogastroenterology*, 44: 133-138.
 - Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154: 237-282.
 - Barnes, R.E.; De Ridder P.H. (1993). Fat absorption in patients with functional intestinal lymphangiectasia and lymphangiectic cysts. *American Journal of Gastroenterology*, 88: 887-890.
 - Battelli, M.G.; Citores, L.; Buonamici, L.; Ferreras, J.M.; de Benito, F.M.; Stirpe, F.; Girbés, T. (1997). Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: a comparison with ricin. *Archives of Toxicology*, 71: 360-364.
 - Battelli, M.G.; Musiani, S.; Buonamici, L.; Santi, S.; Riccio, M.; Maraldi, N.M.; Girbés, T.; Stirpe, F. (2004). Interaction of volkensin with HeLa cell: binding, endocytosis, intracellular localization, degradation and exocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 1975-1984.
 - Bender, D.A. (1999). Non-nutritional uses of vitamin B6, *British Journal of Nutrition*, 81: 7-20.
 - Bismar, M.M.; Sinicrope, F.A. (2002). Radiation enteritis. *Current Gastroenterology Reports*, 4: 361-365.
 - Bor, M.V.; Refsum, H.; Bisp, M.R.; Bleie, O.; Schneede, J.; Nordrehaug, J.E.; Ueland, P.M.; Nygard, O.K.; Nexø, E. (2003). Plasma Vitamin B6 Vitamers before and after Oral Vitamin B6
-

- Treatment: A Randomized Placebo-controlled Study. *Clinical Chemistry*, 49(1): 155-161.
- Bridle, P.; García-Viguera, C. (1997). Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry*, 59(2): 299-306.
 - Carmel, R. (1999). Folic acid. En: Shils, M.; Shike, M.; Ross, A.C.; Caballero, B.; Cousins, R.J., Eds. *Modern Nutrition in health and disease*, 9th ed. Baltimore, U.S.A.: Williams & Wilkins. pp. 470-481.
 - Caturla, M.C.; Celma, C.; Encima, G.; Jansat, J.M.; Nieto, C.; Pérez, J.A.; Rovira, M.; Tost, D. (2001). Métodos en Bioanálisis. En: Pérez, J.A. y Pujol, M. Eds. *Validación de Métodos Analíticos*. Barcelona, España: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. pp. 209-249.
 - Chand, N.; Anastasios, A.M. (2006). Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40: 3-14.
 - Chatzimichalakis, P.F.; Samanidou, V.F.; Verpoorte, R.; Papadoyannis, I.N. (2004). Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction, *Journal of Separation Science*, 27(14): 1181–1188.
 - Christensen, K.B.; Petersen, R.K.; Kristiansen, K.; Christensen, L.P. (2010). Identification of bioactive compounds from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) that activate the human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma. *Phytotherapy Research*, 24(2): S129-132.
-

-
- Chrubasik, C.; Maier, T.; Dawid, C.; Torda, T.; Schieber, A.; Hofmann, T.; Chrubasik, S. (2008). An observational study and quantification of the actives in a supplement with *Sambucus nigra* and *Asparagus officinalis* used for weight reduction. *Phytotherapy Research*, 22(7): 913-918.
 - Citores, L.; de Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Argüeso, P.; Jiménez, P.; Testera, A.; Camafeita, E.; Méndez, E.; Girbés, T. (1997). Characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein and a structurally-related lectin from rhizomes of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *Cellular and Molecular Biology*, 43: 485-499.
 - Citores, L.; de Benito, F.M.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Argüeso, P.; Jiménez, P.; Méndez, E.; Girbés, T. (1998). Presence of polymerized and free forms of the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein ebulin and a structurally related new homodimeric lectin in fruits of *Sambucus ebulus* L. *Planta*, 204(3): 310-319.
 - Citores, L.; Rojo, M.A.; Jiménez, P.; Ferreras, J.M.; Iglesias, R.; Aranguez, I.; Girbés, T. (2008). Transient occurrence of an ebuline-related D-galactose lectine in shoots of *Sambucus ebulus* L. *Phytochemistry*, 69: 857-864.
 - Coburn, S.P. (1990). Location and Turnover of Vitamin B6 Pools and Vitamin B6 Requirements of Humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 585: 76–85.
 - Coburn, S.P.; Mahuren, J.D.; Kennedy, M.S.; Schaltenbrand, W.E.; Sampson, D.A.; O'Connor, D.K.; Snyder, D.L.; Wostmann, B.S. (1988). B6 vitamer content of rat tissues measured by isotope tracer and chromatographic methods. *Biofactors*, 1(4): 307–312.
-

- Combs, G.F. (2008). Vitamin B6. En: Combs, G.F. Ed. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 3rd ed. San Diego, U.S.A.: Elsevier Academic Press. pp. 313-330.
 - Driskell, J.A. (1994). Vitamin B6 requirements in humans. *Nutrition Research*, 14(2): 293-324.
 - Endo, Y.; Wool, I.G. (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 9054-9060.
 - Fando, J.L.; Alaba, I.; Escarmis, C.; Fernández-Luna, J.L.; Méndez, E.; Salinas, M. (1985). The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *European Journal of Biochemistry*, 149: 29-34.
 - Ferreras, J.M.; Citores, L.; de Benito, F.M.; Arias, F.J.; Rojo, M.A.; Muñoz, R.; Iglesias, R.; Girbés, T. (2000). Ribosome-inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. *Current Topics in Phytochemistry*, 3: 113-127.
 - Ferreras, J.M.; Citores, L.; Iglesias, R.; Jiménez, P.; Girbés, T. (2011). Use of ribosome-inactivating proteins from *sambucus* for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins (Basel)*, 3(5): 420-441.
 - Ferreras, J.M.; Citores, L.; Iglesias, R.; Jiménez, P.; Girbés, T. (2010). *Sambucus* ribosome-inactivating proteins and lectins. In Lord, J.M.; Hartley, M.R. (Eds.), *Toxic plant proteins, plant cell monographs*, 107-131. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag.
-

- Fonda, M.L. (1992). Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 15978–15983.
 - Fonda, M.L.; Harker, C.W. (1982). Metabolism of pyridoxine and protein binding of the metabolites in human erythrocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 35:1391–1399.
 - Font-Quer, P. (1990). Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado. 12^a Ed. Barcelona, España: Labor. pp. 752-757,
 - Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (1998). Vitamin B6. En: Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC, U.S.A.: National Academy Press. pp. 150–195.
 - Fukuwatari, T.; Itoh, K.; Shibata, K. (2009). Effects of excess pyridoxine-HCl on growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 50(2):75-79.
 - Gayoso, M.J.; Muñoz, R.; Arias, Y.; Villar, R.; Rojo, A.; Jiménez, P.; Ferreras, J.M.; Aránguez, I.; Girbes, T. (2005). Specific dose-dependent damage of Lieberkun crypts promoted by large doses of type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b intravenous injection to mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207: 138-146.
 - Girbés, T.; Barbieri, L.; Ferreras, J.M.; Arias, F.J.; Rojo, M.A.; Iglesias, R.; Alegre, C.; Escarmis, C.; Stirpe, F. (1993a). Effects of ribosome-inactivating proteins on *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* translation systems. *Journal of Bacteriology*, 175(20): 6721-6724.
-

- Girbés, T.; Citores, L.; Ferreras, J.M.; Rojo, M.A.; Iglesias, I.; Muñoz, R.; Arias, F.J.; Calonge, M.; García, J.R.; Méndez, E. (1993b). Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome- inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Molecular Biology*, 22: 1181-1186.
 - Girbés, T.; Citores, L.; Iglesias, R.; Ferreras, J.M.; Muñoz, R.; Rojo, M.A.; Arias, F.J.; García, J.R.; Méndez, E.; Calonge, M. (1993c). Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24):18195-18199.
 - Girbes, T.; Ferreras, J.M.; Arias, F.J.; Muñoz, R.; Iglesias, R.; Jimenez, P.; Rojo, M.A.; Arias, Y.; Perez, Y.; Benitez, J.; Sanchez, D.; Gayoso, M.J. (2003). Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins (RIPs) from *Sambucus*: occurrence, cellular and molecular activities and potential uses. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, 49(4): 537-545.
 - Girbés, T.; Ferreras, J.M.; Arias, F.J.; Stirpe, F. (2004). Description, distribution, phylogenetic relationship and potential roles of ribosome- inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Minireviews in Medicinal Chemistry*, 4: 461-476.
 - Gonzalez-Rey, E.; Fernandez-Martin, A.; Chorny, A.; Delgado, M. (2006). Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut*, 55(6): 824-832.
 - Hasani-Ranjbar, S.; Nayebi, N.; Larijani, B.; Abdollahi, M. (2009). A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World Journal of Gastroenterology*, 15(25): 3073-3085.
-

- Huse Bye, E. (2005). The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy*, 51(1): 1-22.
 - Iglesias, R.; Arias, F.J.; Rojo, M.A.; Escarmis, C.; Ferreras, J.M.; Girbés, T. (1993). Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Letters*, 325: 291-294.
 - Ink, S.L.; Mehansho, H.; Henderson, L.M. (1982). The binding of pyridoxal to hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 4753–4757.
 - Jackson, C.; Buchman, A.L. (2005). Advances in the management of short bowel syndrome. *Current Gastroenterology Reports*, 7: 373-378.
 - Jensen, R.T. (2000). Gastrointestinal abnormalities and involvement in systemic mastocytosis. *Hematology-Oncology Clinics of North America*, 14: 579-623.
 - Johnson, M.D. (2011). The Digestive System and Nutrition. En: Johnson M.D. Ed. *Human Biology: Concepts and Current Issues*, 6th Ed. San Francisco, U.S.A.: Benjamin-Cummings Publishing Company.
 - Jurna, I.; Carlsson, K.H.; Kömen, W.; Bonke, D. (1990). Acute effects of vitamin B6 and fixed combinations of vitamin B1, B6 and B12 on nociceptive activity evoked in the rat thalamus: dose-response relationship and combinations with morphine and paracetamol. *Klinische Wochenschrift*, 68(2): 129-135.
 - Kaack, K.; Austed, T.; (1998). Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra L.*) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition*. 52(3):187-98.
-

- Kaczanowska, M.; Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 477-494.
- Kalb, V.F.; Bernlohr, R.W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Analytical Biochemistry*, 82(2): 362-371.
- Katz, D.E.; Taylor, D.N. (2001). Parasitic infections of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology Clinics of North America*, 30: 797-815.
- Khan, S. (2005). Eosinophilic gastroenteritis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19(2): 177-198.
- Khojasteh, A.; Haghshenass, M.; Haghghi, P. (1983). Current concepts immunoproliferative small intestinal disease. A “ third-world lesion”. *New England Journal of Medicine*, 308: 1401-1405.
- Kim, K.M.; Lee, A.; Choi, K.Y. (1998). Intestinal tuberculosis: clinicopathologic analysis and diagnosis by endoscopy biopsy. *American Journal of Gastroenterology*, 93: 606-609.
- Klionsky, D.J. (2009). Crohn's Disease, Autophagy, and the Paneth Cell. *New England Journal of Medicine*, 360: 1785-1786.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Leklem, J.E. (1990). Vitamin B-6: a status report. *Journal of Nutrition*, 120(11): 1503-1507.
- Leklem, J.E. (1991). Vitamin B6. En: Machlin LJ, ed. Handbook of Vitamins. New York, U.S.A.: Marcel Dekker. pp. 341–392.

- Leklem, J.E. (1999). Vitamin B6. En: Shils ME, Olson JA, Shike M et al., Eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th ed. Baltimore, U.S.A.: Williams & Wilkins. pp. 413–421.
 - Licastro, F.; Morini, M.C.; Bolognesi, A.; Stirpe, F. (1993). Ricin induces the production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human peripheral-blood mononuclear cells. *Biochemical Journal*, 294(2): 517-520.
 - Lin, H.C. (2004). Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 292: 852-858.
 - López-Otín, C.; Barber, D.; Fernández-Luna, J.L.; Soriano, F.; Méndez, E. (1984). The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *European Journal of Biochemistry*, 143: 621-634.
 - Lord, J.M.; Roberts, L.M.; Robertus, J.D. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB Journal*, 8: 201-208.
 - Martin, L.; Jacomet, S.; Thiebault, S. (2008). Plant economy during the Neolithic in a mountain context: the case of "le Chenet des Pierres" in the French Alps (Bozel-Savoie, France). *Vegetation History and Archaeobotany*, 17(1): 113-122.
 - Matarese, L.E.; Steiger, E. (2006). Dietary and medical management of short bowel syndrome in adult patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40: S85-S93
 - Maverakis, E.; Fung, M.A.; Lynch, P.J. (2007). Acrodermatitis enterophatica and an overview of zinc metabolism. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56: 116-124.
-

- McCormick, D.B.; Chen H. (1999). Update on interconversions of vitamin B-6 with its coenzyme. *Journal of Nutrition*, 129: 325–327.
 - Merrill, A.H.; Henderson, J.M. (1990). Vitamin B6 metabolism by human liver. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 585:110–117.
 - Meyers, S.J.; Ehrenpreis, E.D.; Craig, R.M. (2001). Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. Curr Treatment Options *Gastroenterology*, 4: 7-14.
 - Morlon-Guyot, J.; Helmy, M.; Lombard-Frasca, S.; Pignol, D.; Piéroni, G.; Beaumelle, B. (2003). Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 17006-17011.
 - Muñoz, R.; Arias, Y.; Ferreras, J.M.; Rojo, A.; Jiménez, P.; Girbés, T. (2001). Sensitivity of several cancer cell lines to ricin and the novel type 2 ribosome- inactivating protein nigrin b. *Cancer Letters*, 167: 163-169.
 - Nielsen, K.; Boston, R.S. (2001). Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 785-816.
 - Ogawa, Y.; Kanatsu, K.; Iino, T.; Kato, S.; Jeong, Y.I.; Shibata, N.; Takada K.; Takeuchi K. (2002). Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis by microspheres of ellagic acid in rats. *Life Sciences*, 71(7): 827-839.
 - Olsnes, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, 44: 361-370.
 - Olsnes, S.; Pihl, A. (1982). Toxic lectins and related proteins. En: Cohen, P.; van Heyningen, S. Eds. *Molecular Action of Toxins and*
-

- Viruses. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Biomedical Press. pp. 51-105.
- Pascal, J.M.; Day, P.J.; Monzingo, A.F.; Ernst, S.R.; Robertus, J.D.; Iglesias, R.; Pérez, Y.; Ferreras, J.M.; Citores, L.; Girbés, T. (2001). 2,8-A cristal structure of a non-toxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins*, 43: 319-326.
 - Potten, C.S.; Gandara, R.; Mahida, Y.R.; Loeffler, M.; Wright, N.A. (2009). The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Proliferation*, 42(6): 731-750
 - Pusztai, A.; Ewen, S.W.; Grant, G.; Peumans, W.J.; van Damme, E.J.; Rubio, L.; Bardocz, S. (1990). Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*, 46(2): 308-316.
 - Quigley, E.M.; Quera, R. (2006). Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics and probiotics. *Gastroenterology*, 130: S78-S90.
 - Riordan, S.M.; Mc Iver, C.J.; Wakefield, D. (2001). Small intestinal mucosal immunity and morphometry in luminal overgrowth of indigenous gut flora. *American Journal of Gastroenterology*, 96: 494-500.
 - Rodríguez-Cabezas, M.E.; Gálvez, J.; Lorente, M.D.; Concha, A.; Camuesco, D.; Azzouz, S.; Osuna, A.; Redondo, L.; Zarzuelo, A. (2002). *Journal of Nutrition*, 132: 3263-3271.
 - Rossi, P.; Covarelli, P.; Cirocchi, R. (1996). Intestinal lymphangiectasis in adults. *Giornale di Chirurgia*, 17:171-174.
 - Rottoli, M.; Castiglioni, E. (2009). Prehistory of plant growing and collecting in northern Italy, based on seed remains from the early
-

- Neolithic to the Chalcolithic (c. 5.600-2.100 cal. B.C.), *Vegetation History and Archaeobotany*, 18: 91-103.
- Ruskone-Fourmestraux, A.; Delmer, A.; Henequin, C. (2006). Gastro-intestinal lymphomas. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 2: 2S81-2S90.
 - Russo, P.A.; Brochu, P.; Seidman, E.G. (1999). Autoimmune enteropathy. *Pediatric and Development Pathology*, 2: 65-71.
 - Rutenber, E.; Ready, M.; Robertus, J.D. (1987). Structure and evolution of ricin B chain. *Nature*, 326: 624-626.
 - Rybak, M.E.; Pfeiffer, C.M. (2009). A simplified protein precipitation and filtration procedure for determining serum vitamin B6 by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 388: 175–177.
 - Said, H.M. (2004). Recent Advances in Carrier-Mediated Intestinal Absorption of Water-Soluble Vitamins. *Annual Review of Physiology*, 66: 419-446.
 - Said, H.M.; Ortiz, A.; Ma, T.Y. (2003). A carrier-mediated mechanism for pyridoxine uptake by human intestinal epithelial Caco-2 cells: regulation by a PKA-mediated pathway. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 225: C1219-C1225.
 - Said, Z.M.; Subramanian, V.S.; Vaziri, N.D.; Said, H.M. (2008). Pyridoxine uptake by colonocytes: a specific and regulated carrier-mediated process. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 294: C1192–C1197.
 - Sakurai, T.; Asakura, T.; Matsuda, M. (1988). Transport and metabolism of pyridoxine in the intestine of the mouse. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 34(2): 179-187.
-

- Sands, B.E. (2004). From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 126: 1518-1532.
 - Sandvig, K.; van Deurs, B. (2002). Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18: 1-24.
 - Schaeffer, M.C.; Sampson, D.A.; Skala, J.H.; Gietzen, D.W.; Grier, R.E. (1989). Evaluation of Vitamin B-6 Status and Function of Rats Fed Excess Pyridoxine. *Journal of Nutrition*, 119(10): 1392-1398.
 - Simons, B.D.; Clevers, H. (2011). Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Experimental Cell Research*, 317(19): 2719-2724.
 - Singer, S.J.; Nicolson, G.L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.
 - Stirpe, F.; Battelli, M.G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Science*, 63: 1850-1866.
 - Stirpe, F.; Bolognesi, A.; Bortolotti, M.; Farini, V.; Lubelli, C.; Pelosi, E.; Polito, L.; Dozza, B.; Strocchi, P.; Chambery, A.; Parente A.; Barbieri, L. (2007). Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). *Toxicon*, 50(1): 94–105.
 - Svinth, M.; Steinghardt, J.; Hernandez, R.; Duh, J.K.; Kelly, C.; Day, P.; Lord, M.; Girbés, T.; Robertus, J.D. (1998). Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249: 637-642.
-

- Tack, P.; Burgeois, P.; Devos, E. Demeester, J. (1988). Clinical, biochemical and electrophysiological features of two cases. *ACTA Neurologica Belgica*, 88: 229-238.
 - Timberlake, C.; Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolics compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27: 97-105.
 - Van Damme, E.J.; Barre, A.; Rougé, P.; Van Leuven, F.; Peumans, W.J. (1996). Characterization and molecular cloning of Sambucus nigra agglutinin V (nigrin b), a GalNAc-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (Sambucus nigra). *European Journal of Biochemistry*, 237: 505-513.
 - Van Hoof, V.O.; De Broe, M.E. (1994). Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 31(3): 197–293.
 - Van Wouwe, J.P. (1989). Clinical and laboratory diagnosis of acrodermatitis enterophatica. *European Journal of Pediatrics*, 149: 2-8.
 - Vanaclocha, B.; Cañigüeral, S.; Vila, R.; Risco, E.; Pérez, F.; Portillo, A.; Freixa, B.; Milo, B.; Alonso, J.R.; Ríos, J.L.; Morales, M.H; Bachiller, L.I. (2003). Saucó. En: Vanaclocha, B.; Cañigüeral, S. Eds. *Fitoterapia: vademécum de prescripción*, 4ª Ed. Barcelona, España: Masson, S.A. pp 930-931.
 - Veberic, R.; Colaric, M.; Stampar, F. (2008). Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern mediterranean region. *Food Chemistry*. 106, 153-157.
-

- Wehkamp, J.; Salzman, N.H.; Porter, E.; Nuding, S.; Weichenthal, M.; Petras, R.E.; Shen, B.; Schaeffeler, E.; Schwab, M.; Linzmeier, R.; Feathers, R.W.; Chu, H. Lima, H.; Jr. Fellermann, K.; Ganz, T.; Stange, E.F.; Bevins, C.L. (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18129-18134.
- Wilson, D.N.; Nierhaus, K.H. (2006). The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis. *Cellular and Molecular Life Science*, 63: 2725-2737.
- Wirtz, S.; Neufert, C.; Weigmann, B.; Neurath M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 2: 541-546.
- Yeho, E.; Horowitz, M.; Russo, A. (1993). Effect of pelvic irradiation on gastrointestinal function. *American Journal of Medicine*, 95: 397-406.
- Young, Y.; Abreu, M.T. (2006). Advances in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, 8: 470-477.
- Youngman, E.M.; Green, R. (2007). Ribosomal translocation: LepA does it backwards. *Current Biology*, 17: R136-139.
- Zab, A.; Simopoulos, C.; Karayiannikis, A. (2004). *Journal of Gastroenterology*, 39: 413-421
- Zakay-Rones, Z.; Thom, E.; Wollan, T.; Wadstein, J. (2004). Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry

extract in the treatment of influenza A and B virus infections.
Journal of International Medical Research, 32(2): 132-140.