



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

**Departamento de Biología Celular, Histología y
Farmacología**

TESIS DOCTORAL

“Efecto de la administración intravenosa de nigrina b sobre
la absorción de minerales, producción de malondialdehido
y enzimas antioxidantes”

Presentada por Bernarda Prieto Jiménez para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por: Lucía Luisa Pérez Gallardo, Jesús
Tejero del Río y Tomás Girbés Juan

2015

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, Dña. Lucía Luisa Pérez Gallardo Catedrática de Escuela Universitaria de la Universidad de Valladolid y D. Jesús Tejero del Río, Profesor Asociado de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, directores de esta Tesis Doctoral certifican que el trabajo realizado por Dña. Bernarda Prieto Jiménez puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 1 de septiembre de 2015

Fdo.: Lucía Luisa Pérez Gallardo

Fdo.: Jesús Tejero del Río

Fdo.: Tomás Girbés Juan

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento a los profesores D. Tomás Girbés Juan, D^a Lucía Luisa Pérez Gallardo y D. Jesús Tejero del Río, por la dirección de esta Tesis Doctoral, por sus enseñanzas, las facilidades prestadas, su acogida y su amistad.

Agradezco la gentileza de los profesores Manuel Garrosa y Manuel Gayoso por sus enseñanzas y permitirme realizar los análisis histológicos en su laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina.

Agradezco la generosa ayuda en todo momento de mis compañeros de laboratorio, especialmente al Dr. José E. Basterrechea, y en particular al Prof. Miguel Ferreras por su ayuda en las fases iniciales de este trabajo.

A todos muchas gracias.

El presente trabajo se ha presentado a un congreso científico y ha dado lugar a manuscritos pendientes de publicación.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.

B. Prieto, C. Mate, I. Bayona, M.A. Navarro, F.J. Navas, L. Pérez-Gallardo, J.M. Ferreras, T. Girbés. Effect of a sublethal dose of nigrin b on intestinal absorption of different minerals in Swiss mice. *Magnesium Research*, 23, 149 (2010).

B. Prieto, L. Pérez-Gallardo, J. Tejero, D. Córdoba-Díaz and T. Girbés, P. Jiménez Nigrin b administration promoted the activation of antioxidant enzymes. *Toxins*, en revisión (2015).

B. Prieto, L. Pérez-Gallardo, T. Girbés, J. Tejero, D. Córdoba-Díaz, P. Jiménez. Mineral plasma accumulation following the administration of a non toxic dose of the ribosome-inactivating protein nigrin b. *Toxins*, en preparación (2015).

COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Prieto, B., Maté, C., Bayona, I., Navarro, M.A., Navas, J.F., Pérez-Gallardo, L., Ferreras, J.M., Girbés, T. Efecto de una dosis sublethal de nigrina b en la absorción de minerales en ratones Swiss. II Simposio Ibérico del Mg y V jornadas de elementos traza. Zaragoza, 16-18 junio de 2010.

FINANCIACIÓN.

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

Organismo financiador: Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. Centro de Ejecución: Fac. Medicina Univ. Valladolid. Investigador Principal: Tomás Girbés. Título:"Investigación de las inmunotoxinas para la terapia del cáncer". Periodo: 2009-2012.

Grupo de Investigación reconocido GIR "Inmunotoxinas antitumorales". Organismo financiador: Universidad de Valladolid. Centro de Ejecución: Facs. Medicina y Ciencias Univ. Valladolid. Investigador Principal: Tomás Girbés. Periodo: 2009-2013.

ÍNDICE

	págs
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Características de la pared del intestino.	9
1.2. Intestino delgado.	9
1.3. Intestino grueso.	12
1.4. Alteraciones en la pared intestinal que provocan modificaciones en la absorción.	14
1.5. Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs).	17
1.5.1. Actividad enzimática de las RIPs.	18
1.5.2. Etapa de la biosíntesis afectada por las RIPs.	19
1.6. Lectinas de <i>Sambucus</i> .	21
1.6.1. Breve reseña histórica del saúco.	21
1.6.2. Botánica y fitoquímica del saúco.	23
1.6.3. Aplicaciones actuales más frecuentes del saúco.	24
1.6.4. Toxicidad del saúco.	25
1.6.5. Nigrina.	26
1.7. Minerales.	28
1.7.1. Calcio. Absorción, metabolismo.	29
1.7.2. Magnesio. Absorción, metabolismo.	34
1.7.3. Cobre. Absorción, metabolismo.	36
1.7.4. Zinc. Absorción, metabolismo.	40
1.8. Estrés oxidativo.	43
1.9. Importancia del oxígeno.	45
1.10. Origen y tipos de radicales libres.	46
1.10.1. Tipos de radicales libres.	47
1.11. Acción de los RLO sobre las macromoléculas biológicas.	49

1.12.	Mecanismo de protección celular contra las s. oxidantes.	52
1.12.1.	Defensas enzimáticas.	53
1.12.2.	Enzimas antioxidantes.	54
1.13.	Peroxidación lipídica y Malondialdehído (MDA).	59
2.	OBJETIVOS	61
2.1.	Objetivos.	62
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1.	Material de laboratorio.	64
3.1.1.	Equipos.	64
3.1.2.	Material fungible.	65
3.1.3.	Reactivos químicos.	66
3.1.4.	Materiales biológicos.	69
3.1.4.1.	Muestras vegetales.	69
3.1.4.2.	Animales de experimentación.	69
3.1.4.3.	Sangre.	70
3.2.	Métodos.	70
3.2.1.	Obtención de nigrina b a partir de corteza de <i>Sambucus nigra</i> L.	70
3.2.2.	Caracterización de lectinas.	71
3.2.3.	Diseño experimental.	74
3.2.4.	Administración de nigrina b.	76
3.2.5.	Estudio I.	77
3.2.6.	Estudio II.	81
3.2.6.1.	Determinación de peroxidación lipídica.	81
3.2.6.2.	Determinación de enzimas antioxidantes.	83
3.2.7.	Obtención de muestras para análisis histológico.	90
3.2.8.	Análisis estadístico.	94
4.	RESULTADOS	95

4.1.	Preparaciones de nigrina b de la corteza de <i>Sambucus nigra</i> L.	96
4.2.	Caracterización y control de calidad de nigrina b.	96
4.3.	Estudio I.	98
4.3.1.	Evolución del peso y la longitud del intestino delgado.	98
4.3.2.	Variación de la comida ingerida.	99
4.3.3.	Variación de la cantidad y la morfología de las heces excretadas.	100
4.3.4.	Absorción aparente de minerales.	103
4.4.	Estudio II.	107
4.4.1.	Variación de la longitud del intestino delgado.	107
4.4.2.	Estrés oxidativo.	108
4.4.3.	Enzimas antioxidantes.	114
4.4.3.1.	Catalasa.	114
4.4.3.2.	Superóxido dismutasa.	121
4.4.3.3.	Glutation.	126
4.5.	Estudio de la toxicidad en ratones provocada por la administración i.v. de nigrina b de corteza de <i>Sambucus nigra</i> L.	133
4.5.1.	Análisis histológicos.	133
5.	DISCUSIÓN	141
6.	CONCLUSIONES	154
7.	BIBLIOGRAFÍA	157

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Características de la pared del intestino.

La función principal del tubo digestivo es proporcionar al organismo agua electrolitos y nutrientes de forma continua, mediante la absorción de los productos finales de la digestión en la totalidad del intestino delgado y la mitad proximal del intestino grueso.

En la pared del intestino del interior al exterior se aprecian las siguientes capas:

- **Mucosa.** Es una capa de tejido epitelial apoyada sobre un tejido conectivo, nutre y alimenta al tejido epitelial.
- **Submucosa.** Es una capa de tejido conectivo y se encarga de mantener a la mucosa, por lo que tiene muchos vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.
- **Muscular.** Está compuesta por músculo liso (involuntario). Está dividida en dos capas, la interna que es circular y forma anillos y la externa que es longitudinal.
- **Adventicia.** Está formada por tejido conectivo y en ella están los grandes vasos sanguíneos y los nervios. En los lugares en los que está expuesta a la cavidad abdominal recibe el nombre de serosa.
- A la parte hueca del tubo digestivo se la denomina luz.

1.2. Intestino delgado.

El intestino delgado es el tubo que va desde el estómago hasta el intestino grueso, mide aproximadamente en humanos entre 6 y 8 metros y en ratones alrededor de 40 cm en ratones de unos 35 g. Estructural y funcionalmente se distinguen tres partes:

-
- Duodeno (proximal) es la primera porción del intestino delgado, tiene forma de C y mide aproximadamente 25 cm en humanos. En él se distinguen cuatro porciones, que son horizontal, descendente, horizontal y ascendente. El duodeno finaliza formando un ángulo que se denomina Treizt. El duodeno rodea la cabeza del páncreas, el conducto del páncreas con las vías biliares desemboca en la segunda porción del duodeno.
 - Yeyuno (medio) está formado por una serie de pliegues conocidos como asas intestinales y es difícil encontrar la zona en la que acaba empieza el íleon.
 - Íleon (terminal) es la última porción del intestino delgado, termina en el intestino grueso, en una válvula denominada ileocecal. Cerca de ella existe un divertículo llamado de Merkel, que en ocasiones se infecta y da lugar a una patología parecida a la de la apendicitis.

La superficie de absorción de la mucosa intestinal presenta gran número de pliegues llamados: válvulas conniventes, vellosidades intestinales y microvellosidades.

Las válvulas conniventes son unos repliegues de la mucosa de unos 8 mm de altura, que se extienden circularmente sobre toda la superficie interna del intestino delgado, en cuyo interior se encuentran vasos y nervios. Son muy pronunciados en duodeno y yeyuno. Para facilitar la absorción intestinal en su superficie se encuentran las vellosidades intestinales, las cuales, en humanos, miden aproximadamente un milímetro y tienen forma de dedo de guante (Figura I1). Estas vellosidades se encuentran también en el resto de la mucosa del intestino y le dan aspecto aterciopelado. En la superficie de las células que forman estas vellosidades existen unas especializaciones denominadas microvellosidades, su misión es aumentar la superficie de las células, facilitando así la absorción de los alimentos.



Figura I1. Mucosa del intestino delgado, con las vellosidades y microvellosidades (Dr. José Luís Bondi).

Los valles que hay entre las microvellosidades albergan las llamadas criptas (Figura I2). Estas células se denominan enterocitos y se renuevan a partir de los enteroblastos, que migran desde las bases de las criptas con un promedio de vida de alrededor de dos días. Se ha calculado que en humanos, cada célula epitelial contiene alrededor de mil microvellosidades.

El epitelio de las criptas está compuesto al menos de cuatro tipos celulares diferentes y son células secretoras y activas como las células de Paneth, que forman parte de la respuesta inmunológica, son caliciformes, indiferenciadas y endocrinas.

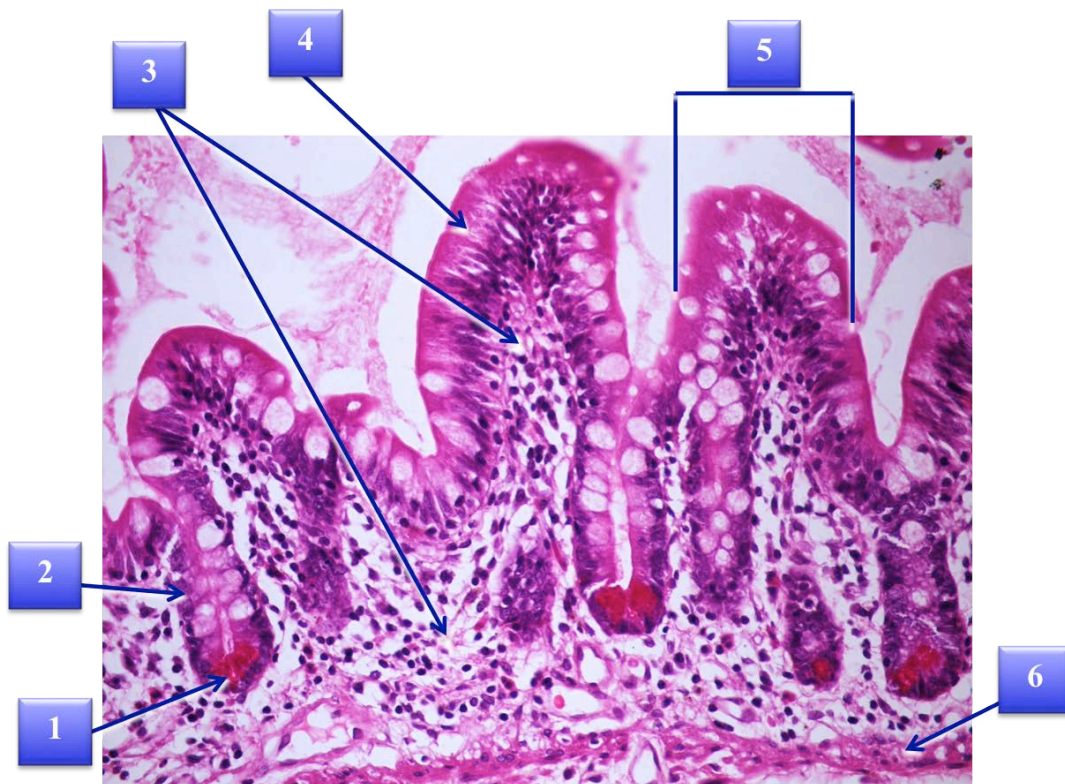


Figura I2. Detalle de vellosidades intestinales. 1.- Células de Paneth, 2.- Glándula intestinal o cripta de Lieberkühn, 3.- Lámina propia, 4.- Epitelio de revestimiento, 5.- Vellosidad intestinal, 6.- Muscular de la mucosa. (Dra. Isabel García Peláez).

1.3. Intestino grueso.

El intestino grueso es la región final del tubo digestivo y es el encargado de la absorción de agua y minerales y la formación de heces. Prácticamente toda la absorción que tiene lugar en el intestino grueso ocurre en su mitad proximal, llamado colon de absorción; la porción distal, cuya función principal es almacenar las materias fecales, recibe el nombre de colon de almacenamiento y finalmente hay una sección excretora que se corresponde a la porción final que conecta con el exterior.

Mide, en humanos, aproximadamente entre 1,5 y 1,8 metros. Se divide en ciego, colon y recto. El ciego tiene una forma de fondo de saco situado en la fosa ilíaca derecha. En la parte inferior y hacia adentro se encuentra un apéndice en forma de gusano denominado apéndice vermicular. La mucosa de la pared intestinal, se caracteriza por la falta de pliegues y vellosidades (Figura I3).

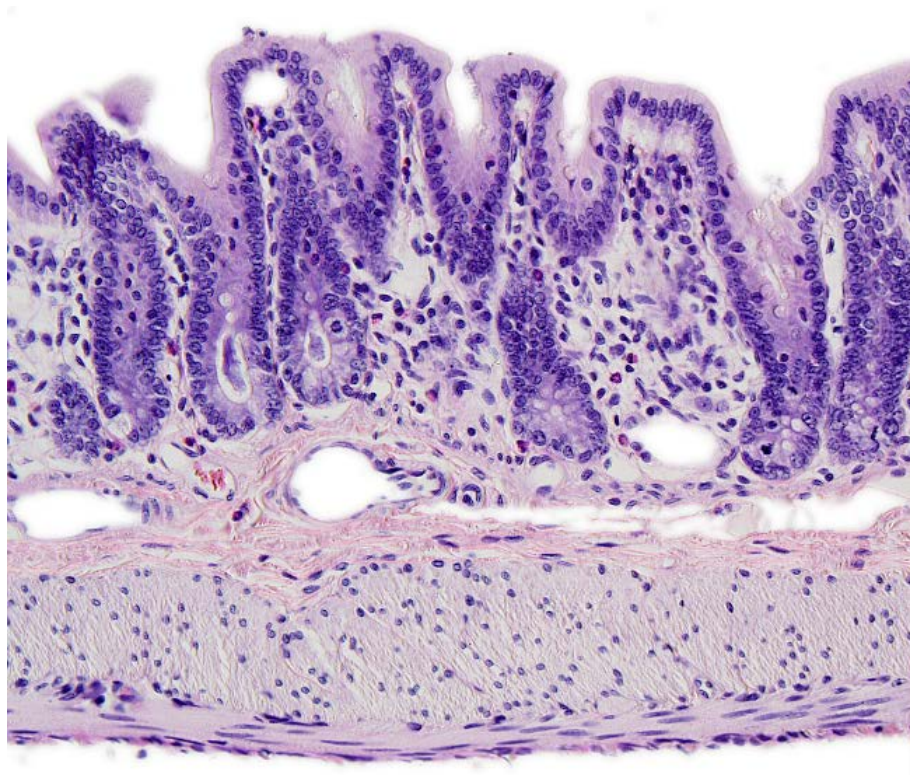


Figura I3. Epitelio del intestino grueso de rata. (Atlas de Histología Vegetal y animal. Dpto de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo).

El tránsito del contenido cólico es muy lento, desde el íleon a través de la válvula ileocecal se vierte el contenido en el ciego donde se pueden encontrar restos de varias comidas. El ciego se contrae por efecto de la distensión y de esta forma va desplazando parte del contenido almacenado al

colon ascendente. En el colon transverso y descendente ocurre lo mismo y de ahí pasa al colon sigmoide y recto donde el movimiento es aún más lento, de hecho se ha podido comprobar que en esta región se puede encontrar un 25% de los restos no digeridos de una comida tomada 72 horas antes.

El contenido ileal que se evacúa en el ciego es muy distinto del que se puede observar en las heces evacuadas debido a un proceso activo de absorción y secreción del colon, en el que participan los enterocitos intestinales, bacterias intestinales y enzimas del intestino delgado que están en el contenido ileal.

En el ciego comienza la digestión bacteriana de la celulosa, almidón y proteínas no digeridas, formándose ácidos orgánicos, anhídrido carbónico e hidrógeno que forman los gases intestinales. Se forma amoniaco procedente de la diseminación de los aminoácidos y transformación de la urea. Las sales biliares se transforman en ácidos biliares y la bilirrubina en urobilógeno, que da el color característico a las heces. También se absorben electrolitos y agua, desecándose así el material intestinal, que se mezcla con la secreción mucosa para lubricarlo. Prácticamente en la porción derecha del colon se consigue la composición final de las heces. Por último, tiene lugar la defecación que corresponde a la porción final del intestino grueso, y serán eliminados los materiales no absorbidos ni digeridos. Para realizar esta función hay una pequeña región del intestino grueso formada por dos regiones, una de ellas actúa como órgano de capacidad y es el recto y la otra es el esfínter anal que regula, finalmente, la salida de las heces.

1.4. Alteraciones de la pared intestinal que provocan modificaciones en la absorción.

La absorción es el proceso por el cual la sustancia que va a ser absorbido es incorporada a la primera célula del organismo para posteriormente incorporarse a la circulación sistémica.

Cualquier situación que altere la superficie de absorción del intestino delgado, como resecciones totales o parciales, puede provocar alteraciones en la absorción así como alteraciones funcionales del sistema digestivo, úlcera gástrica o duodenal, que pueden afectar al vaciado gástrico o al tránsito o incluso al pH.

Se entiende por malabsorción o síndrome de malabsorción a un trastorno de la digestión causado por la dificultad para asimilar, absorber o digerir los nutrientes en el intestino delgado. Suele dar lugar a diarreas, gases, distensión abdominal, pérdida de peso, nutrientes presentes en los alimentos, a lo largo del tracto gastrointestinal. Puede deberse a diferentes tipos de enfermedades y puede implicar a uno o varios nutrientes, dependiendo del nivel. Por lo general está asociada a dificultades para malnutrición, anemia, etc. A esto hay que añadir que cualquier daño en la mucosa intestinal (enteropatía) va a ser causa de una malabsorción.

Dentro de las enfermedades que provocan alteraciones en la mucosa encontramos las siguientes:

- Enfermedad celíaca. Provoca alteraciones histológicas en la mucosa, con atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas con un incremento del número de linfocitos intraepiteliales (Chand y Anastasios., 2006). La causa de esta enfermedad es una respuesta inmune inapropiada al gluten. Los signos y síntomas son los típicos del síndrome de malabsorción: diarrea, esteatorrea, pérdida de peso, dolor abdominal, etc.
- Enfermedad de Crohn. Es una enfermedad crónica de origen desconocido aunque es posible que tenga un componente autoinmune

de forma que el propio sistema inmunitario del individuo ataca el intestino produciendo inflamación. Suele ser el íleon la parte más frecuentemente afectada, o el tramo final del intestino delgado, aunque la enfermedad puede aparecer en cualquier lugar del tracto digestivo.

- Enteropatía autoinmune. Es una causa muy poco frecuente de malabsorción que suele asociarse a la presencia de anticuerpos anti-enterocitos circulantes (Russo y cols., 1999), predisposición a fenómenos autoinmunes y se da con más frecuencia en la edad pediátrica. La clínica y la histopatología de esta enfermedad son similares a la enfermedad celíaca, pero no se aprecian cambios cuando se aporta una dieta sin gluten.
- Gastroenteritis eosinofílica. Son un grupo heterogéneo de enfermedades inflamatorias primarias. Se caracterizan, a nivel histológico, por una importante infiltración de leucocitos eosinófilos que van a afectar distintas capas y tramos del tubo digestivo. Muchos aspectos de esta enfermedad son desconocidos y no hay pautas de tratamiento establecidas a nivel universal. Esta enfermedad se clasifica dependiendo de la profundidad de alcance de la infiltración de eosinófilos en: mucosa, muscular y serosa. En un 30 % de los casos se produce una malabsorción global en la forma mucosa en (Khan., 2005).
- Enteritis por radiación. La radiación causa daño intestinal agudo o crónico. En la forma aguda tiene lugar una depleción de las células de las criptas intestinales que son sustituidas por una densa infiltración inflamatoria con acortamiento de las vellosidades. En la forma crónica parece una vasculitis obstructiva progresiva y depósitos de colágeno que conlleva a una estenosis y malabsorción (Yeoh y cols., 1993).

-
- **Linfagiectasia.** Es una enteropatía en la que se produce una dilatación anormal del intestino cuya causa es una rara alteración congénita en el desarrollo de los vasos linfáticos del organismo (Rossi y cols., 1996). Esto provoca una pérdida de la absorción de proteínas, vitaminas liposolubles y otros nutrientes. A nivel histológico en esta enfermedad se observa que los vasos linfáticos de la lámina propia están dilatados y los villis hinchados y mermados (Aoyagi y cols., 1997).

1.5. Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs).

Las lectinas inactivadoras de ribosomas RIPs de “Ribosome-Inactivating Proteins” son proteínas de origen vegetal, aunque existen también RIPs de origen bacteriano y de algas. Las RIPs fijan azúcares sencillos y complejos y provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas por ribosomas en mamíferos, hongos, plantas y bacterias (Barbieri y cols., 1993; Barbieri y cols., 2006; Girbés y cols., 1996; Girbés y cols., 2003; Girbés y cols., 2004). Las RIPs se clasifican en dos categorías (Tabla I1): RIPs de tipo 1 y de tipo 2.

Las RIPs de tipo 1 están formadas por una sola cadena polipeptídica que es la que presenta la 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 que se denomina cadena A y una cadena con propiedades de lectina que se denomina cadena B.

Tabla II. Clasificación de las RIPs vegetales en función de su estructura molecular y toxicidad.

Tipo 1 (una cadena)	no tóxicas	ej. beetin, gelonin, tricosantin, petroglaucin, musarmins, etc.
Tipo 2 (dos cadenas)	poco tóxicas	ej. nigrina y ebulina
	muy tóxicas	ricina, abrina, modeccina, volkensina, viscumina
Tipo 2 (cuatro cadenas)	no tóxicas	RCA, APA, aglutinina de <i>M. charantia</i>
	algo tóxicas	VAA

RCA: *Ricinus communis* agglutinin; APA: *Abrus precatorius* agglutinin;

VAA: *Viscum album* agglutinin. (Tesis Doctoral en Farmacia, Girbés., 2008).

Las RIPs de tipo 2 pueden ser muy tóxicas como la ricina o no-tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones como ebulina y nigrina (Girbés y cols., 1993a; Girbés y cols., 1993b; Van Damme y cols., 2001; Girbes y cols., 2004).

1.5.1. Actividad enzimática.

A pesar de que la ricina se descubrió en 1888 por Stillmark (Olsnes, 2004; Lord y cols., 1994), no fue hasta 1987 cuando se elucidó el mecanismo molecular mediante el cual la ricina y otras RIPs ejercen su efecto sobre el ribosoma (Montanaro y cols., 1973).

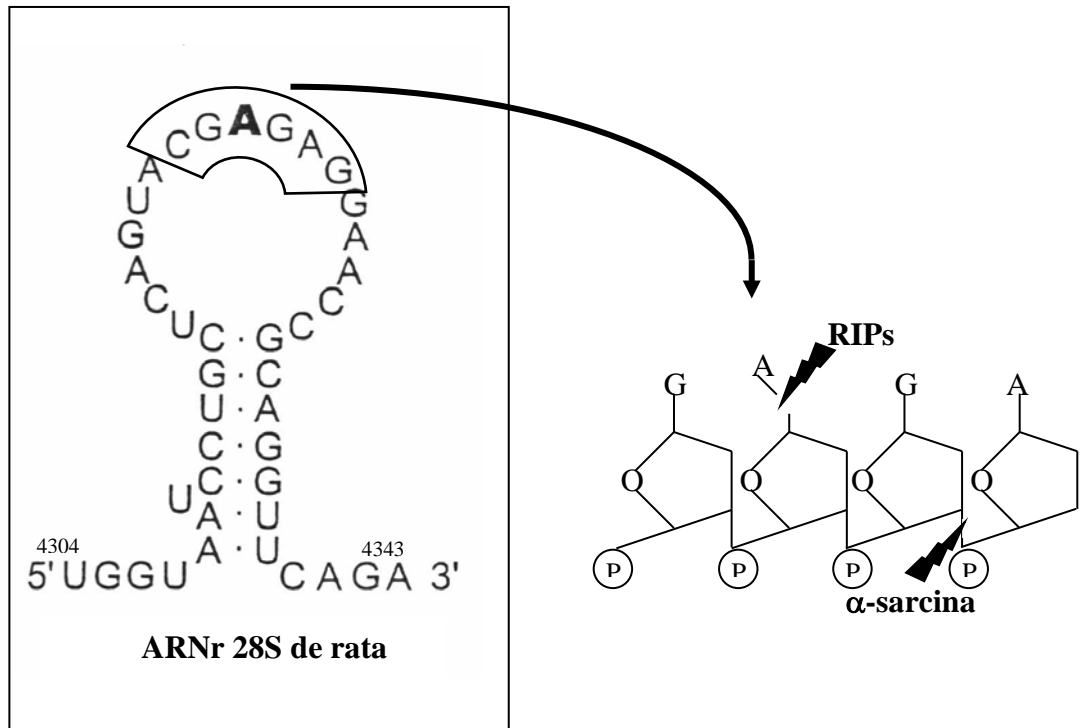


Figura I4. Estructura secundaria del ARNr 28S de rata en el cual la adenina (señalada en negrita) se elimina por acción de la RIP (Girbés y cols., 2000, Tesis Doctoral Girbés., 2008).

Las RIPs 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; Girbés y cols., 1993; Girbés y cols., 1996).

El mecanismo de acción se realiza mediante un proceso de depuración del ácido nucleico. En los casos bien estudiados, se trata de la eliminación de al menos una adenina (A_{4324} en el ARNr 28S de rata) localizada en el centro de un bucle altamente conservado a lo largo de la evolución (Figura I4).

1.5.2. Etapa afectada de la biosíntesis de proteínas.

La región del ARNr en la que las RIPs ejercen su efecto mínimo de monodepuración está implicada en la interacción del ribosoma con los

denominados factores de elongación (EF), el factor de elongación 2 (EF-2) en eucariotas (Girbés y cols., 1993a), o G (EF-G), en procariotas (Girbés y cols., 1993b).

Estos factores intervienen en la elongación de las cadenas polipeptídicas (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007; Youngman y Green, 2007; Wilson y Nierhaus, 2006; Spiegel y cols., 2007), que consta de tres etapas parciales:

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.

Se ha podido determinar que las RIPs pueden actuar sobre ácidos nucleicos no ribosómicos sobre oligonucleótidos (Nielsen y Boston, 2001). Debido a ello, las RIPs se conocen en la actualidad como N-glicosidasas (Barbieri y cols., 1997; Barbieri y cols., 2004). Una actividad nucleasa ejercida por las RIPs demostró ser un artefacto resultado de una deficiente purificación del enzima (Peumans y cols., 2001).

Otras actividades enzimáticas que se asocian a las proteínas inactivadoras de ribosomas son: 1) actividad quitinasa (Shih y cols., 1997); 2) actividad topoisomerasa sobre ADN (Huang y cols., 1992); 3) actividad inhibidora de la integrasa de VIH (Lee-Huang y cols., 1995; Stirpe y Battelli., 2006; Stirpe., 2013); 4) superóxido dismutasa (Li y cols., 1997,

Tesis Doctoral., Girbés 2008).

1.6. Lectinas de *Sambucus*.

1.6.1. Breve reseña histórica del saúco.

Diferentes estudios han descubierto evidencias de que 50.000 años aC, los seres humanos utilizaban las hojas de las plantas para dar sabor a las carnes. El análisis de los conjuntos arqueobotánicos recuperados en las excavaciones recientes en los Alpes del norte de Francia en "Le Chenet des Pierres" en Bozel (Savoie, Francia, 1.000 m sobre el nivel del mar) han permitido conocer las plantas que se utilizaban probablemente como alimento en un contexto de montaña durante el Neolítico Medio (4500-3500 aC) (Martin y cols., 2008). El estudio revela la presencia de semillas de saúco negro (*Sambucus nigra*), de saúco rojo (*Sambucus racemosa*) y yezgo (*Sambucus ebulus*) (Martin y cols., 2008; Rottoli y cols., 2009).

Hipócrates y Dioscórides describieron en sus tratados al saúco como una importante planta de uso medicinal. Los dacios, los galos y los romanos utilizaban sus remedios contra la hidropesía, la gota, las mordeduras de serpiente y como purgante.

En Europa está documentado el uso del saúco como planta medicinal desde muy antiguo, en el siglo XII se escribió "The Physicians of the Myddavai", tratado que recoge los conocimientos tradicionales sobre las curas y remedios que se preparaban a base de saúco en la zona de Gales desde del siglo VI.

En 1651 el doctor alemán Blockwich publicó "Anatomía Sambuca", tratado escrito en latín en donde se recoge una serie de hasta 70 enfermedades que pueden ser tratadas con remedios preparados a base de

saúco. Este tratado se tradujo posteriormente al inglés y publicado en Londres en 1655. En esta misma época el doctor Culpe en Inglaterra hacía referencia al saúco como “la medicina del tórax de la medicina popular”. Diferentes estudios han descubierto evidencias de que 50.000 años aC, los seres humanos utilizaban las hojas de las plantas para dar sabor a las carnes. El análisis de los conjuntos arqueobotánicos recuperados en las excavaciones recientes en los Alpes del norte de Francia en "Le Chenet des Pierres" en Bozel (Savoie, Francia, 1.000 m sobre el nivel del mar) han permitido conocer las plantas que se utilizaban probablemente como alimento en un contexto de montaña durante el Neolítico Medio (4500-3500 aC) (Martin y cols., 2008). El estudio revela la presencia de semillas de saúco negro (*Sambucus nigra*), de saúco rojo (*Sambucus racemosa*) y yezgo (*S. ebulus*) (Martin y cols., 2008; Rottoli y cols., 2009).

Hipócrates y Dioscórides describieron en sus tratados al saúco como una importante planta de uso medicinal. Los dacios y los romanos utilizaban sus remedios contra la hidropesía, la gota, las mordeduras de serpiente y como purgante (Tesis Doctoral., Girbés 2008).

En Europa está documentado el uso del saúco como planta medicinal desde muy antiguo, en el siglo XII se escribió “The Physicians of the Myddavai”, tratado que recoge los conocimientos tradicionales sobre las curas y remedios que se preparaban a base de saúco en la zona de Gales desde del siglo VI.

En 1651 el doctor alemán Blockwich publicó “Anatomía Sambuca”, tratado escrito en latín en donde se recoge una serie de hasta 70 enfermedades que pueden ser tratadas con remedios preparados a base de saúco. Este tratado será posteriormente traducido al inglés y publicado en Londres en 1655. En esta misma época el doctor Culpeper en Inglaterra

hacía referencia al saúco como “la medicina del tórax de la medicina popular”.

1.6.2. Características botánicas del saúco.

El saúco es una especie muy conocida que pertenece a la familia de las *Sambucaceae*. Esta familia 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. En algunos casos son plantas herbáceas. La mayoría de estas especies proliferan bien en zonas templadas y tropicales, aunque algunas necesitan climas más continentales y alturas relativamente grandes.

Aunque estas especies están ampliamente repartidas, hay algunas zonas tales como la Amazonia, Arabia, India y determinadas zonas del oeste de Australia y del Pacífico en las que no se han detectado.



Figura I5. *Sambucus nigra* (www.floraprotegida.es).

La especie más conocida es el saúco común o saúco negro, *S. nigra* L. (Font-Quer, P., 1988). Se trata de un arbusto leñoso de 3-5 m de altura y que

en algunos casos puede llegar a tener un porte de hasta 8 m (Figura I5) Su corteza es suberosa. Sus hojas, son caducas, pecioladas, opuestas, compuestas de 2-4 pares de foliolos peciolados, opuestos, lanceolados, puntiagudos, dentados y lisos. Su color es de un verde oscuro por el haz y verde más claro y veloso por el envés.

En cuanto a las flores, son blancas, pequeñas, pedunculadas, muy abundantes 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 saúco enano o *S. ebulus* L. es más pequeño, llega a 2 m de altura, posee rizoma reptante y florece en verano, a partir de Junio. 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.

El saúco contiene una colección de proteínas estructurales y funcionales, incluidas las enzimáticas, 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 (Girbés 2008).

1.6.3. Aplicaciones actuales más frecuentes del saúco y partes utilizadas.

Las aplicaciones actuales más frecuentes, según el vademécum de prescripción de plantas medicinales (Fitoterapia: Vademécum de Prescripción, 1994) del Colegio de Farmacéuticos de Vizcaya y la Asociación Española de Médicos Naturistas, están basadas en las acciones farmacológicas atribuidas a las distintas partes del saúco. Las más notables son las acciones diaforéticas, diuréticas, demulcentes, venotónicas, antirreumáticas y galactogénicas de las flores, y purgantes y antirreumáticas

de los frutos y de la corteza.

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.

1.6.4. Toxicidad del saúco.

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, 1988). 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* (Fitoterapia: Vademécum de Prescripción, 1994), debido a la presencia de la proteína extremadamente tóxica ricina (Olsness, 2004). Efectos gastrointestinales parecidos a los ocasionados por los frutos se producen por la ingestión de corteza o de brotes de hojas de saúco que poseen un carácter fuertemente purgante (Olsnes y Phil., 1982, Deeks y cols., 2002).

La decocción de los frutos, incluso los muy verdes, y de la corteza o los brotes de hojas, elimina la toxicidad (Font-Quer, 1988). 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, 1988; Fitoterapia: Vademécum de Prescripción, 1994), 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.

1.6.5. Nigrina.

Esta lectina antirribosómica se encuentra en diversas isoformas en función de la parte de la planta de la que se aísle. Fue la segunda lectina antirribosómica aislada del saúco común o saúco negro, *S. nigra* L. (Girbés y cols., 1993b). Posteriormente, Peumans se refirió a ella como SNAV al haber sido la quinta lectina que se aisló de *S. nigra* L. (Peumans y cols., 2001). Sin embargo, esta propuesta no prosperó entre los especialistas en este tipo de lectinas, habiéndose quedado el nombre de nigrina por analogía semántica con ricina (Griffiths., 2011). Nigrina inhibe la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas de mamíferos y no lo hace con los de plantas.

La primera nigrina que se aisló fue la nigrina de corteza (Girbés y cols., 1993b). Estructural y funcionalmente es similar a la ricina pero 1.500 veces menos tóxica para los ratones que la ricina.

En frutos se ha encontrado la isoforma nigrina f, que es algo más tóxica que la isoforma de corteza nigrina b (Citores y cols., 1996, Ferreras y cols., 2002). Esta lectina antirribosómica coexiste con la SNA IVf que parece ser una forma truncada de la nigrina f, como ya hemos comentado anteriormente (Kaur., 2011).

La corteza de *S. nigra* L. contiene también una proteína relacionada con la nigrina b denominada nigrina b básica, pero a diferencia de ella, ha perdido la capacidad de fijar azúcares, por lo que no se le considera como lectina (de Benito y cols., 1997). Esta proteína está en alta concentración (0,9 g/kg) y depende del estado estacional. Mientras que la actividad molecular inhibidora sobre el ribosoma es la mayor conocida en lectinas antirribosómicas ($IC_{50} = 0.3 \text{ pM}$), la ausencia de actividad lectina la convierte en completamente inocua desde el punto de vista de toxicidad para células animales en cultivo y ratones.

Otra lectina antirribosómica presente en la corteza de *S. nigra* es la SNA-I'. Se trata de una proteína tetramérica muy parecida estructural y funcionalmente a la SNA-I, que es capaz de formar octámeros por dimerización de la estructura tetramérica (Van Damme y cols., 1997).

La presencia de ambas SNA-I y SNA-I' parece ser estacional lo que llevado a sugerir que podrían estar relacionadas con el almacenamiento del nitrógeno por la planta durante el invierno (Nsimba-Lubaki y Peumans, 1996).

Los frutos verdes de *S. nigra* L. contienen nigrina f (isoforma de frutos) y SNA IVf (lectina monomérica) antes conocida como SNA III (Citores y cols., 1996a). SNA IVf parece ser la proteína mayoritaria en frutos y es una forma truncada de la nigrina f (Van Damme y cols., 1997; Citores y cols., 1996a). La maduración conlleva un cambio dramático en el perfil de lectinas. Así, mientras que casi desaparece la nigrina f, la concentración de SNA IVf se mantiene aproximadamente constante (Citores y cols., 1996^a, Hao y cols., 2001, He y cols., 2002).

La toxicidad de nigrina f es algo mayor que la nigrina b, la isoforma de corteza (Citores y cols., 1996b), a pesar de ello el mecanismo

antirribosómico y el carácter de lectina de D-galactosa son los mismos (Citores y cols., 1996a).

Los estudios preliminares que estamos realizando sobre los efectos fisiológicos en ratones de nigrina y una RIP relacionada como la ebulina, indican que ambas lectinas desarrollan efectos tóxicos muy parecidos a los producidos por la ingestión de frutos verdes, corteza y hojas, por lo que deducimos que podrían ser la causa final de la toxicidad, como se ha comentado ya, debido a su carácter enzimático (Cabrero, P., 2012, Gayoso y cols., 2005; Tejero y cols., 2012; Tejero y cols., 2015; Jiménez y cols., 2015).

1.7. Minerales.

En los seres vivos, además de los elementos químicos que constituyen la materia orgánica (carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno), existen otros que forman parte de su composición, aunque en pequeñas cantidades, y a los que se denomina minerales. A pesar de que estos elementos se necesitan en cantidades muy pequeñas, son esenciales para el organismo por lo que tienen que ser aportados por la dieta.

Los elementos principales (o minerales principales) son los que están presentes en mayor proporción en los tejidos (0,005% del peso total), por lo que tienen que ser aportados en mayores cantidades por la dieta (más de 100 mg/día). Se los conoce también con el nombre de macrominerales. Se incluyen en este grupo: azufre, calcio, cloro, fósforo, magnesio, potasio y sodio.

Los elementos traza (o minerales traza) son igualmente necesarios para los organismos pero en cantidades mucho menores. Los requerimientos de ingesta diaria para el hombre son menores de 100 mg/día. Se los conoce

también como microminerales. Se incluyen en este grupo: zinc, cobalto, cobre, cromo, flúor, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y yodo.

Existen también otros elementos traza que han sido encontrados en los tejidos vivos en cantidades mínimas, pero que se desconoce su papel fisiológico y sus fuentes no están identificadas. Actualmente no se sabe si son esenciales para el hombre, aunque han sido utilizados terapéuticamente. Estos elementos traza son: arsénico, boro, cadmio, níquel, silicio, titanio y vanadio.

Las fuentes alimentarias de los minerales esenciales para el hombre son muchas y variadas. Tanto los alimentos de origen vegetal como animal aportan minerales, incluso el agua de bebida de determinadas zonas es rica en algunos minerales como yodo, flúor, cobre y otros.

Al igual que ocurre con las vitaminas, ningún alimento posee todos los minerales en cantidades tales que permita que la ingestión de uno o pocos alimentos satisfaga las necesidades del individuo. De ahí la insistencia en que las dietas sean mixtas y equilibradas para un correcto aporte de los distintos minerales.

1.7.1. Calcio. Absorción, metabolismo y excreción.

El calcio es el mineral más abundante del cuerpo humano. Generalmente se relaciona con la formación de huesos y dientes pero interviene en muchos procesos que tienen lugar en el organismo.

Del calcio total que podemos encontrar en el organismo, un 99% está localizado en los huesos y dientes, y el 1% restante se encuentra en la sangre, líquidos extracelulares y otros tejidos del organismo. En los huesos se encuentra en forma de una sal compleja de fosfato cálcico llamada

hidroxiapatía que proporciona resistencia a los huesos y a los dientes. Este es un depósito de calcio estable y poco intercambiable.

Por otro lado, hay una pequeña parte de calcio esquelético (0,4%-1%) que se encuentra en forma de pequeños cristales que están poco fijados al hueso. Esta pequeña proporción de calcio es muy importante porque es la que puede movilizarse para depositarse en el hueso o para reabsorberse a partir de él (resorción). Lo que indica que el hueso es un tejido vivo en el que constantemente tienen lugar procesos de síntesis y destrucción. Esta pequeña cantidad de calcio recibe el nombre de calcio intercambiable debido a esta capacidad de movilización que tiene.

En el organismo se deben mantener concentraciones constantes de calcio puesto que debe haber un equilibrio entre las concentraciones del hueso y de la sangre. La concentración de calcio en el organismo está regulada por la acción de varias hormonas como son la 1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D activa), la paratohormona y calcitonina, que regulan los niveles de calcio sérico. Además están los estrógenos (en mujeres) y la testosterona (hombres) que intervienen regulando el calcio que forma parte de los huesos.

Las dietas pobres en Ca, el déficit de vitamina D y la falta de respuesta intestinal a la absorción (exceso de glucocorticoides o de hormona tiroidea, síndromes de mala absorción, etc.) son las causas más frecuentes del déficit de absorción del calcio. Podemos encontrar varias enfermedades debidas al déficit de calcio, aunque la de mayor prevalencia es la osteoporosis.

La osteoporosis supone una pérdida progresiva de la matriz ósea. Puede deberse a varios motivos, como son déficit en la alimentación, edad avanzada o disminución de estrógenos.

El calcio que no forma parte del esqueleto interviene en procesos tales como, la transmisión de los impulsos nerviosos, la excitabilidad neuromuscular, la contracción muscular, la coagulación sanguínea, el mantenimiento y función de las membranas celulares, la activación de reacciones enzimáticas y la secreción hormonal.

El calcio desempeña funciones muy importantes: forma parte de los huesos y dientes, interviene en la contracción muscular, es necesario para la transmisión del impulso nervioso, participa en la coagulación sanguínea, mantiene la permeabilidad de las membranas celulares, activa determinados sistemas enzimáticos, actúa en la secreción hormonal y la apoptosis.

- **Absorción.**

El calcio de los alimentos se suele encontrar complejo, fundamentalmente con proteínas, y es liberado por enzimas proteolíticas digestivas. De esta forma es soluble, está ionizado, y es absorbido. Sin embargo, algunos complejos de bajo peso molecular, como oxalato cálcico y carbonato cálcico se pueden absorber como tales.

Generalmente en humanos, con una dieta mixta se ingieren entre 0,5 y 1 g de calcio y de esta cantidad se absorbe entre el 25 y el 70 %, dependiendo de factores dietéticos y hormonales. En el periodo de crecimiento la absorción es mayor y puede llegar al 75%, mientras que en la edad adulta disminuye al 30-60%.

El que se absorba una mayor o menor proporción dependerá de varios factores como son: el nivel de Ca ingerido, el nivel del metabolito activo 1,25-dihidroxicolecalciferol, los niveles de estrógeno, el pH digestivo y el estado general de Ca en el organismo. En etapas en las que aumente las necesidades de calcio (crecimiento, embarazo, lactancia), la absorción de

éste es más eficiente. En la edad infantil la absorción de calcio puede llegar a ser del 75% y en ancianos ni siquiera alcanza el 30% y la presencia en la dieta de determinados compuestos que pueden facilitar o dificultar la absorción del calcio de la dieta (lactosa, vitamina D y proteínas). Algunos de los factores que dificultan su absorción serían el ácido oxálico y el ácido fítico.

El calcio de la dieta se absorbe a nivel intestinal, siendo un 90% a nivel del intestino delgado y el resto en el intestino grueso, por dos mecanismos, a través de la célula (vía transcelular) o entre las células (vía paracelular). También se produce una absorción transcelular principalmente en duodeno, regulado por la vitamina D que estimula el paso del calcio mediante acciones bien conocidas y una absorción paracelular, de forma pasiva y por difusión. Este mecanismo tiene importancia a lo largo de todo el intestino, es no saturable y efectivo en la zona del yeyuno e íleon por la longitud de este segmento (Bronner; 2003). A través de este mecanismo se absorbe un escaso porcentaje de este mineral cuando la ingesta es pequeña, pero cuando la ingesta de calcio es normal o alta se satura el mecanismo transcelular y es mucho mayor por este mecanismo (Bronner y Pansu, 1999 Hoenderop y cols., 2005).

- **Metabolismo.**

El calcio de la dieta que es absorbido entra a formar parte del calcio circulante extracelular que es aproximadamente de 1 g, y es captado por todos los tejidos del organismo, fundamentalmente por los huesos. Este calcio extracelular está en equilibrio con el calcio óseo de tipo intercambiable. Por otra parte con el calcio menos intercambiable se instaura el proceso de remodelado óseo.

Son varias las hormonas responsables de la regulación homeostática del calcio plasmático que actúan a nivel del calcio intercambiable. Si la concentración del calcio plasmático disminuye se libera paratohormona cuyo principal efecto, entre otros, consiste en la activación de la vitamina D para producir la forma activa y hormona D (1,25[OH]-2-

colecalfiferol), que incrementa la absorción intestinal de calcio. Otros efectos son la activación de las zonas de la reabsorción ósea, aumentando la actividad osteoclástica, además del aumento de la reabsorción tubular renal de calcio.

Cuando ocurre una hipercalcemia la solución del organismo para ella es diferente en adultos y en niños. En los adultos se produce una disminución en el umbral renal para el calcio, de esta forma se facilita la excreción del exceso. Mientras que en los niños se soluciona a través de la calcitonina que reduce o detiene la actividad osteoclástica disminuyendo la reabsorción ósea.

Otras hormonas implicadas en los movimientos del calcio del hueso son la insulina, hormona de crecimiento, estrógenos y glucocorticoides.

- **Excreción.**

Las pérdidas de calcio tienen lugar fundamentalmente a través de orinas y heces, aunque también hay excreción a través del sudor, piel descamada, pelos y uñas.

La excreción fecal es la resultante de la parte de calcio proveniente de la dieta que no es absorbido, más el calcio endógeno que procede de células de la mucosa descamadas y de las secreciones, salival, gástrica, intestinal y biliar.

En cuanto a la excreción urinaria, la cantidad de calcio filtrado a través del glomérulo renal está determinada por la tasa de filtración glomerular y la concentración plasmática de calcio ultrafiltrable. Del calcio filtrado más del 98% se absorbe a nivel tubular renal, siendo de dos terceras partes en el túbulo proximal y el tercio que resta en el asa de Henle, túbulo contorneado distal y túbulos colectores.

El calcio no reabsorbido se excreta en la orina, estando esta cantidad entre los 100 y 200 mg/día.

1.7.2. Magnesio. Absorción, metabolismo y excreción.

Al igual que el calcio es un mineral muy importante para el organismo. Es necesario para que se produzca la contracción muscular y para que tenga lugar la excitabilidad nerviosa. Si hay déficit de magnesio se producen espasmos y contracturas musculares. También interviene en la síntesis y activación de proteínas y hormonas y en la formación y mantenimiento de los cartílagos.

La distribución del magnesio en el organismo es la siguiente: un 60-65% está en el hueso, un 26 % en el músculo y el resto se encuentra en tejidos blandos y fluidos corporales. El magnesio en el plasma puede encontrarse libre (55%), formando complejos (13%) o unido a proteínas (32%). El magnesio forma parte de la molécula de clorofila por lo tanto los alimentos vegetales van a ser especialmente ricos en este mineral. Lo podemos encontrar en cereales integrales, legumbres (garbanzos, lentejas, alubias, soja, guisantes), frutos secos (almendras, nueces), frutas (papaya, plátano, kiwi) verduras y hortalizas (espinaca, col). Normalmente el organismo no presenta carencias de este mineral, pero suelen darse

deficiencias en casos de alcoholismo crónico, cirrosis hepática, vómitos severos o abuso de diuréticos.

La disminución de la cantidad de magnesio en el organismo se manifiesta con la aparición de calambres, debilidad muscular, náuseas, convulsiones, arritmias, hipertensión e incluso infarto de miocardio.

El magnesio desempeña diferentes funciones en el organismo (Brink y Beynen., 1992): estabiliza la molécula de ATP en las reacciones enzimáticas que requieren energía, actúa como cofactor de sistemas enzimáticos que participan en el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas y en la síntesis de ácidos grasos y proteínas entre otros, interviene en el metabolismo de otros minerales como calcio y fósforo, es fundamental para el buen funcionamiento del sistema nervioso y participa en la contracción y relajación muscular, junto al calcio, habiendo una acción competitiva entre ambos (Quamme y De Rouffignac., 2000).

- **Absorción.**

Ha habido mucha controversia acerca de la absorción del magnesio en el intestino. Pero hay estudios que confirman el mecanismo de absorción y el lugar del intestino en el que tiene lugar la absorción.

El magnesio se absorbe a nivel intestinal, fundamentalmente a nivel del yeyuno proximal e íleon. Un porcentaje de este Mg absorbido se vuelve a secretar en el intestino y de esta cantidad aproximadamente un 50% se reabsorbe en el colon y recto. La eficacia de la absorción varía en función del contenido corporal de magnesio, la cantidad de magnesio en la dieta y la composición de la dieta en su conjunto. Se llega a absorber entre un 35% y un 40% del magnesio ingerido en la dieta. La absorción del Mg en el íleon

ocurre a través de 2 procesos: 1) el primero es un proceso activo y saturable, que constituye la ruta principal del transporte de Mg, y se realiza a través del canal de Mg TRPM6; 2) el segundo mecanismo es pasivo y no saturable, se realiza a través de la ruta paracelular y tiene mayor importancia cuando se ingiere mayor cantidad de magnesio.

Existen una serie de factores alimentarios que disminuyen su absorción, como son la presencia de calcio en la dieta, de fósforo, oxalato, fibra alimentaria y algunos ácidos grasos con los que forma complejos insolubles.

- **Metabolismo.**

Una vez absorbido, el magnesio es transportado a los distintos tejidos y es en el tejido óseo donde se encuentra en su mayor proporción. Entre un 20-30% de los cristales en la superficie de los huesos, son intercambiables y estarán afectados por los niveles séricos, mientras que el resto no es intercambiable. El magnesio muscular es el más fácilmente intercambiable.

- **Excreción.**

La vía de excreción más importante es la digestiva, que varía según el tipo de ingesta. Existe una excreción endógena a través del intestino, bilis, jugo intestinal y pancreático.

1.7.3. Cobre. Absorción, metabolismo y excreción.

El cobre es un metal de transición ampliamente distribuido en la naturaleza. Se trata de un mineral esencial y se descubrió esto al comprobar

que se requería, junto con el hierro, para prevenir la anemia en ratas. Además se ha puesto de manifiesto tras numerosos estudios, que participa en un gran número de funciones catalíticas.

Su principal función es la de formar parte de determinadas enzimas (oxigenasas). Entre las enzimas dependientes del cobre podemos destacar: Citocromo C oxidasa, Tirosinasa, Lisiloxidasa, Ferroxidasa I (ceruloplasmina) y Ferroxidasa II. La ceruloplasmina también tiene capacidad antioxidante sobre los radicales libres, al igual que la Dopamina-beta-hidroxilasa, que interviene en la biosíntesis de las catecolaminas. Además el cobre también forma parte de otro grupo de enzimas que participan en la mineralización durante el desarrollo del sistema nervioso, y en la síntesis de cerebrósidos.

Igual que ocurre con el zinc se encuentra en altas concentraciones en la porción germinal de las semillas de los cereales integrales, y es por esto que las personas que siguen regímenes vegetarianos no suelen mostrar síntomas de deficiencia. Otras fuentes son los frutos secos, leguminosas, hígado, crustáceos y moluscos. La carne, leche, derivados lácteos, cereales refinados y productos de panadería tienen contenidos bajos en cobre. Los principales síntomas de deficiencia de cobre son: anemia microcítica hipocrómica, neutropenia, desmineralización esquelética, degeneración del tejido vascular con aneurismas arteriales, despigmentación del cabello y piel, degeneración cerebral y cerebelar, hipotonía muscular e hipotermia.

La deficiencia de cobre normalmente es originada por la ingesta en dietas pobres de dicho catión o por la administración de nutrición parenteral con la ausencia del metal.

- **Absorción.**

La absorción del cobre tiene lugar en el intestino delgado, fundamentalmente en el duodeno y entra en las células por difusión facilitada. Esta absorción no varía apreciablemente con la edad y el sexo. La absorción aparente oscila entre el 50% y el 75%.

La captación de cobre por las células intestinales se produce en dos etapas: (1) paso del borde en cepillo y (2) transferencia a la sangre a través de la membrana basolateral. El paso a las células mucosales parece producirse mediante difusión simple, mientras que la transferencia serosal se produce gracias a un transportador saturable dependiente de energía del tipo P-ATPasa. La concentración de transportadores en el lado basolateral puede variar con la situación fisiológica y con el estatus corporal en cobre.

La entrada en las células mucosales no garantiza su transferencia a la sangre ya que cantidades variables del metal pueden ser retiradas por proteínas de estas células, fundamentalmente metalotioneínas.

Los transportadores de la membrana basolateral para otros iones metálicos (fundamentalmente zinc) podrían también participar en la absorción de cobre, lo que explicaría los antagonismos entre estos iones en situaciones límite de ingesta. Así, la absorción de cobre disminuye cuando el zinc o el mineral tóxico cadmio se ingieren en grandes cantidades.

La absorción aparente y la excreción biliar de cobre se encuentran reducidas con altas ingestas de hierro. Algunos aminoácidos y el citrato incrementan la absorción de cobre, mientras que la fibra, fitato y ácido ascórbico, en determinadas condiciones, pueden disminuirla. El cobre cuproso es menos absorbible que el cobre cúprico y el ascorbato puede reducir Cu^{2+} a Cu^{+} .

- **Metabolismo.**

Una vez absorbido el cobre se une principalmente a la albúmina y en menor proporción a otra proteína, la transcuprina, que lo conducen al hígado y riñón, pasando a formar parte de la ceruloplasmina y de otras proteínas enzimáticas. La ceruloplasmina posteriormente es drenada a la sangre donde, además de ejercer su acción enzimática, constituye el mayor sistema de transporte del metal, de tal modo que del 92% al 94% del cobre circulante se encuentra formando parte de la misma.

Parece ser que la interleucina 1 estimula la síntesis de apoceruloplasmina y que la ceruloplasmina actuaría de donante de cobre a las distintas células del organismo. De hecho en algunos órganos se ha puesto de manifiesto la existencia de sitios de unión específicos para la ceruloplasmina.

Existen una serie de factores fisiológicos, hormonales, etc. que pueden afectar a la síntesis y liberación de ceruloplasmina. Así, la administración crónica de esteroides reduce los niveles séricos de cobre. La gestación y el uso de anticonceptivos orales a base de estrógenos incrementan en dos o tres veces los niveles de ceruloplasmina. El tabaco y las drogas anticonvulsionantes también la incrementan.

- **Excreción.**

El cobre se excreta fundamentalmente por el tracto gastrointestinal, siendo la bilis la secreción que contribuye en mayor proporción. El cobre precedente de la bilis se absorbe poco, siendo poco importante la circulación

enterohepática. Sin embargo el cobre de las secreciones salivales, gástricas e intestinales es reabsorbido en mayor proporción. Sólo una pequeña porción del ion es excretado por vía urinaria (menos del 3%).

1.7.4. Zinc. Absorción, metabolismo y excreción.

Es un elemento esencial en la salud humana por el amplio papel que desempeña en el organismo. Se encuentra distribuido por todas las células y tejidos del organismo aunque en algunos tejidos su presencia es mayor, como son piel, cabello, uñas, retina, órganos genitales masculinos y próstata.

En la sangre, la mayor parte del zinc se encuentra en los eritrocitos y en los leucocitos porque está presente en dos enzimas presentes en los mismos, la fosfatasa alcalina (leucocitos) y la anhidrasa carbónica (eritrocitos).

En zinc que encontramos en algunos tejidos blandos como son músculo, cerebro, pulmón y corazón, es relativamente estable y no depende de la cantidad ingerida en la dieta. En cambio, en hueso, testículos, pelo y sangre sí que se ve reflejada la ingesta en la dieta.

Las necesidades de zinc en el organismo varían en función de la edad y del estado fisiológico del individuo (crecimiento, adolescencia, embarazo, lactancia) y además se ve afectado por ciertos componentes de la dieta (proteínas, fitatos, hierro y ácido fólico entre otros).

Podemos destacar las siguientes funciones del zinc en el organismo: forma parte de enzimas implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, interviene en la síntesis y degradación de ácidos nucleicos (ADN y ARN), participa en la estabilización de las proteínas de

las membranas celulares, colabora en las funciones de defensa del organismo (sistema inmunitario), favorece la cicatrización de los tejidos, está implicado en los mecanismos sensoriales del gusto y el olfato y es esencial para el crecimiento y maduración sexual.

Los alimentos difieren mucho en su contenido en zinc. En general los alimentos animales son más ricos en zinc que los vegetales. Así las carnes, pescado, aves, leche y sus derivados van a proporcionar gran parte del zinc de la dieta. Las legumbres, cereales y frutos secos lo aportan en menor proporción aunque sean buenas fuentes de este mineral. Se debe destacar el contenido de este mineral en las ostras y el hígado.

Su deficiencia está asociada con la debilidad del sistema inmunitario y disminución de la fertilidad masculina e incluso hay investigaciones que le atribuyen un papel protector en la enfermedad de Alzheimer.

- **Absorción.**

El zinc que está presente en los alimentos se encuentra asociado a proteínas y ácidos nucleicos, por esto es debido una digestión previa para que se libere y pueda ser absorbido.

Se absorbe a nivel del intestino delgado aunque hay discrepancias sobre el segmento concreto donde tiene lugar la absorción, aunque se ha observado que es en el yeyuno el lugar de mayor velocidad en el transporte del zinc.

Se absorbe entre un 20% y un 50% del zinc ingerido en la dieta aunque dependerá del tipo de dieta y su absorción va disminuyendo con la

edad. Cuanto mayor son los requerimientos del organismo mayor será la absorción y en general su absorción va a depender del estado del mineral en el organismo, de su contenido en la dieta y de su solubilidad.

Su absorción es similar a la del Ca, y tiene lugar mediante dos mecanismos. Por un lado, un mecanismo saturable, mediado por transportadores, que funciona más eficientemente cuando las concentraciones en la luz intestinal son bajas, y por un mecanismo de difusión pasiva que depende de las concentraciones del metal. Como el Zn se encuentra, normalmente, unido a aminoácidos y pequeños péptidos, los iones tienen que ser liberados en las proximidades de las vellosidades para que puedan ser absorbidos. En el interior de la célula el Zn se une a las metaloproteínas y otras proteínas del citoplasma.

Encontramos varios factores alimentarios que afectan a la absorción intestinal de zinc al influir en su mayor o menor solubilidad.

Los factores que aumentan la absorción de zinc son la calidad de la proteína dietética y la presencia de azúcares como glucosa y lactosa. Los factores que disminuyen la absorción de zinc son las altas concentraciones de fibra, fitatos, hierro y ácido fólico

- **Metabolismo.**

El zinc liberado desde las células intestinales en los capilares mesentéricos es transportado por la sangre hasta el hígado. La albúmina es la proteína plasmática transportadora más importante en la sangre portal, y la concentración plasmática de ésta puede afectar a la cantidad transferida desde los enterocitos. Los diferentes tejidos captan cantidades variables del

cación desde la sangre. El hígado es el que capta una mayor cantidad, seguido del hueso, piel, riñón y timo.

- **Excreción.**

A diferencia de lo que sucede con otros iones, el zinc no se almacena en el organismo y su exceso será eliminado. La excreción se realiza por vía fecal a través de la secreción pancreática, biliar, mucosal y células de la mucosa descamadas. Las pérdidas superficiales por descamación, crecimiento del cabello o sudor también contribuyen a la excreción del zinc. La excreción urinaria es pequeña en condiciones normales.

1.8. Estrés oxidativo.

En los últimos años han aumentado considerablemente los estudios relacionados con los radicales libres y más concretamente con las especies reactivas de oxígeno, puesto que se ha comprobado que estos derivados tóxicos del oxígeno son los causantes de diversas y frecuentes patologías. Aunque podemos encontrar que los radicales libres se pueden formar a partir de otros elementos, no sólo del oxígeno, como son el N, S, P, etc.

Los radicales libres no son perjudiciales por sí mismos, y de hecho se producen en nuestro organismo de manera constante y como consecuencia de todas las reacciones biológicas en las que interviene el oxígeno, como son aquellas por las cuales se obtiene energía por transformación de sustratos, las que comprenden el metabolismo de los nutrientes contenidos en los alimentos, los procesos de respiración celular o durante el ejercicio físico, así como en la eliminación de virus y bacterias.

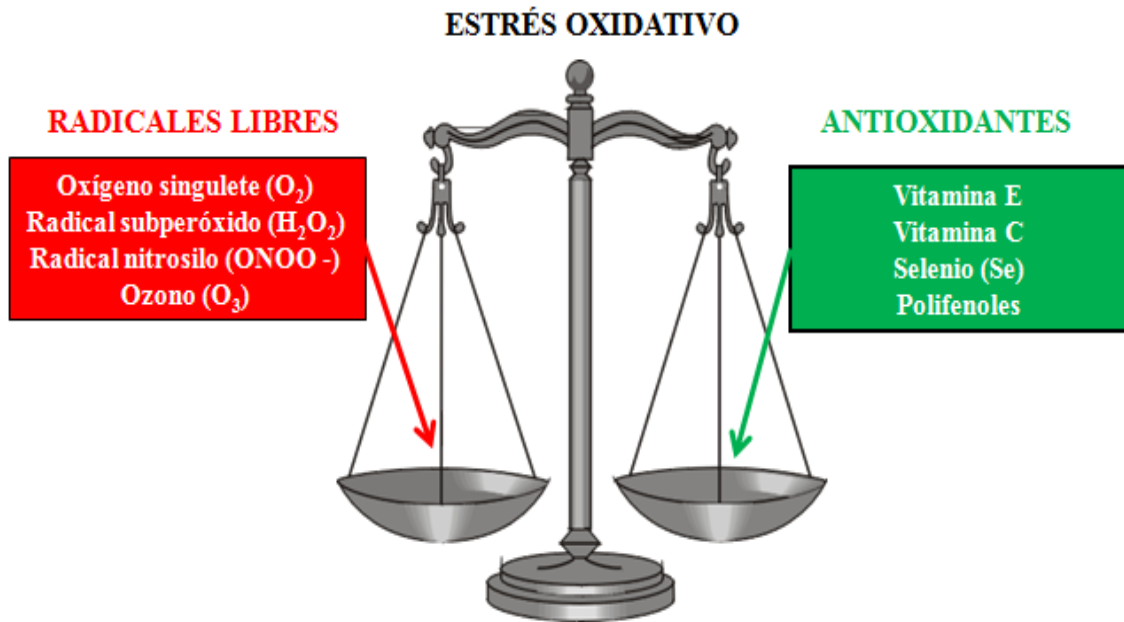


Figura I6. Balance entre radicales libres y antioxidantes.

En el organismo existen sistemas de protección para desactivar o neutralizar estos radicales libres “mecanismos antioxidantes” que podrán regular aquellos que sean producidos por nuestro propio organismo (Figura I6). Esta regulación se mantiene en equilibrio hasta que una excesiva generación de radicales libres no pueda ser neutralizada durante un tiempo. Esto llevará al estado conocido como estrés oxidativo, que es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. El exceso de prooxidantes se suele producir por la acción de contaminantes externos, incluidos alimentos, es en este caso cuando se pueden producir graves daños debido a su gran reactividad.

La defensa antioxidante natural puede reforzarse desde el exterior al ingerir ciertos compuestos con propiedades antioxidantes como vitaminas C y E, β -carotenos y flavonoides. Consecuentemente, las estrategias terapéuticas basadas en la eliminación o neutralización de estos radicales libres han

mejorado sustancialmente el tratamiento de muchas enfermedades. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos moleculares que tienen lugar en la producción de los radicales libres del oxígeno y en la propagación del daño tisular a través de ellos, es esencial para el tratamiento eficaz de determinadas patologías.

1.9. Importancia del oxígeno.

Todos los organismos vivos, salvo ciertos procariotas pertenecientes al grupo de las Arqueobacterias, necesitan del oxígeno para mantener sus funciones vitales. Sin embargo, en determinadas condiciones, el oxígeno, por reacciones de naturaleza química, por acción enzimática, por efecto de las radiaciones ionizantes, etc., se puede convertir en uno de los elementos más reactivos que existe. Esto ocurre cuando el oxígeno sufre una reducción incompleta en sus reacciones en el interior del organismo, formando así unos intermediarios conocidos como Radicales Libres de Oxígeno (RLO), que pueden llegar a alterar las macromoléculas biológicas al reaccionar con ellas. Por lo tanto, se puede llegar a producir un daño celular más o menos importante debido a que los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del organismo van a ser susceptibles de sufrir profundas modificaciones estructurales y funcionales debidas al ataque de los RLO. Un gran número de evidencias, principalmente epidemiológicas, demuestran que numerosas patologías, incluidas aquellas que afectan al sistema cardiovascular, tienen su base en el desequilibrio oxidativo generado por una producción incontrolada de RLO.

La reactividad del O_2 reside en su capacidad de aceptar electrones, lo que quiere decir que el O_2 es un potente oxidante. En los átomos y moléculas, los electrones ocupan regiones subatómicas denominadas orbitales. Cada orbital contiene como máximo 2 electrones que giran en direcciones opuestas,

uno lo hace según el sentido de las agujas del reloj y el otro en sentido contrario. Puede darse el caso de que un orbital esté ocupado por un solo electrón, denominado entonces electrón desapareado y las especies atómicas o moleculares conteniendo electrones desapareados se denominan radicales libres. El mismo O_2 podría considerarse un radical libre, ya que posee dos electrones desapareados en orbitales diferentes rotando en la misma dirección, es decir, con el mismo spin; es el estado denominado triplete. Por lo tanto, para oxidar otro átomo sólo podría aceptar electrones de éste con spines opuestos. La ocupación de los orbitales vacantes que tienen números impares de electrones producirá una serie de especies intermedias, los RLO, que se caracterizan por poseer una alta reactividad, dada su tendencia a ocupar el sitio vacante robando electrones a otros átomos, lo que es termodinámicamente favorable.

Tanto el O_2 como las especies reactivas del mismo, presentan una doble cara que nos muestra su lado positivo en la necesidad absoluta del O_2 para el desarrollo de la vida, y su lado negativo en la toxicidad y generación de RLO, responsables del desarrollo de numerosas patologías.

La vida biológica media de estos radicales es muy corta, pero su gran reactividad provoca un grave e importante daño en las células del organismo.

1.10. Origen y tipos de radicales libres.

En los sistemas biológicos los RLO pueden originarse intracelularmente, como resultado del propio metabolismo celular, o bien por interacción de determinados agentes pro-oxidantes de origen medioambiental con componentes intracelulares.

- **Intracelulares.**

A nivel intracelular, los RLO se generarán lógicamente en aquellos sistemas que tengan que gestionar directamente el O₂ y que comprenden principalmente la cadena respiratoria mitocondrial, el sistema del citocromo P450 microsomal y determinadas enzimas en las que el O₂ interviene como sustrato¹³. Si estos sistemas no trabajan adecuadamente producirán situaciones de desequilibrio oxidativo que alterarán el funcionamiento y homeostasis celular, afectando con el tiempo al resto del tejido celular y favoreciendo el desarrollo de determinadas patologías. Se pueden generar por: transporte de electrones mitocondriales, reacciones del complejo citocromo P450 en el retículo endoplásmico (metabolismo de xenobióticos), metabolismo de ácidos grasos en los peroxisomas, NADPH oxidasa de membrana (especialmente en células inflamatorias), subproductos de reacciones enzimáticas (xantina oxidasa) y por células fagocíticas.

- **Extracelulares.**

Entre los agentes prooxidantes de origen medio ambiental se pueden citar: humo de cigarrillos, luz solar, oxidación por drogas (CCl₄), radiaciones ionizantes, shock térmico y sustancias cíclicas de naturaleza redox que provocan la formación de radicales libres.

1.10.1. Tipos de radicales libres.

Básicamente se pueden distinguir dos tipos:

- **Radicales libres inorgánicos.**

Se generan mediante la reducción univalente (electrón a electrón) del átomo de O₂, ocupando los orbitales vacantes. De ellos el radical hidroxilo (OH•) es el RLO más reactivo y muy probablemente el máximo responsable del daño celular observado en situaciones de desequilibrio o estrés oxidativo. Otro radical importante es el óxido nítrico, que juega un papel importante en determinadas patologías en el sistema cardiovascular y el sistema nervioso. Los RLO más importantes serán el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo.

- **Radicales libres orgánicos.**

Los principales átomos de las biomoléculas (C, N, O y S) pueden presentar electrones desapareados y dar lugar a diferentes radicales libres, denominados radicales orgánicos. Este grupo de radicales se genera por la reacción de un radical libre con una molécula biológica. El resultado de la oxidación de uno o varios constituyentes de una biomolécula puede afectar de forma diversa la función de la misma. Por ejemplo, la oxidación de un aminoácido del centro catalítico de una proteína puede producir la inactivación de ésta, mientras que la oxidación del mismo aminoácido en una región no funcional de la misma proteína, puede no afectar o hacerlo mínimamente, a su actividad. Además, el tipo de molécula afectada y su localización intracelular repercutirán de forma diferente en la función celular en situaciones de desequilibrio oxidativo. Por ejemplo, las alteraciones oxidativas a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear afectarán principalmente a los procesos de expresión de genes, mientras que alteraciones oxidativas a nivel de los lípidos de membrana, tendrán consecuencias directas en la homeostasis celular.

Los radicales libres secundarios son altamente reactivos. Su poder citotóxico reside en la propiedad que tienen de generar más radicales secundarios al reaccionar con otros átomos de la misma molécula o de moléculas adyacentes, con lo cual poseen un gran poder para propagar alteraciones oxidativas dentro de la célula. El ejemplo típico en este caso es la cascada de peroxidación lipídica en las membranas celulares en determinadas situaciones de desequilibrio oxidativo.

Los radicales orgánicos no se generan sólo por mecanismos de transferencia electrónica, otros mecanismos, como la sustitución nucleofílica o la abstracción de un átomo de hidrógeno, pueden intervenir en la formación de los mismos. En conclusión, aunque los radicales orgánicos son menos reactivos que los inorgánicos, pueden muy fácilmente iniciar cascadas de peroxidación (amplificación de alteraciones oxidativas), pero además pueden difundir intracelularmente y extender las alteraciones oxidativas a otro lugar dentro de la célula (propagación de alteraciones oxidativas). Por lo tanto, su participación en la patología del desequilibrio oxidativo es muy importante.

1.11. Acción de los RLO sobre las macromoléculas biológicas.

Cuando se produce el estrés oxidativo, los RLO van a ser capaces de oxidar y producir alteraciones en las macromoléculas biológicas cercanas a los lugares de generación de éstos. El resultado será, en primer lugar una alteración en la función biológica de la macromolécula afectada y en segundo lugar la producción de nuevos radicales orgánicos que propagarán el daño en la célula y en el resto del tejido. El resultado es una reacción en cadena de los RLO, efecto de cascada-amplificación, que explicaría, al menos en parte, las

alteraciones observadas en patologías relacionadas con el desequilibrio oxidativo.

Las macromoléculas biológicas, tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, serán las más sensibles a los efectos de estos RLO (Aoyama y cols., 2015). Los daños por RLO que pueden sufrir estas moléculas son:

- **Proteínas.**

Son modificadas de diferente manera por los RLO (Dahl y cols., 2015). Una de las alteraciones más importantes que pueden producir es la de enzimas como la catalasa o la superóxidodismutasa, que intervienen en el mecanismo antioxidante del interior de la célula, lo que conllevaría a una deficiencia en el sistema antioxidante del propio organismo, por alteraciones en estas enzimas.

También pueden producir una disminución de la actividad de la Calcio-ATPasa en la membrana plasmática, lo que va a producir una alteración en la homeostasis del calcio. Esto va a suponer la alteración en procesos en los que está implicado el calcio, como la contracción muscular, sistemas de transporte, etc., que dañarán gravemente las células.

Además de estas podrán provocar muchas más alteraciones puesto que los RLO pueden atacar los enlaces peptídicos, metaloproteínas (afectando a la hemoglobina), aminoácidos concretos, etc. Provocando así múltiples alteraciones en el organismo.

- **Lípidos.**

Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo pueden reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos y de otros componentes

lipídicos de las membranas celulares para formar hidroperóxidos que pueden alterar la estructura y función de las membranas (Phaniendra y cols., 2014). Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares son muy vulnerables a los ataques oxidativos de los RLO, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno.

La peroxidación de los lípidos, y sobre todo de los lípidos insaturados, representa la mayor forma de alteración oxidativa de estas moléculas en condiciones de desequilibrio oxidativo. Los lípidos susceptibles de sufrir alteraciones de tipo oxidativo corresponderán principalmente a los lípidos ingeridos por la dieta y a los lípidos de membrana. La peroxidación de los primeros conlleva la incorporación de los lípidos alterados en diferentes estructuras celulares. La peroxidación de los lípidos de membrana llevará consigo alteraciones a nivel de la homeostasis y estructura celular: pérdida de la fluidez de membrana, pérdida de iones intracelulares, alteraciones en proteínas de membrana, etc.

Una importante característica de la peroxidación lipídica es su naturaleza de reacción en cadena, de tal forma que cuando un lípido se encuentra alterado, éste puede promover la peroxidación de los lípidos adyacentes. Los peróxidos lipídicos son productos estables, capaces de generar radicales inorgánicos y radicales orgánicos, además de sustancias tóxicas, principalmente aldehídos, derivadas de la ruptura oxidativa de las largas cadenas lipídicas. Los aldehídos pasan fácilmente a la circulación y es por lo que éstos son importantes marcadores para el diagnóstico de enfermedades en las que se produce una alta tasa de peroxidación lipídica. Productos típicos de naturaleza aldehídica son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal. Estos son muy estables y pueden difundir fácilmente a través de las estructuras membranosas extendiendo el daño al resto de los tejidos. El malondialdehído, es por tanto un producto final de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles

enlaces, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana, alterando aún más sus propiedades.

- **Ácidos nucleicos.**

También pueden ser atacados por los radicales libres (Slimen y cols., 2014). Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el radical hidroxilo, con consecuencias similares a los de los agentes carcinógenos.

- **Carbohidratos.**

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas (Phaniendra y cols., 2014; Slimen y cols., 2014; Vlassopoulos y cols., 2014). Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas. Así mismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas (despolimerización de ácido hialurónico).

1.12. Mecanismo de protección celular contra las sustancias oxidantes.

Las células de los mamíferos han desarrollado sistemas de protección para minimizar el daño resultante de las sustancias oxidantes (Kemmerly y Kaunitz, 2014). Existen, al menos, cuatro mecanismos que contribuyen a

aminorar los efectos perjudiciales de las sustancias oxidantes en la célula. Tres enzimáticos (Figura I7) y un cuarto no enzimático.

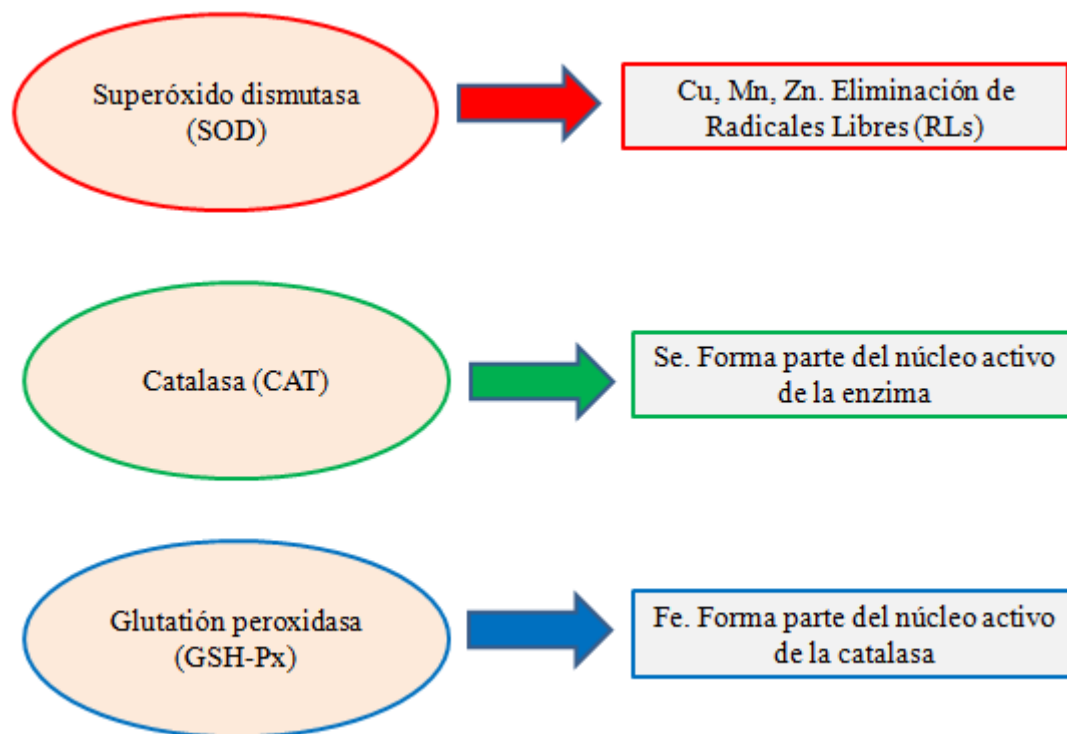


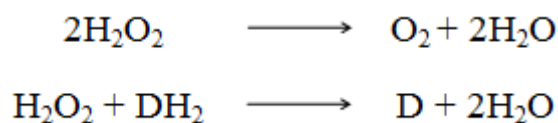
Figura I7. Mecanismos endógenos fundamentales de eliminación de los radicales libres en la célula (Kemmerly y Kaunitz (2014)).

1.12.1. Defensas enzimáticas.

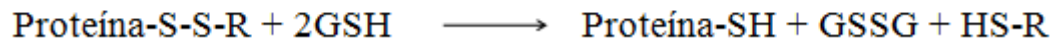
Reacción de la superóxido-dismutasa (solo en aerobios):



Reacción de la catalasa (peroxidasas):



Reacción de la glutatión-peroxidasa. Es el principal sistema de protección endógeno. Tiene tres funciones:



El GSSG formado se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutatión-reductasa:



Las tres enzimas antes mencionadas se localizan en distintos sitios intracelulares y parecen desempeñar funciones complementarias entre sí. La catalasa se encuentra fundamentalmente en los peroxisomas. La glutatión-peroxidasa en mitocondrias y citosol, pero no en peroxisomas. La superoxidodismutasa en el citosol, aunque existe una segunda forma que también aparece en las mitocondrias.

1.12.2. Enzimas antioxidantes.

Las tres enzimas antes mencionadas se localizan en distintos sitios intracelulares y parecen desempeñar funciones complementarias entre sí (Bułdak y cols., 2014). La catalasa se encuentra fundamentalmente en los peroxisomas. La glutatión-peroxidasa en mitocondrias y citosol, pero no en peroxisomas. La superoxidodismutasa en el citosol, aunque existe una segunda forma que también aparece en las mitocondrias.

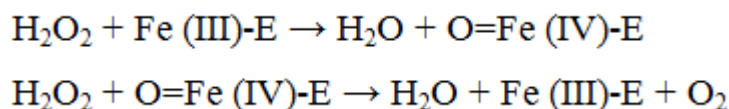
- **Catalasa**

La catalasa es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y está ampliamente distribuida en el organismo humano aunque su actividad varía dependiendo de los tejidos. La catalasa es una enzima que pertenece al grupo de las oxido-reductasas. La catalasa es una enzima antioxidante presente en las células aeróbicas de mamíferos y no mamíferos.

Esta enzima contiene cuatro grupos de ferrohemo proteínas por molécula, por tanto es una metaloproteína tetramérica, tiene una masa molecular que va de 210-280 KDa. Consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1,1 % y 0,09 % respectivamente de la masa molecular total de la enzima (Hajdu y cols., 1977). La actividad de la catalasa varía mucho en función del tejido, siendo mayor en el hígado y riñón y menor en el tejido conectivo y los epitelios y prácticamente nula en el tejido nervioso (Siu y cols., 2013). En las células eucariotas la catalasa se encuentra en los peroxisomas y mitocondrias, excepto en los eritrocitos que se encuentra en el citosol (Chance y Willians., 1955), del citoplasma plasmático. La catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, utilizando como cofactor al grupo hemo y al manganeso.

El peróxido de hidrógeno procede del metabolismo celular de los organismos vivos y, entre otras, tiene función protectora frente a microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero debe transformarse con rapidez por su elevada toxicidad.

El mecanismo completo de la reacción química de la catalasa tiene lugar en dos etapas:

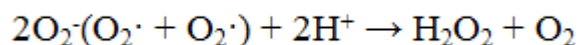


El grupo Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima, que junto con el manganeso actúan como cofactores.

El peróxido de hidrógeno se ha originado en las reacciones metabólicas de las células eucariotas y su acumulación causa alteraciones en el DNA, proteínas y lípidos, provocando mutagénesis y muerte celular. Por lo tanto, la eliminación del H₂O₂ de las células por la catalasa protege a las células del estrés oxidativo y previene de esta forma enfermedades relacionadas con éste.

- **Superóxido Dismutasa.**

La enzima superóxido dismutasa (SOD), antiguamente hemocupreínas, catalizan la dismutación del anión superóxido (O^{2•-}) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, esto la convierte en una de las enzimas antioxidantes más importantes para las células expuestas al oxígeno. Esta enzima fue aislada por primera vez en 1969, se aisló de los eritrocitos y se comprobó que catalizaba la siguiente reacción:



En humanos existen tres formas de superoxidodismutasa. La SOD1 se encuentra en el citoplasma, la SOD2 en las mitocondrias y la SOD3 en el líquido extracelular. La primera es un dímero y la 2 y 3 son tetrámeros, además la 1 y 3 contienen cobre y zinc (Cu-Zn-SOD), mientras que la SOD2 contiene manganeso (Mn-SOD) en su centro activo.

El ión superóxido es una de las principales especies reactivas de oxígeno en la célula y la SOD tiene un papel fundamental como antioxidante. La importancia fisiológica de la SOD se pone de manifiesto en las severas patologías que se evidencian en ratones genéticamente modificados para que carezcan de esta enzima. Los ratones sin SOD2 mueren a los pocos días de nacer por estrés oxidativo masivo (Li y cols., 1995). Los ratones sin SOD1 desarrollan una gran variedad de patologías, incluyendo hepatocarcinoma (Elchuri y cols., 2005), una acelerada pérdida de masa muscular relacionada con la edad una temprana incidencia de cataratas y una esperanza de vida reducida. Los ratones carentes de SOD3 no muestran deficiencias obvias y tienen una esperanza de vida normal (Sentman y cols., 2006)

- **Glutation peroxidasa.**

La GPx fue encontrada en el eritrocito bovino por Millis en 1957, *a posteriori* se encontró en el eritrocito humano, pulmón e hígado de rata, en el músculo, piel, etc. Lo que demuestra que es una enzima distribuida por prácticamente todos los tejidos (Pawłowicz y cols., 1991; Vertechy y cols., 1993).

La enzima glutacion peroxidasa (GPX) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutacion reducido (GSH). Esta enzima usa como cofactor el selenio. La glutacion peroxidasa tiene como principal función proteger al organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos formados de forma endógena. En los vertebrados se conocen al menos cuatro formas de GPXseleno dependientes: una forma citosólica GPX1, una forma gastrointestinal GPX-GI, una forma secretada en el plasma GPX-P y una

forma epididimial secretada GPX-EP. Adicionalmente a estas formas caracterizadas, la secuencia de una proteína de función desconocida está evolucionariamente relacionada con estas GPX's.

La GPx es una enzima tetramérica, compuesta por 4 subunidades idénticas entre sí y cada una contiene un átomo de selenio unido covalentemente a una molécula de cisteína. Las secuencias de aminoácidos entre los distintos tipos de GPx son diferentes, además la GPx-p es una proteína glicosilada y posee puentes disulfuros intramoleculares. La GPx-c se localiza en la mitocondria y el citosol de la célula hepática, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune (Behne y cols., 1990; Pascual y cols., 1992).

En el centro activo de la enzima se encuentra un átomo de Se unido covalentemente a un residuo de cisteína con actividad durante la catálisis. Además se describe en el centro activo un grupo tiol muy cercano al Se que proviene de un residuo de cisteína. En las diferentes GPx se conserva casi intacta la estructura del centro catalítico, lo que refuerza la hipótesis de que el mecanismo de acción para las 3 formas es el mismo.

La formación del complejo enzima sustrato se produce debido a que en el sitio activo tienen lugar una serie de transformaciones como resultado de las cuales se forma un puente metálico cíclico. La GPx y la glutatión reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas.

Además, algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN) y la interleukina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPx (Lam y cols., 1993). La alteración de la actividad de la GPx provoca un aumento de los niveles de H₂O₂ y de lipoperóxidos, lo que puede ser fatal para la célula y aún más para el organismo, razón por la cual, esta alteración se encuentra implicada en un sinnúmero de enfermedades y procesos fisiológicos como el cáncer.

1.13. Peroxidación lipídica y Malondialdehído (MDA).

Los radicales libres son inactivados por los complejos sistemas antioxidantes, pero cuando el equilibrio oxidación/antioxidación es descompensado, estas partículas reactivas pueden actuar sobre estructuras macromoleculares generando alteraciones de diferente severidad como la peroxidación lipídica (Mylonas y Kouretas., 1999, Santanam y cols., 1998), tanto de fosfolípidos de las membranas celulares como de las lipoproteínas plasmáticas y la degeneración del DNA.

El daño más frecuente es la peroxidación lipídica, hecho que da origen a transformaciones profundas de la membrana celular que pueden conducir hasta su destrucción, dando lugar a una serie de productos de descomposición como el malondialdehído. El MDA es un aldehído (Figura I10) que se genera por la ruptura de las largas cadenas de lípidos en la peroxidación lipídica y al pasar rápidamente a la circulación se emplea como indicador directo del daño celular y de la peroxidación lipídica (Draper y cols., 1993).

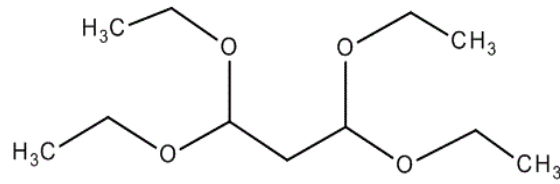


Figura I10. Malondialdehido (MDA). Estructura química.

La cuantificación sérica del MDA resulta una medida bastante real del proceso de oxidación, especialmente de la peroxidación lipídica. El oxígeno utilizado en las reacciones metabólicas se puede transformar en radicales libres de oxígeno, y éstos pueden atacar a los ácidos grasos poliinsaturados y a las lipoproteínas de la membrana plasmática celular, transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando malondialdehido. De esta forma se puede entender que la concentración sérica de malondialdehido es directamente proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados, y por lo tanto un buen indicador de la peroxidación lipídica.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivos.

En base a los antecedentes presentados se propusieron los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto en la ingesta, el peso y la longitud del intestino en ratones Swiss tras la administración intravenosa de dosis subletales de nigrina b.
2. Determinación de la acumulación de calcio, magnesio, zinc y cobre en ratones Swiss tratados con nigrina b, mediante espectrofotometría de absorción atómica.
3. Evaluar la evolución del estrés oxidativo en distintos órganos analizando las actividades enzimáticas de CAT, SOD y GSH-Px por espectrofotometría.
4. Determinación de la peroxidación lipídica mediante el análisis del malondialdehído (MDA) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
5. Análisis histológico de los diferentes corte de órganos de los ratones Swiss tratados con nigrina b.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL DE LABORATORIO.

3.1.1. Equipos.

Autoclave de esterilización Stericlav-S 110 Litros.

Agitador de tubos: Raypa.

Agitador magnético ACS-160: J.Jimeno S.A.

Balancín: Labnet.

Balanza de precisión: KERN ABS.

Balanza: KERN 572.

Balanza (Mettler H10W)

Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6).

Baño termostatzado con agitación.

Baño Ultrasons H. Selecta.

Bomba de vacío. Ref. Büchi Vac V-500.

Célula con agitación (concentrador): Amicon.

Centrifuga: Digiten-R ORTO ALRESA.

Columnas cromatográficas. GE Healthcare.

Columna cromatográfica Waters Spherisorb® 5 µm ODS2 4,6X250 mm.

Concentrador de 50 y 10 ml: Amicon.

Congelador -24°C: Fagor.

Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (Cromatógrafo líquido Water 2695 con detector de fotodiodo UV-visible y fluorescencia).

Cubetas electroforéticas mini-VE Amersham Biosciences.

Disgregador MICCRA D-9 /RT.

Equipo de agua Elix-Millipore.

Escáner CanonScan Lide 200 acoplado a un ordenador SAMSUNG NC10.

Espectrofotómetro de Absorción Atómica (GBC Scientific Equipment PTY

LTD modelo GBC932AA).

Espectrofotómetro: PYE UNICAM SP6-400 UV spectrophotometer.

Espectrofotómetro: HELIOS α Thermo.

Estufa: P.SELECTA 150 litros.

Equipo pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON.

Jaulas metabólicas.

Mufla.

Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit.

Pipeteador automático: IsolabSonicador: P-Selecta.

3.1.2. Material fungible.

Botellas de vidrio de diversos volúmenes, desde 5 ml hasta 5 litros.

Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro 104-QS Hellma 10mm.

Cubetas de plástico de espectrofotometría de 4,5ml.

Cubreobjetos de 12mm Ø.

Espátulas.

Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Homogeneizador de vidrio.

Imanes agitadores.

Jeringas de insulina ref: U-100 Insulina (1 ml) 24Gx1/2"-0.33x12.

Jeringuillas de plástico.

Matraces aforados.

Matraces erlenmeyers de diferentes volúmenes.

Membranas 450 47 mm 0,45 μ m de Pall.

Membrana Immobilon P de polivinilfluoruro (PVDF) 0,45 μ m.

Membranas de filtración MF Millipore 0,45 μm .
Microtubos de plástico de 1,5 y 2 ml.
Papel de filtro convencional (Afora).
Papel de filtro Whatman N°3.
Parafilm M.
Pinzas y tijeras de acero inoxidable.
Pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml.
Placas Petri cuadradas.
Probetas de vidrio y de plástico de diferentes volúmenes.
Puntas de pipeta automática.
Puntas especiales de pipetas para cargar geles de poliacrilamida.
Tubos Falcon de 15 y 50 ml.
Tubo de silicona de diferentes diámetros.
Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

3.1.3. Reactivos químicos.

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo quedan incluidos en la Tabla M1.

Tabla M1. Reactivos utilizados.

Reactivos	Marca
Acetato de amonio	Sigma
Acetona	Merck
Acetonitrilo HPLC-isocrático 254 nm grade	Scharlab
Ácido acético	Baker

Ácido acético glacial	Merck
Ácido clorhídrico	Merck
Ácido ortofosfórico	Scharlab
Ácido tiobarbitúrico	Sigma
Ácido tricloroacético	Merck
Acrilamida/bisacrilamida 37,5.1	Ameresco
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	Roche
Amonio acetato	Sigma
Amonio persulfato	Sigma
Amonio sulfato	Fluka
Azul de Evans	Sigma
Butilhidroxitolueno	Sigma
Catalasa Kit	Sigma
Carbonato sódico	Merck
Cloruro de cobre II	Sigma
Cloruro de lantano	Merck
Coomassie brilliant blue G-250	Panreac
Di-potasio hidrogeno fosfato	Merck
Dodecil sulfato sódico	Fluka
Etanol	Merck
Fosfato de potasio monobásico	Sigma
Fosfato de sodio monobásico	Sigma
Glutaraldehido	Sigma
Glicerol	Merck
Glicina para electroforesis	Sigma
Glutation peroxidasa Kit	Sigma
Hidróxido de sodio	Carlo Erba
Lactosa	Panreac

Metanol	Merck
N,N, dimetilformamida	Sigma
N, N, N', N', tetrametiletieno	Sigma
N-acetilcisteína	Sigma
Potasio sodio tartrato	Panreac
Potasio cloruro	Sigma
Potasio hidróxido	Panreac
Potasio hidróxido 85 %	Panreac
Reactivo de Folin-Ciocalteau	Fluka
Sepharose 6B	GE
Sulfato de Cobre	Merck
Superdex 75	GE
Sigma marker (marcadores de masa molecular)	Sigma
SOD Kit	Sigma
Sodio carbonato	Panreac
Sodio cloruro	Panreac
Sodio hidróxido	Panreac
Sodio acetato	Sigma
Sodio carbonato	Sigma
Sodio dihidrógeno	Merck
Sodio hidrógeno carbonato	Panreac
Sodio hidróxido	Baker
Sodio fosfato dibásico	Sigma
Tartrato de Sodio Potasio	Merck
TEMED	Sigma
Tris	Roche
Xileno I, II, III	Sigma

Todas las soluciones se prepararon con agua tipo Milli Q (Millipore), y se esterilizaron, cuando fue necesario, en autoclave (Stericlav-S 110 litros) a 120° C y a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

3.1.4. Materiales biológicos.

3.1.4.1. Vegetales.

Se recogieron ramas de *Sambucus nigra* L. durante las estaciones de primavera-verano en las instalaciones deportivas de Fuente La Mora, pertenecientes a la Universidad de Valladolid, situada en la Carretera de Renedo Km. 3,200, Valladolid, y en Mansilla de las Mulas (León), para la posterior obtención de nigrina b.

3.1.4.2. Animales de experimentación.

Para el estudio de la absorción aparente de calcio, magnesio, zinc y cobre se utilizaron 15 ratones Swiss, con un peso inicial entre 30-50 g. En el estudio para analizar la variación de los marcadores de estrés oxidativo, actividad enzimática de CAT, SOD, GSH-Px y niveles de MDA utilizamos 32 ratones Swiss, 8 para cada uno de los ensayos de pesos comprendidos entre 30-50g.

Todos los animales utilizados fueron machos adultos, procedentes del animalario de la Universidad de Valladolid. Se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura estándar (ciclos de 12 horas alternos de luz y oscuridad, y 22 °C aproximadamente). Se les proporcionó una dieta de mantenimiento estándar (Panlab) y agua corriente como bebida, ambas a voluntad.

Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas, fueron cuidados y tratados de acuerdo con los criterios establecidos en la “Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio”, realizada por la *National Academy of Sciences* y publicada por el *National Institute of Health* (National Research Council, 1985).

3.1.4.3. Sangre.

Para determinar la actividad lectina de la nigrina b se realizaron experimentos de hemoaglutinación, para lo cual utilizamos viales de sangre (O+) del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, gracias a la doctora Rosario del Villar.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Obtención de Nigrina b a partir de corteza de *Sambucus nigra* L.

- **Proceso de extracción**

Las ramas utilizadas fueron de 2,5 cm de diámetro como máximo. La corteza obtenida se dejó secar en condiciones ambientales, con aireación continua y volteos periódicos. La corteza se trituró en un molinillo convencional a bajas revoluciones para no incrementar la temperatura del material. El procedimiento de extracción consiste la preparación de un extracto salino tamponado a partir del polvo de corteza desecada, su clarificación por centrifugación en frío y la cromatografía de afinidad a D-galactosa mediante la columna de Separosa 6B tratada con ácido clorhídrico para incrementar el número de restos de D-galactosa libres acuoso tamponado y finalmente la cromatografía de exclusión molecular en

DSuperdex 75, tal y como se ha detallado previamente (Girbés y cols., 1993; Jiménez y cols., 2013).

El aspecto de la corteza utilizada es el de la figura M1. En concreto, la nigrina b se acumula en la corteza verde inmediatamente subyacente a la corteza suberosa gris externa.



Figura M1. Obtención de la corteza de *S. nigra* L. (gentileza del Prof. Tomas Girbés).

3.2.2. Caracterización de la nigrina b.

- **Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr**

Para el cálculo de la concentración de proteínas de las fracciones proteicas recogidas durante la fase de extracción y purificación, utilizamos la fórmula propuesta por Kalb y Bernlohr (1977) que está basada en mediciones realizadas por espectrofotometría. La formula tiene la siguiente expresión:

$$[\text{Proteína}] = 183 (A_{230} - A_{320}) - 75,8 (A_{260} - A_{320}) = X \mu\text{g/ml}$$

A_{230} , A_{320} y A_{260} son las medidas de la absorbancias obtenidas de la muestra a las respectivas longitudes de onda 230, 320 y 260 nm.

- **Determinación de la actividad aglutinante de eritrocitos.**

Se colocan concentraciones crecientes de proteína en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc). Se añaden 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), se mezclan y se dejan reposar a 20 minutos a 25°C. En los pocillos con concentraciones de proteína superiores a la mínima concentración necesaria para provocar la aglutinación de los eritrocitos, se aprecia una suspensión de aspecto rosado mientras que en el resto de pocillos los eritrocitos precipitarán formando un botón de coloración rojo intenso.

- **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Uno de los métodos más comúnmente empleado de electroforesis de proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico. Esta técnica es conocida como SDS-PAGE de Laemmli (1970). En nuestro caso se utilizó un sistema de Amersham Biosciences.

Para la realización de la electroforesis, en primer lugar, se limpian los cristales necesarios para la formación del gel con acetona, se montan los

cristales y los separadores en su soporte específico, posteriormente se prepara el gel que está formado por dos fases con distinta concentración de poliacrilamida.

El gel separador se forma con una mezcla de un 14,6% (p/v) para geles del 15% de acrilamida y un 0,4% (p/v) de bisacrilamida, Tris-HCl 375mM (pH=8,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,1% (p/v) y TEMED 0,07% (v/v). El gel de apilamiento o de “stacking” está formado por 3,9% (p/v) de acrilamida, 0,1% (p/v) bisacrilamida, Tris-HCl 125mM (pH=6,8), SDS 0,1% (p/v), persulfato amónico 0,08% (p/v) y TEMED 0,08% (v/v). Las muestras se incuban durante 5 minutos a 100° C en Tris-HCl 62,5mM (pH=6,8), SDS al 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) y 0,025% (p/v) de azul de bromofenol.

Para aplicar la muestra al gel, se le suele añadir un agente que provoque una restricción de la difusión, que haga la muestra más densa, en este caso, glicerol. Además, para seguir el avance de la separación, se añade un colorante, como azul de bromofenol, que sirve como medio de contraste para el seguimiento (“tracking dye”).

Posteriormente, se llenan las cámaras superior e inferior de la cubeta con tampón de electroforesis de modo que entre en contacto con ambos extremos del gel. Después de depositar las muestras en los pocillos, la electroforesis se lleva a cabo a 20° C con una intensidad de corriente de 25mA por gel en tampón Tris-HCl 25mM (pH=8,3), glicina 192mM y SDS 0,1% (p/v). El proceso finaliza cuando el azul de bromofenol sale del gel por la parte inferior (Girbés, 2013)

3.2.3. Diseño experimental.

El desarrollo del trabajo experimental se llevó a cabo en dos estudios diferenciados (Tabla M1 y Tabla M2).

El primer estudio (Estudio I) se realizó con el fin de observar la recuperación del peso de los animales así como de la función de absorción intestinal de minerales, tras la inyección de una dosis subletal de nigrina b. Se evaluó la absorción aparente de calcio, magnesio, zinc y cobre antes de la administración de nigrina b y en las tres fases de recuperación en los que se dividió el ensayo. Para determinar la absorción de estos minerales se realizó un balance mineral en los animales sometidos al estudio, determinando el contenido de calcio, magnesio, zinc y cobre en heces y orina mediante espectrofotometría de absorción Atómica. La cantidad de minerales ingeridos se calculó teniendo en cuenta los gramos de pienso ingerido y la concentración de cada mineral en el mismo, facilitada por la casa comercial (Tabla M2).

Tabla M2. Estudio I. Fases del estudio y secuencias temporales del protocolo experimental.

	Fase inicial	Fase 24 h	Fase 72 h	Fase 9 días
1 ^{er} y 2 ^o días	Adaptación a las jaulas estándar y a las jaulas metabólicas			
3 ^{er} día		Inyección i.v. de nigrina b (5 mg/kg) con una concentración inicial de 2mg/ml		
4 ^o día		Recogida y pesado de heces y comida		
6 ^o día			Recogida y	

			pesado de heces y comida	
11° día				Recogida y pesado de heces y comida

En un segundo estudio (Estudio II) se realizaron cuatro ensayos para evaluar la evolución del estrés oxidativo en distintos órganos antes y después de la administración de una dosis subletal de nigrina b. En el primer ensayo (ensayo 1) se determinó la capacidad antioxidante en hígado, riñón, intestino grueso y tres zonas del intestino delgado (proximal, medio y distal), analizando el MDA y las actividades enzimáticas de CAT, SOD y GSH-Px. En los tres ensayos restantes se procedió del mismo modo que en el primero en cuanto a determinaciones metabólicas y órganos analizados, pero a 24h (ensayo 2), 72h (ensayo 3) y 9 días (ensayo 4) después de la administración de nigrina b (Tabla M3).

Tabla M3. Estudio II. Ensayos y secuencias temporales del protocolo experimental.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
1 ^{er} y 2 ^o días	Adaptación a las jaulas estándar y a las jaulas metabólicas			
3 ^{er} día		Inyección i.v. de nigrina b (5 mg/kg) con una concentración inicial de 2 mg/ml		
4 ^o día		Sacrificio animales y recogida de órganos		

6° día			Sacrificio animales y recogida de órganos	
11° día				Sacrificio animales y recogida de órganos

3.2.4. Administración de nigrina b.

La administración de nigrina b se realiza inmovilizando al animal y así conseguir que el pinchazo sea más certero, esto lo conseguimos introduciendo al ratón en un cepo (Figura M4). Se debe pesar cada uno de los ratones justo antes de pincharlos y así se calculará el volumen concreto de nigrina b que se debe inyectar a cada animal. La inyección debe realizarse en la vena mayor de la cola, en el punto medio de esta, para ello se utiliza una jeringuilla de insulina. Este paso requiere máximo cuidado y precisión puesto que la vena es muy fina y se rompe con facilidad.



Figura M4. Administración de nigrina b. Inyección de nigrina b en la vena de la cola del ratón.

3.2.5. Estudio I.

- **Evaluación del peso de los animales.**

Los ratones Swiss utilizados en este estudio se pesaron al inicio de cada una de las fases que comprende el estudio utilizando una balanza convencional (Mettler). Para ello se dispone de un recipiente apropiado en el que se introducía el animal. Se obtiene su peso en gramos por diferencia entre el peso del recipiente vacío y del recipiente con el animal.

- **Recogida de heces y evaluación del peso.**

Se recogieron las heces de cada animal por separado al inicio de cada una de las fases, utilizando jaulas metabólicas. Posteriormente se pesaron las heces excretadas en cada una de las fases por cada animal. En cada fase:

inicial, 72 horas y 9 días, tras obtener la cantidad de heces totales excretadas por animal, se calculó la cantidad promedio excretada por día.

- **Evaluación del pienso ingerido a lo largo del estudio.**

Los animales disponían de alimento libremente, para conocer la cantidad de pienso consumida por animal y día se retira y pesa diariamente el pienso que no ha ingerido el animal, se pesa diariamente el pienso que se coloca de nuevo en el comedero y se obtiene por diferencia de pesada el pienso consumido por cada animal durante 24 h.

- **Estudio de la cantidad absorbida de calcio, magnesio zinc y cobre.**

Los animales recibidos desde el animalario de la Facultad de Medicina de Valladolid se dispusieron de forma aleatoria en jaulas estándar durante el periodo de adaptación (48 h) a las condiciones de la sala de experimentación. Transcurrido dicho periodo los animales se trasladaron a jaulas metabólicas donde permanecieron durante el resto del estudio. A las 24 h de permanencia en las jaulas metabólicas, y antes de administrar la nigrina b a los animales, se pesaron con el fin de administrarles la dosis adecuada (5 mg/Kg de peso corporal) por vía intravenosa. Durante las cuatro fases del estudio (Figura M5), se procedió a pesar la cantidad de pienso ingerida y heces excretadas por ratón y día y a medir el volumen de orina por ratón y día. Se tomaron alícuotas de las heces para medir por absorción atómica la concentración de minerales Ca, Mg, Cu y Zn.

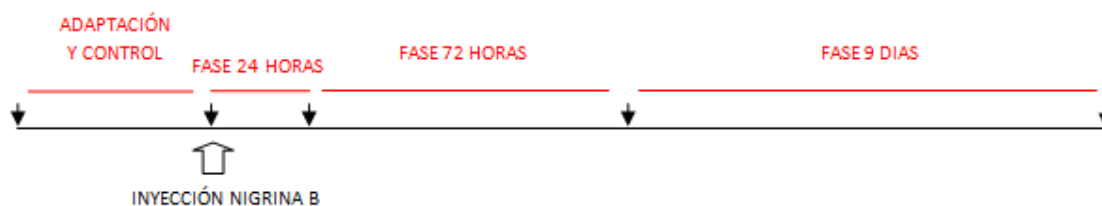


Figura M5. Secuencia temporal seguida en este estudio antes y después de la inyección de nigrina b.

- **Incineración de las muestras de heces.**

Las muestras de heces se convirtieron en cenizas colocándolas en la mufla a 580 °C durante 48 horas. Se añadieron 4 ml de HCl 6M para disolver las cenizas que se filtraron y se guardaron para posteriores análisis.

- **Preparación de la rectas de calibrado para medir las concentraciones de calcio, magnesio, cobre y zinc.**

Se procedió como sigue. Se prepara una solución de calcio en Tris de 1.09943 mg/L y se preparan diluciones seriadas entre 1 y 5 mg/mL cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 422,7 nm. En el caso del Mg la concentración es de 1.09949 mg/L y se preparan diluciones seriadas entre 0,5 y 0,1 mg/mL cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 285,2 nm. Para el Zn la concentración es de 1.09953 mg/L y se preparan diluciones seriadas entre 1,5 y 0,4 mg/mL cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 213,9 nm. Para el Cu la concentración es de 1.09987 mg/L y se preparan diluciones seriadas entre 5 y 1 mg/mL cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 324,7 nm.

- **Procedimiento para medir la cantidad de minerales en heces.**

Con el fin de obtener valores de concentración para calcio y magnesio incluidas en el rango de linealidad de la recta patrón, se procedió de la siguiente manera: se toman 250 µl del filtrado de cenizas en HCl 6M, se añaden 5ml de LaCl al 0,5% en HCl 6M y se cogen alícuotas de 100 µl de esta última dilución y se añaden 5 ml de LaCl al 0,5% en HCl 6 M. Las concentraciones de zinc y cobre se miden directamente en el filtrado de cenizas en HCl 6M.

Conocidas la cantidad de heces excretadas por ratón y día en cada una de las fases y la concentración de cada mineral en ellas, se calculó la cantidad excretada de calcio, magnesio, zinc y cobre excretado por ratón y día en cada fase.

- **Procedimiento para medir la cantidad de minerales en pienso ingerido.**

A partir de la concentración de los minerales en el pienso, facilitada por el proveedor y conocida la cantidad de pienso ingerida por ratón/día/fase, se obtuvo la cantidad ingerida de cada uno de los minerales.

- **Medida de la absorción aparente de Ca, Mg, Cu y Zn.**

Con los datos de mineral ingerido y excretado, calculamos la absorción aparente de cada uno de los minerales aplicando la siguiente ecuación:

Coefficiente de Absorción Aparente

$$= \frac{mg \text{ (mineral) ingeridos} - mg \text{ (mineral) excretados}}{mg \text{ (mineral) ingeridos}} \times 100$$

3.2.6. Estudio II.

Este estudio comprende 4 ensayos en los cuales se evaluó la actividad de enzimas antioxidantes como son la Catalasa (Cat) Glutation peroxidasa (Gpx) y Superoxidodismutasa (SOD) en distintos órganos (hígado, riñón, intestino delgado e intestino grueso) del animal, que indica los niveles de estrés oxidativo. También se evaluó en cada uno de los ensayos la cantidad de MDA en los mismos órganos como marcador de peroxidación lipídica.

En cada ensayo se utilizaron 8 ratones Swiss alojados en jaulas estándar, para obtener los órganos donde se iban a analizar los distintos marcadores de estrés oxidativo y se procedió de la siguiente manera: se anestesian los animales y se extrae la sangre por punción cardiaca. Después se practica una incisión abdominal para acceder a los distintos órganos (hígado, riñón, intestino delgado y grueso) que se aíslan, limpian con suero fisiológico y se pesan. En este proceso se hizo especial hincapié en el tratamiento del intestino delgado que se dividió en tres regiones (proximal, media y distal) que se analizan por separado. Posteriormente, los distintos tejidos se conservan en nitrógeno líquido hasta la preparación de los homogeneizados.

3.2.6.1. Determinación de peroxidación lipídica.

La concentración de MDA se midió en hígado, riñón, intestino grueso y tres zonas del intestino delgado (proximal, medio y distal) y se determinó

de acuerdo con el procedimiento de (Uchiyama y Mihara., 1978) que es un método ampliamente utilizado basado en el uso del reactivo el ácido- 2-tiobarbitúrico (TBA).

- **Procesado de los órganos y tejidos.**

Para poder analizar el MDA en cada uno de los órganos previamente congelados, tras proceder a su descongelación a T ambiente se obtuvieron las muestras para los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la siguiente manera: se homogenizan 100 mg de tejido a los que se añade 1 ml de TCA. El homogenizado procedente de cada órgano se centrifuga a 8.000 g durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante que se mantiene en nitrógeno líquido hasta que se mide la concentración de MDA.

- **Preparación de la recta patrón.**

Para realizar la recta patrón primero se preparó una “solución madre” de 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (MDA) de la siguiente manera: se prepara una disolución (Solución A) a partir de 100 ml de H₂O destilada y 200 µl HCl 1N. Se añaden 22 µl de la solución de MDA 97% (suministrado por el fabricante) a 50 ml con la Solución A. Esta disolución se mantiene a 50°C durante una hora y se espera hasta que la disolución alcance la temperatura ambiente. A continuación se enrasa hasta 100 ml con la Solución A. La “solución madre” se guarda a 4° C en oscuridad hasta ser utilizada para obtener la recta patrón. Antes de proceder a realizar las diluciones seriadas de la “solución madre”, se toman 500 µL de esta solución para medir la Absorbancia a 267 nm, a partir de la cual se obtiene su concentración aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración real de trabajo} = \text{Abs}/E_{1\%/cm}$$

$$E_{1\%/cm} = 31800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

El valor de absorbancia obtenido para la “solución madre” fue de 0,603. Por lo tanto la concentración real de trabajo fue de 0,00001896 moles/L. A partir de la solución madre se prepararon las soluciones estándar y se analizaron las muestras cuantificando el MDA por HPLC. La cromatografía se realizó con las condiciones siguientes:

- Fase móvil: 65% K_2HPO_4 50 mM + KH_2PO_4 50 mM hasta pH 7 y 35% Metanol
- Inyección: 10 μl
- Columna cromatográfica Waters Spherisorb[®] 5 μm ODS2 (4,6x250 mm)
- Flujo isocrático 1 ml/min
- Temperatura 30 °C
- Detección: Absorbancia 535 nm (0,02 AUF)
- Tiempo de recorrido cromatográfico: 10 minutos

Con las áreas cromatográficas, obtenidas a partir de las soluciones estándares se obtuvo la recta patrón. Esta recta patrón se utilizó para la obtención de las concentraciones de MDA de las muestras problema.

3.2.6.2. Determinación de enzimas antioxidantes.

Se midieron las actividades de catalasa (CAT), superoxidodismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), en hígado, riñón, intestino delgado (próximo, medio y distal) e intestino grueso.

- **Procesado de los órganos y tejidos para medir la actividad enzimática.**

Los órganos extraídos se utilizaron para medir la actividad de las enzimas antioxidantes. Para poder analizar cada uno de los órganos congelados, se descongelaron y procedió como sigue:

- Se toma una muestra de cada órgano de aproximadamente 10 g y se coloca en un homogenizador de vidrio que deberá estar en hielo durante todo el proceso.
 - Añadimos al homogenizador 1 ml del tampón específico para cada enzima y que está suministrado por el fabricante.
 - El homogeneizado se centrifuga a 14.000 rpm y a 4° C durante 15 minutos.
 - Se separa el sobrenadante que se guarda en nitrógeno líquido para su posterior análisis.
 - Reservamos el precipitado para medir la concentración de proteínas por el método de Lowry como se describe más adelante y los resultados se expresan en función de la concentración de proteína.
- **Determinación de la actividad de la Catalasa por espectrofotometría.**

Para medir la actividad de esta enzima se ha realizado un ensayo colorimétrico con Kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en medir la concentración de sustrato, H_2O_2 , que resta después de la acción de la catalasa. Primero la catalasa convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 y posteriormente esta reacción enzimática se detiene con azida sódica. Cuando ya ha tenido lugar la reacción tomamos una muestra de esta mezcla para medir la concentración que resta de H_2O_2 por un método colorimétrico. El método colorimétrico usa un fenol sustituido (3,5-dicloro-2-hidroxibenceno-ácido sulfónico) que oxida a la 4-aminoantipirina en presencia de H_2O_2 y peroxidasa de rábano picante, dando un tinte rojo quinoneimina cuya fórmula es (N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato- ρ -benzoquinona monoamina), que absorbe a 520 nm.

Se realizó la recta patrón a partir de concentraciones conocidas de agua oxigenada para conocer la cantidad de H_2O_2 que hay en cada una de las muestras.

Preparación de la recta patrón de H_2O_2 :

Se procede como sigue. Se preparan una serie de soluciones estándar de H_2O_2 (a una concentración 10 mM) en tubos de microcentrífuga y se añade solución tampón de ensayo (solución tampón diluida 10 veces con agua destilada) hasta un volumen final de 1.0 mL. Se mezcla por inversión. Se prepara la solución 10 mM de H_2O_2 (esta solución se prepara únicamente para obtener la recta patrón de la A de tinte rojo de quinoneimina frente a la concentración conocida de H_2O_2). La reacción colorimétrica para las muestras tiene lugar a temperatura ambiente (25°C). El procedimiento es el siguiente:

-
- Preparar las muestras como se ha indicado anteriormente en el apartado 4.2.1. Se añade el volumen apropiado (x μL) a un tubo de microcentrífuga.
 - Se añaden 75 - x μL de la solución tampón de ensayo al tubo de microcentrífuga.
 - Se añaden 25 μL de la solución de sustrato colorimétrica (solución 200 mM de H_2O_2). En este momento es cuando tiene lugar el inicio de la reacción.
 - Se mezcla por inversión y se espera entre 1 y 5 minutos.
 - Transcurrido este tiempo se añade la solución de para (azida sódica) mezclando por inversión.
 - Tomar una alícuota de 10 μL de la mezcla de reacción anterior y añadir a otro tubo de microcentrífuga.
 - Añadir a este nuevo tubo 1 mL de Reactivo de Color. Mezclar por inversión.
 - Esperar al menos 15 minutos a T ambiente para que tenga lugar el desarrollo de color y medir la A_{520} .
- **Cálculo de la actividad de la catalasa.**

Utilizando la recta patrón podremos conocer la concentración de H_2O_2 en cada una de las muestras una vez medida la A_{520} . Una vez conocida la concentración de peróxido de hidrógeno de cada una de las muestras, para conocer la actividad de la catalasa utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Catalasa} = \frac{\Delta \mu\text{moles } (\text{H}_2\text{O}_2) \times d \times 100}{V \times t}$$

- **Determinación de la actividad de la SOD.**

La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en hidrógeno peroxidasa y oxígeno molecular. El método en el que se basa el kit utilizado para la medida de la actividad de esta enzima utiliza una sal de tetrazolio WST-1 que elimina los inconvenientes del método original al ser más soluble en agua. La reducción del O_2 es linealmente proporcional a la actividad de la Xantina Oxidasa (XO), que es inhibida por la SOD.

Utilizando un método colorimétrico podremos determinar el 50% de inhibición de la actividad de la SOD (IC_{50}). Para poder conocer la actividad de la SOD en cada una de las muestras se procedió de la siguiente manera: se calcula la dilución de muestra para la que el porcentaje de inhibición de la SOD es del 50% (IC_{50}), para cada una de las muestras se obtienen las diluciones de trabajo de la muestra seriadas partiendo de 50 μ l del sobrenadante obtenido al centrifugar los homogeneizados de tejidos, a las que se añaden 200 μ l de solución tampón. A partir de cada una de las diluciones se procede a la preparación de las disoluciones para medir la A_{450} . Todas las preparaciones se disponen en una microplaca. A continuación incubamos la microplata a 37° C durante 20 minutos y leemos la A_{520} usando un lector de micro placas.

Se define una unidad de SOD como la cantidad de enzima en 20 μ l de muestra que inhibe la reacción de reducción de la sal WST-1 con anión superóxido en un 50%. Con estos datos podemos calcular la dilución de la muestra para la cual el tanto por ciento de inhibición de la enzima es de 50.

- **Determinación enzimática de la GSH-Px.**

El kit que se ha utilizado para determinar la actividad de esta enzima es un método de determinación indirecto que se basa en la oxidación del glutatión (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), estando esta reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx). Posteriormente una pareja de GSSG vuelve a GSH utilizando glutatión reductasa (GR) y NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido). Lo que se ha medido con este método es el decrecimiento de NADPH y para ello se observa la A_{430} durante la oxidación de NADPH a $NADP^+$, que es indicativo de la actividad de GPx.

La reacción transcurre a 25° C y pH 8.0. Comienza con la adición de un peróxido orgánico, el tertbutil hidroperóxido (t-Bu-OOH). Este peróxido reacciona espontáneamente con GSH y no lo hace con la catalasa por lo que evitamos esta interferencia. La medida de la A_{430} se realiza manualmente sin utilizar programa cinético. La concentración final en la disolución que se utiliza para la reacción es la siguiente: 0,25 mM NADPH, 2,1 mM glutatión reducido, 0,5 U/ml glutatión reductasa y 300 μ M t-Bu-OOH. El procedimiento es el siguiente:

- Se pipetea el volumen de tampón de análisis de glutatión peroxidasa y se coloca en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Se debe mantener la T^a a 25 °C durante todo el tiempo que dura la reacción. Para ello es necesario un espectrofotómetro con termostato.
- Se añaden a la cubeta 50 μ l de la solución de reactivo de análisis de NADPH y una cantidad de 10-50 μ l de muestra, o bien 20-50 μ l de enzima.

-
- Se mezclará por inversión. El volumen total en la cubeta debe ser de 1 ml.
 - Se añaden a la cubeta 10 μ l de la solución 30 mM de tert-butil hidroperóxido. Se mezcla por inversión, y en ese momento es cuando comienza la reacción enzimática.
 - Se sigue el descenso de la A_{430} usando los intervalos de tiempo recomendados siguientes: 15 minutos de intervalo y 6 lecturas de 10 segundos cada una.
 - Calcular la cantidad de enzima en la muestra.

- **Determinación de proteínas por el método Lowry.**

Mediremos las proteínas en el sedimento de las muestras que queda en cada uno de los tubos tras la centrifugación. Para ello utilizaremos el método Lowry, que consta de dos etapas que se describen a continuación:

- Formación de un complejo azul claro por la reacción de iones Cu^{2+} (presentes en el reactivo) con los átomos de N de los enlaces peptídicos de las proteínas en medio alcalino. Tiene lugar otra segunda reacción en la que quedan expuestas las tirosinas por el desdoblamiento de la estructura tridimensional de las proteínas.
- Reducción en medio alcalino del reactivo de Folin-Ciocalteu que se reduce por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina actuando el Cu^{2+} como catalizador de la reacción.

Primero obtenemos una recta patrón a partir de unas concentraciones conocidas de proteínas, para posteriormente calcular la concentración de cada una de las muestras. Utilizamos albúmina con una concentración de 1

mg/mL en distintas diluciones seriadas y medimos su absorbancia. Con estos datos construimos la recta patrón que utilizaremos posteriormente para conocer las concentraciones de proteínas de cada una de las muestras.

Realizamos una hidrólisis básica de cada una muestra. Para ello se toma el tubo con el precipitado y se añaden 250 ml de NaOH 2N. Se incuba a 100 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente. Se prepara el “Reactivo Formador de Complejo” formado por las soluciones A, B y C en proporción 10:0,1:0,1 (Solución A: Na₂CO₃ al 2% en P/V; Solución B: CuSO₄ • 5 H₂O al 1% en P/V; Solución C: Tartrato de sodio y potasio al 2% en P/V). También se prepara el reactivo Folin, que debe usarse en concentración 1 N, para lo que se prepara una dilución 1:1.

Cuando la muestra se haya enfriado se añaden 2,5 ml del Reactivo Formador de Complejo, que debe estar recién preparado, se agita y se deja reposar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden 0,250 ml del reactivo Folin, agitaremos y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30-60 minutos (sin exceder este tiempo), para que tenga lugar la reacción de coloración. Se leen todas las muestras en el espectrofotómetro a 750 nm y la concentración de proteína se calcula a partir de la muestra patrón.

3.2.7. Obtención de muestras para análisis histológico.

- **Perfusión de ratones Swiss.**

Para realizar la perfusión los ratones se anestesian previamente con una mezcla de Ketamina/Xilacina, y a continuación se les inyecta vía intraperitoneal una mezcla de nitrito sódico al 1% y heparina al 1% en partes iguales para evitar la coagulación de la sangre en los vasos sanguíneos. Después se abre el abdomen para tener acceso a su corazón y se realiza la perfusión clavando la sonda de drenaje en el ventrículo izquierdo y abriendo un pequeño agujero en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y las soluciones lavadora y fijadora.

En primer lugar se lavan los vasos sanguíneos del animal con una solución salina tamponada (0,154 M NaCl en tampón fosfato 0,1 M pH 7.4) durante 3 o 4 minutos, mientras lavamos con agua tibia el abdomen del ratón eliminando la sangre que sale de la aurícula derecha y favoreciendo la vasodilatación. A continuación se infunde el fijador a base de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7.4, que se perfunde unos 10 o 12 minutos, hasta que se observe una rigidez suficiente en los miembros y la cola. Para completar con éxito el proceso se deja el ratón sumergido en solución fijadora durante toda la noche a 4° C.

- **Selección de piezas y toma de muestras.**

Tomamos el animal fijado en la solución de paraformaldehído y lo lavamos bien con PBS (fosfato monosódico 5mM, NaCl 0,14M). Con tijeras y unas pinzas procedemos a separar y cortar las diversas piezas que vamos a analizar que en este trabajo. Con las piezas separadas se cortan los fragmentos que se incluirán en parafina colocándola en sus correspondientes *cassettes* de histología.

- **Inclusión en parafina.**

Para la inclusión en parafina disponemos de un procesador automático Leica TP 1020 el cual con el programa almacenado va realizando la inmersión de los *cassettes* con las piezas extraídas en las distintas soluciones según los tiempos marcados: 1 h en EtO a 50 °C; 1 h en EtOH a 70 °C; 1 h en EtOH a 80 °C; 1 h en EtOH a 96 °C; 1 h en EtOH I a 100 °C; 1 h en EtOH II a 100 °C; 1 h en EtOH III a 100 °C; 1 h en Xileno I; 1 h en Xileno II; 2 h en Parafina I y para finalizar otras 2 h en Parafina II.

Procesadas las piezas se procede a desmontar los *cassettes* y a colocar las piezas en parafina utilizando un dispensador Oxford Trade. Se coloca cada pieza en un molde relleno con parafina fundida procurando escoger la mejor orientación y postura para conseguir los mejores cortes. Se pasan los moldes a la zona fría para conseguir la solidificación de la parafina y se procede a su almacenaje hasta el momento de realizar los cortes.

- **Realización de cortes.**

Para realizar los cortes de los tejidos incluidos en parafina partimos de los bloques formados con las piezas a los que hay que desbastar y aproximar a una forma de trapecio adecuada para poder trabajarlos con el microtomo. Los primeros cortes se realizan para aproximar la cuchilla a la zona de corte del tejido y posteriormente se afina el grosor para sacar las muestras que se van analizar. Los cortes obtenidos son recogidos con un pincel y unas pinzas y se depositan durante 1 minuto en EtOH al 30 %, para luego pasarlos a un baño de agua caliente con gelatina al 1% que permitirá fijar las muestras en los portaobjetos. Se deja secar y se colocan en las gradillas de tinción.

- **Tinción con hematoxilina/eosina.**

La tinción se realiza siguiendo un preciso protocolo que se lleva a cabo pasando la gradilla portaobjetos por diversas soluciones en periodos establecidos. El protocolo se inicia desparafinando durante 3 minutos en Xileno I, 3 minutos en Xileno II, 3 minutos en Xileno III, se continua hidratando los cortes durante 2 minutos en EtOH a 100 °C I, 2 minutos en EtOH a 100 °C II, 2 minutos en EtOH a 96 °C, 2 minutos en EtOH a 80 °C, 2 minutos en EtOH a 70 °C, 2 minutos en EtOH a 50 °C, 2 minutos en H₂O, se tiñe 2 minutos en hematoxilina, 30 minutos en agua corriente, y se vuelve a teñir 1 minuto en eosina, se realiza un breve lavado en H₂O y se realiza la deshidratación de las muestras con 3 minutos en EtOH 70 %, 3 minutos en EtOH 80 %, 3 minutos en EtOH 96 % I, 3 minutos en EtOH 96 % II, 3 minutos en EtOH 100 % I y 3 minutos en EtOH 100 % II. Se aclaran los portaobjetos con Xileno I durante 5 minutos, Xileno II otros 5 minutos y por último Xileno III otros 5 minutos. Por último se montan los portaobjetos con Entellan, aplicando unas gotitas de este producto sobre el portaobjetos para poder fijar encima el cubreobjetos.

- **Análisis de los cortes por microscopía óptica.**

Para realizar el análisis histológico de las muestras recibimos la inestimable ayuda del Prof. Gayoso del Departamento Farmacología, Biología Celular e Histología (Universidad de Valladolid). Se utilizó un microscopio óptico Axiophot cam HRc Zeiss conectado a un ordenador Acer Aspire AMD 64, con el cual se realizó el estudio histológico y se obtuvieron gran número de fotografías que se incluyen en esta tesis. Los aumentos empleados fueron de 5, 10, 20 y 40 aumentos.

3.2.8. Análisis estadístico.

Para analizar los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico utilizando el software Microsoft Office Excel 2007. Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar (DE).

4. RESULTADOS.

4.1. Preparaciones de nigrina b de la corteza de *Sambucus nigra* L.

La obtención de nigrina b por cromatografía de 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 *S. 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.

Las preparaciones de nigrina b utilizadas en el presente trabajo fueron obtenidas y caracterizadas en el laboratorio del profesor Girbés en Valladolid. La que se presenta aquí es un resumen de una preparación tipo representativa que mantiene todas las propiedades características de nigrina b. Por ello en el presente trabajo solo presentaremos el control de calidad de la proteína.

4.2. Caracterización y control de calidad de nigrina b.

La caracterización de las lectinas de *S. nigra* L. 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 nigrina b. El análisis

de la toxicidad permite determinar fundamentalmente la actividad de la cadena enzimática o cadena A (actividad N-glicosidasa de los ácidos nucleicos).

La electroforesis se realizó con proteínas purificadas con concentraciones que permitiesen determinar con claridad, no solamente la Mr sino también su pureza (ausencia de contaminación cruzada con otras lectinas). En la figura R1 se muestran las características de una preparación tipo de nigrina b obtenida por cromatografía de afinidad.

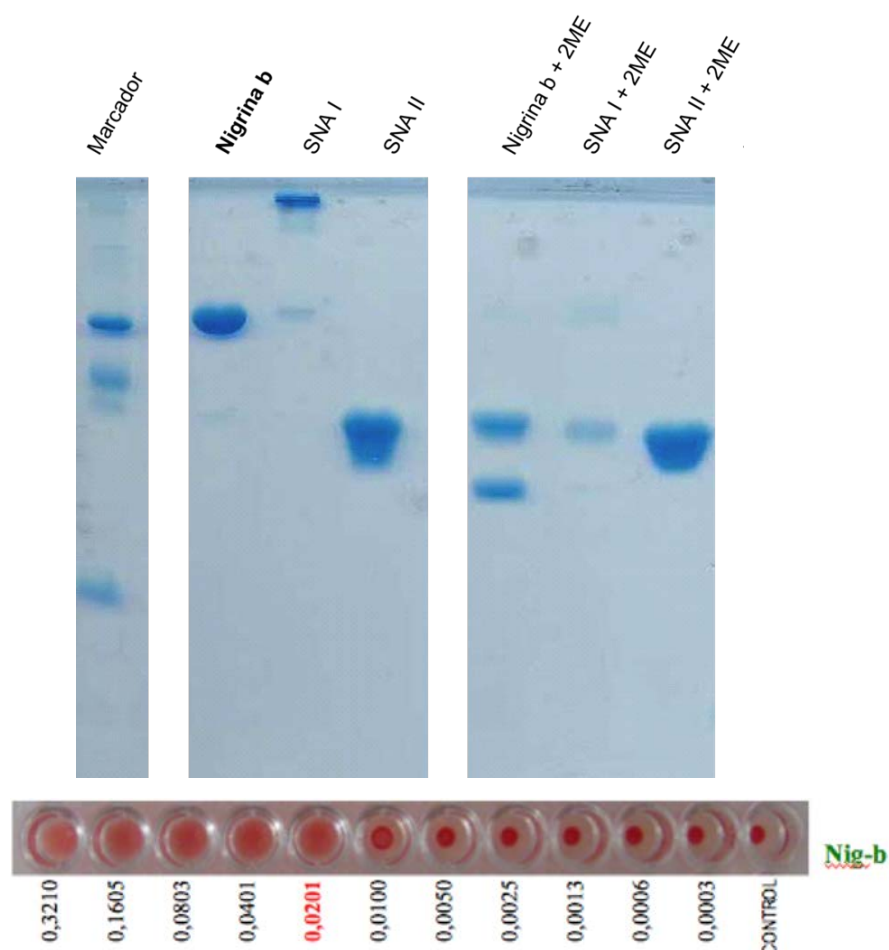


Figura R1. Caracterización de una preparación tipo de nigrina b por cromatografía de afinidad. Parte superior: electroforesis de las lectinas de la corteza de *S. nigra* en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Los

marcadores de peso molecular son alfa-lactoalbúmina (14 kD), inhibidor de tripsina de soja (20 kD), ovoalbúmina (45 kD) y BSA (66 kD). Parte inferior: hemoaglutinación de sangre humana O+; la hemoaglutinación por nigrina b se produce a 20,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En ausencia de aglutinación las células rojas sedimentan formando un botón en el fondo del pocillo, mientras que en la aglutinación total las células interaccionan unas con otras formando una superestructura en forma de capa que no sedimenta y que presenta una tonalidad rosada. Jiménez y cols., (2013).

Como puede apreciarse en la figura R1 la nigrina b 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, aun siendo la nigrina un dímero A-B porque está fuertemente glicosilada.

Nigrina b aglutina células rojas de la sangre humana a baja concentración. Esta es una actividad que permite seguir la actividad y la eficacia del aislamiento de nigrina (Girbés y cols., 1993b; Jiménez y cols., 2013). Como se indica en la figura R1, la nigrina b promueve la aglutinación a 20,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este valor está en consonancia con los publicados anteriormente (Girbés y cols., 1993b; Jiménez y cols., 2013).

4.3. Estudio I.

4.3.1. Evolución del peso y la longitud del intestino delgado.

La administración i.v. de nigrina b 5 mg/Kg de peso corporal a ratones Swiss de entre 30 y 40 g provoca una disminución de un 5-8% del peso corporal a las 24 horas de la inyección de nigrina b. Esta disminución llega

hasta el 14% a las 72 horas. A los 9 días se ha recuperado completamente el peso del animal, siendo prácticamente el mismo que el de los animales que no habían recibido ningún tratamiento en consonancia con datos ya publicados (Gayoso y cols., 2005; Jiménez y cols., 2013).

Esta reducción del peso descrita previamente por otros autores va acompañada por una reducción en la longitud del intestino delgado. Como puede apreciarse en la figura R2, la nigrina b provoca una disminución en la longitud del intestino delgado de un 16 % a las 24 horas que se mantiene hasta las 72 horas para ir recuperándose posteriormente y llegar a ser superior que al inicio transcurridos 9 días (figura R2).

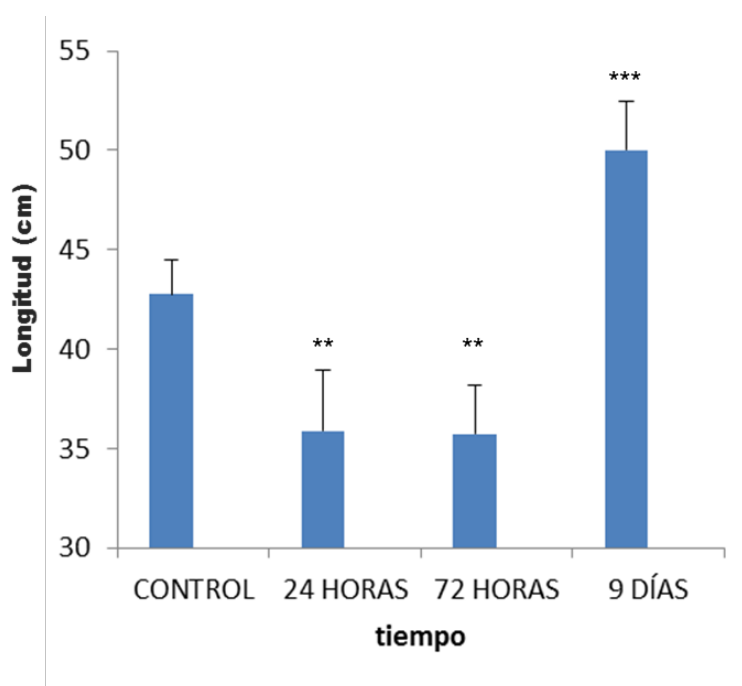


Figura R2. Variación de la longitud del intestino delgado. Valores-*p* según estudio de la *t*-student: control vs. muestra; *** $p < 0,01$; ** $p > 0,05$.

4.3.2. Variación de la comida ingerida.

Respecto a la comida ingerida, como se puede observar en la figura R3, a las 24 horas hay una disminución significativa de la ingesta media de comida de aproximadamente un 44% respecto a la fase inicial. A las 72 horas la ingesta media de comida aumenta respecto a las 24 horas, pero aún hay una disminución significativa respecto al control en un 15% aproximadamente. A los 9 días la ingesta media de comida supera la de la fase inicial aproximadamente en un 20%.

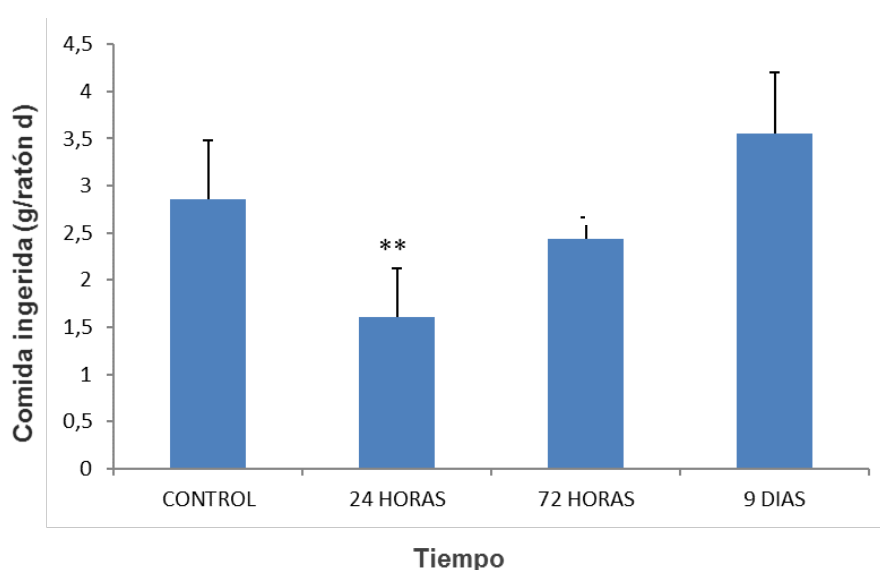


Figura R3. Comida ingerida por ratón y día en las diferentes fases del experimento. Valores-p según estudio de la t-student: control vs. muestra; ** $p > 0,05$.

4.3.3. Variación de la cantidad y morfología de las heces excretadas.

- **Variación de la cantidad de heces excretadas**

Se observa en la figura R4 que a las 24 horas hay una fuerte disminución de la cantidad de heces excretadas por ratón y día respecto a la fase inicial. La cantidad media de heces excretadas va aumentando a las 72

horas pero todavía sigue siendo inferior significativamente a la cantidad excretada en la fase inicial. A los nueve días la cantidad de heces excretadas es equiparable a la cantidad media excretada por animal y día antes de recibir la inyección de nigrina b.

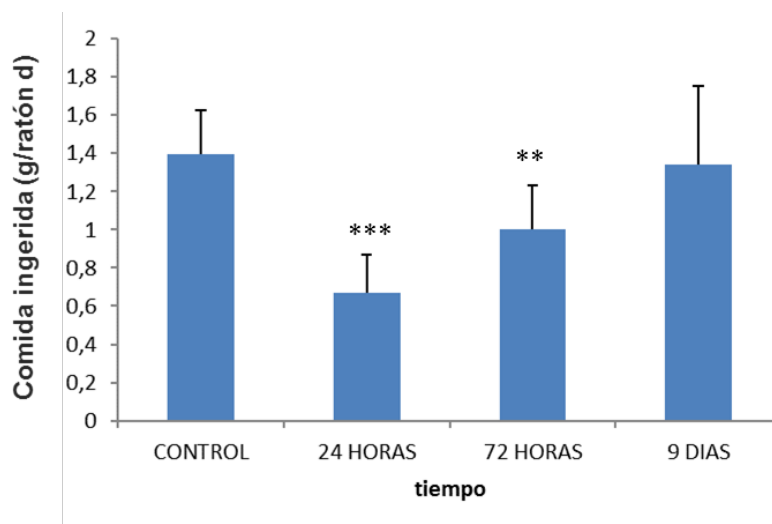


Figura R4. Gramos de heces excretados en cada una de las fases del experimento por ratón y día. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$.

- **Cambios en la morfología de las heces**

En la figura R5 observamos pequeñas muestras de las heces en cada una de las fases del experimento. Se puede ver claramente una diferencia

importante en la morfología de estas heces en cada una de las fases.



Figura R5. Muestras de heces de cada una de las fases del experimento.

La escala es la misma en los 4 casos. El peso promedio por fragmento para cada caso es: 50,6 mg en control, 14,8 mg a las 24 h, 30 mg a las 72 h y 29,7 a los 9 días. Se utiliza un mismo peso para determinar el número de fragmentos de heces en cada caso.

Las heces control se muestran grandes, claras y compactas con un peso promedio de 50,5 mg/fragmento. Las heces recogidas después de 24h de la administración de nigrina b son mucho más pequeñas y oscuras, debido

a la presencia de sangre y con un peso promedio de 14,8 mg por fragmento. Las heces recogidas a las 72 horas después de la administración de nigrina b muestran un color más claro y un mayor tamaño que las recogidas a las 24 horas con un peso promedio de 30 mg por fragmento. Por último, las heces recogidas a los 9 días de iniciarse el tratamiento son muy parecidas a las heces de los ratones que no han sido sometidos a ningún tratamiento y con un peso promedio de 29,7 mg por fragmento. Estas últimas heces presentan un color muy parecido al del control. Se observa por tanto una recuperación tanto en la cantidad de heces (Figura R4) como en su aspecto y tamaño.

En la tabla R1 se presenta la cantidad media de pienso ingerido y heces excretadas por animal y día en cada una de las fases, así como el grado de significación cuando se comparan estas variables entre las distintas fases del estudio.

Tabla R1. Evolución de la comida ingerida y las heces excretadas de los 15 ratones durante el periodo de experimentación. a, b, c $p \leq 0.001$ vs periodo inicial, 24 h, 72 h y 9 días respectivamente; a, b $p \leq 0,01$ vs periodo inicial, 24 h, 72 h y 9 días respectivamente; a $p \leq 0,05$ vs periodo inicial, 24 h, 72 h y 9 días respectivamente. Los datos están referidos en cada caso a cada ratón particular.

	Fase Inicial	Fase 24 h	Fase 72 h	Fase 9 días
Comida (g/r/d)	2,6 ± 0,7	1,9 ± 0,6 ^{a,b,c}	3,2 ± 0,6 ^a	3,5 ± 1,2 ^a
Heces (g/r/d)	1,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2 ^{a,b,c}	1,2 ± 0,2 ^{a,b,c}	1,8 ± 0,2

4.3.4. Absorción aparente de minerales.

La absorción aparente absoluta de los minerales calcio, magnesio, cinc y cobre, han seguido una dinámica parecida en los cuatro casos, aunque encontramos algunas diferencias a tener en cuenta.

En la figura R6, se puede comprobar cómo varía la absorción aparente absoluta de calcio en cada una de las fases del experimento. Transcurridas 24 horas de la inyección de nigrina b, los mg de calcio absorbidos disminuyen de forma significativa respecto a la fase en la que los animales todavía no han tenido ningún tratamiento. Posteriormente la absorción media se recupera a las 72 horas y supera levemente a la de los animales de la fase control, aunque la diferencia no es significativa. A los 9 días de tratamiento la absorción se ha recuperado totalmente e incluso supera a la de los animales de la fase control significativamente.

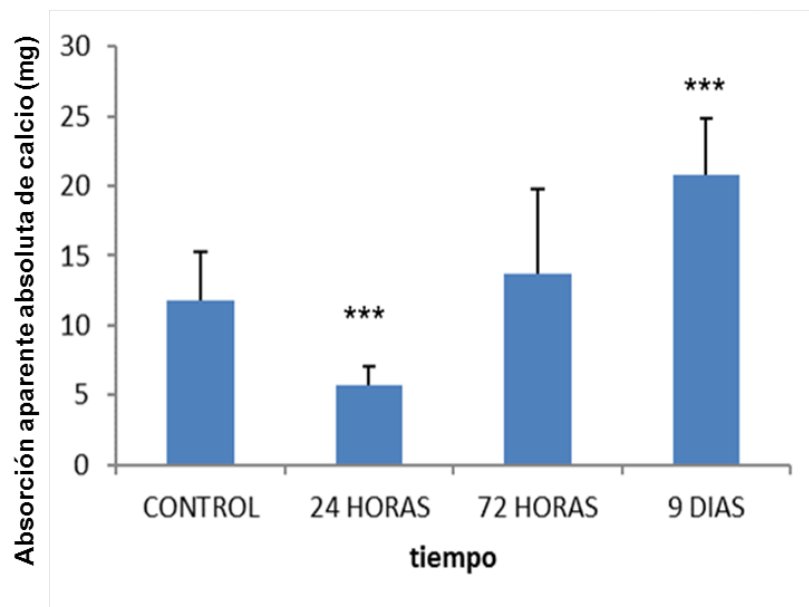


Figura R6. Absorción aparente absoluta de calcio. Valores-p según estudio de la *t*-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$.

En la figura R7 puede observarse la variación de la absorción absoluta aparente del magnesio, que sigue la misma pauta que la del calcio. Disminuye de manera significativamente cuando han transcurrido 24 horas de la inyección de nigrina b, para recuperarse a las 72 horas e incluso aumentar un poco respecto a la absorción de los animales que no han tenido ningún tratamiento. También se puede observar un aumento significativo de la absorción cuando han transcurrido 9 días del inicio del tratamiento.

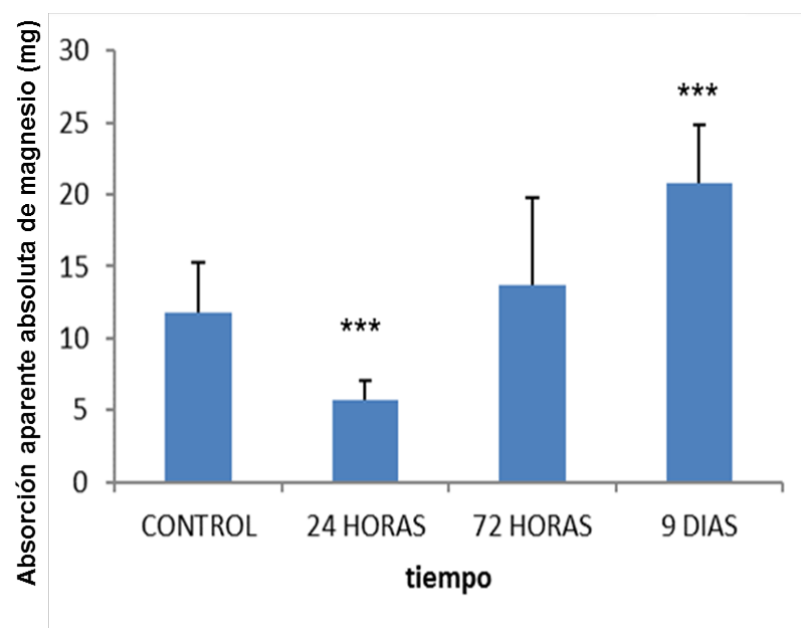


Figura R7. Absorción absoluta aparente de magnesio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs. muestra; *** $\leq 0,001$.

En la figura R8 observamos que la absorción absoluta de cobre sigue la misma pauta que la de calcio y la de magnesio. Vemos como disminuye la absorción a las 24 horas para posteriormente recuperarse, quedando de nuevo esta actividad de absorción por encima de los valores del control.

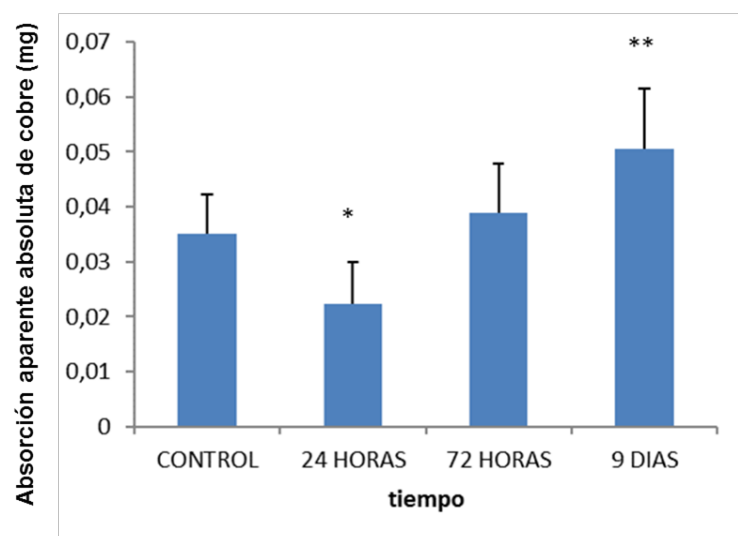


Figura R8. Absorción absoluta aparente de cobre. Valores-p según estudio de la t-student: control vs. muestra; ** $\leq 0,01$; * $\leq 0,05$.

En la figura R9 está representada la variación de absorción de cinc en las diferentes fases del experimento y observamos el mismo comportamiento que en los otros tres minerales.

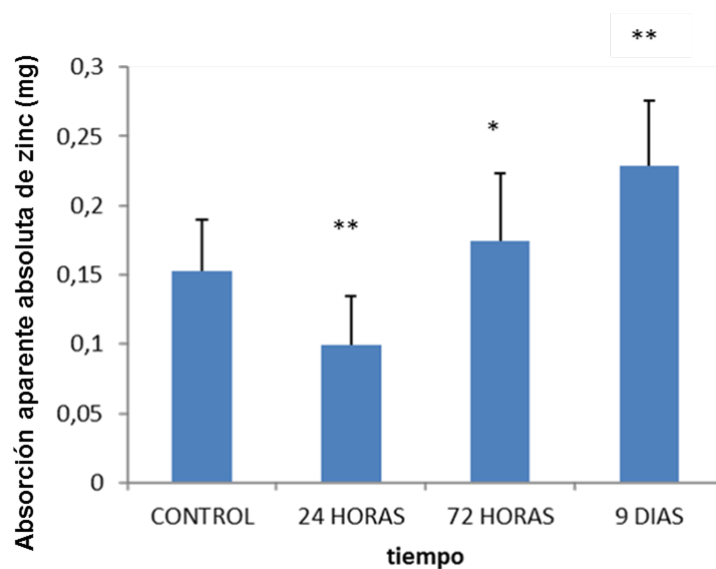


Figura R9. Absorción absoluta aparente de cinc. Valores-p según estudio de la t-student: control vs. muestra; ** $\leq 0,01$; * $\leq 0,05$.

Aunque las variaciones de los minerales siguen la misma dinámica en los cuatro casos cuando se analiza la variación de la absorción en porcentaje, respecto al control, encontramos algunas diferencias. Esto podemos observarlo en la tabla R2.

Tabla R2- Porcentajes de las variaciones en la absorción aparente absoluta de los cuatro minerales respecto al control previo al tratamiento.

	24 HORAS	72 HORAS	9 DÍAS
CALCIO	-47,85%	+18,07%	+45,55%
MAGNESIO	-24,95%	+18,96%	+43,48%
COBRE	-31,88%	+14,44%	+33,1%
CINC	-29,95%	+16,9%	+35,9%

Podemos observar que el Cu y el Zn van prácticamente en paralelo y los incrementos y decrementos son muy parecidos en cada una de las fases. En cambio el calcio y el magnesio vemos que van en paralelo cuando ya hay una recuperación de la absorción mientras que a las 24 horas la disminución de la absorción es mucho mayor que para el magnesio.

4.4. Estudio II.

4.4.1. Variación de la longitud del intestino delgado.

La nigrina b administrada de forma intravenosa a 5 mg/Kg de peso corporal provoca, a las 24 horas, una disminución en la longitud del intestino delgado de un 16 %, que se mantiene hasta las 72 horas para ir

recuperándose posteriormente y llegar a ser superior que al inicio transcurridos 9 días (Figura R10).

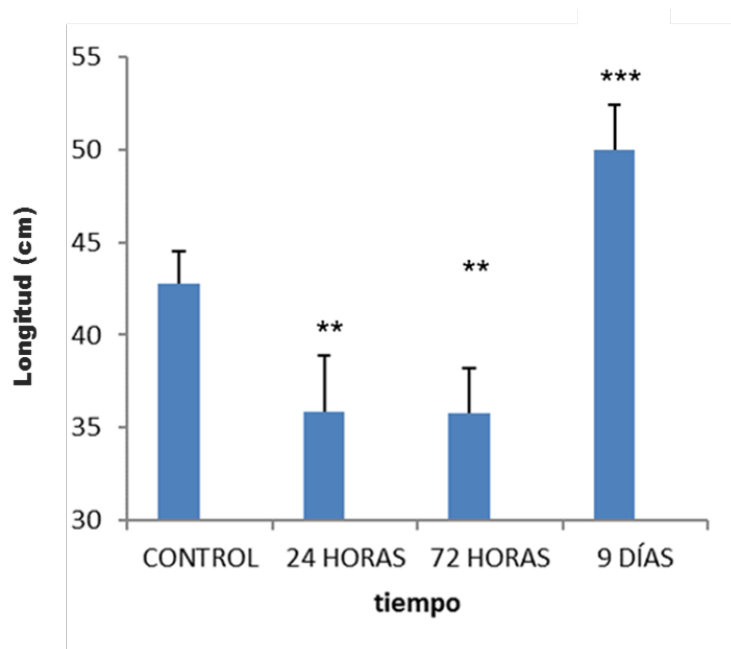


Figura R10. Representación de la variación de la longitud del intestino delgado. Valores-*p* según estudio de la *t*-student: control vs.muestra; *** \leq 0,001; ** \leq 0,01.

4.4.2. Estrés oxidativo.

La cantidad de MDA en cada uno de los órganos es una indicación de los niveles de estrés oxidativo. La distribución de la cantidad de MDA es diferente en cada uno de los órganos estudiados. En la figura R11 podemos ver que el órgano con mayor cantidad de MDA son el hígado, cuando se trata de animales que no han tenido ningún tratamiento.

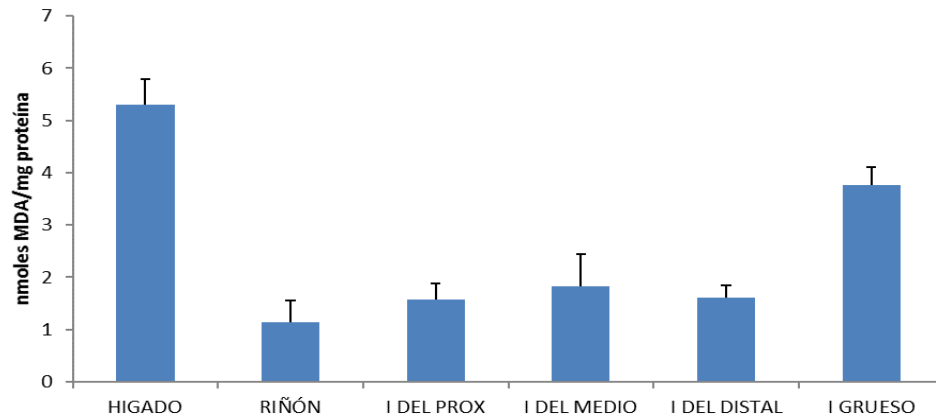


Figura R11. Cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en cada uno de los órganos estudiados antes del tratamiento con nigrina b.

Transcurridas 24 horas desde el inicio del tratamiento las cantidades de MDA varían y podemos observar en la figura R12 que el intestino delgado proximal es la zona en la que aumenta en mayor medida y en general todo el intestino aumenta.

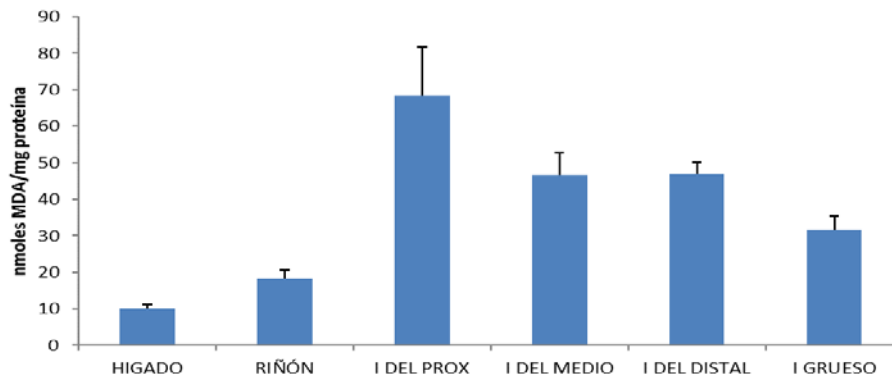


Figura R12. Cantidad de MDA (nmol/mg proteína) a las 24 horas del inicio del tratamiento.

En la figura R13 lo que podemos observar son las cantidades de MDA transcurridas 72 horas de la inyección de nigrina b. El intestino grueso es la zona con mayor cantidad de MDA de los órganos que se han estudiado,

aunque sigue siendo todo el intestino en general la zona donde hay mayor cantidad de MDA.

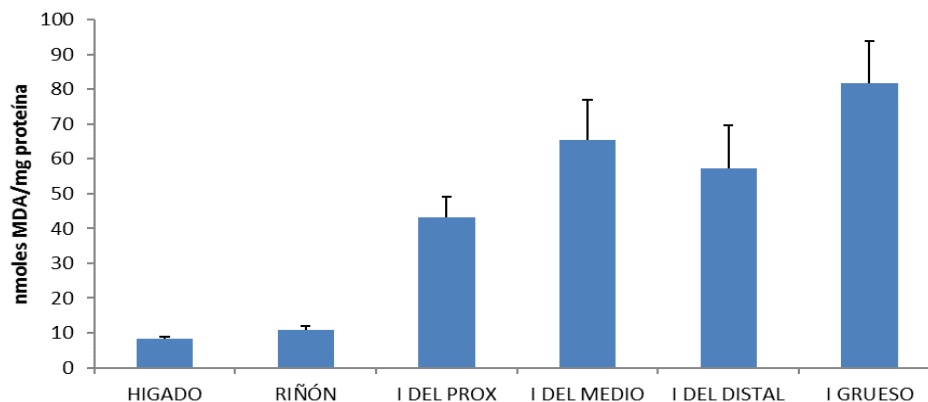


Figura R13. Cantidad de MDA (nmoles/mg proteína) a las 72 horas de la administración de nigrina b.

Transcurridos 9 días del inicio del tratamiento con nigrina b, los niveles de MDA de cada uno de los órganos estudiados se van normalizando y se aproximan a los niveles que encontramos en la fase inicial, a excepción del intestino grueso donde la cantidad de MDA es la más elevada (Figura 14).

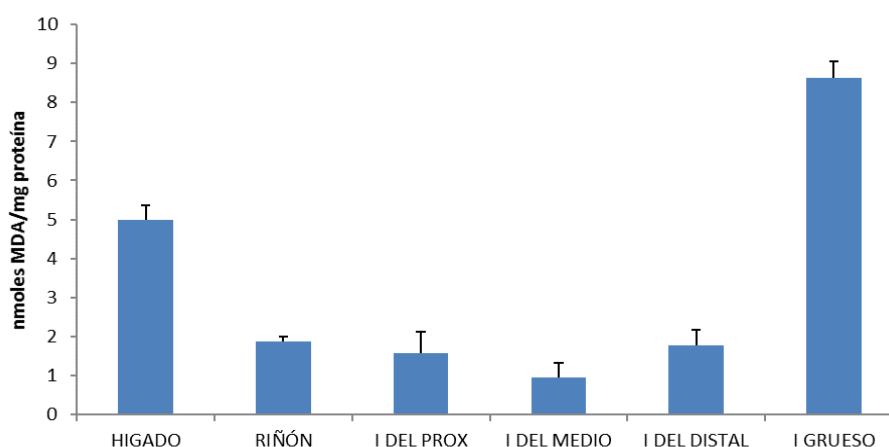


Figura R14. Cantidad de MDA (nmoles/mg proteína) a los 9 días de la inyección de nigrina b.

En la figura R15 se observa la variación de las cantidades de MDA, en el hígado y riñón para cada una de las fases del estudio. En ambos órganos hay un incremento significativo, respecto a la fase inicial, transcurridas 24 horas de la inyección de nigrina b. A las 72 horas hay un descenso respecto a las 24 horas, pero aún encontramos un incremento significativo respecto a la fase control. Transcurridos 9 días desde el inicio del tratamiento se observa que la cantidad de MDA va disminuyendo y en el caso del hígado es prácticamente la misma que en la fase control y para el riñón es ligeramente superior que en la fase control.

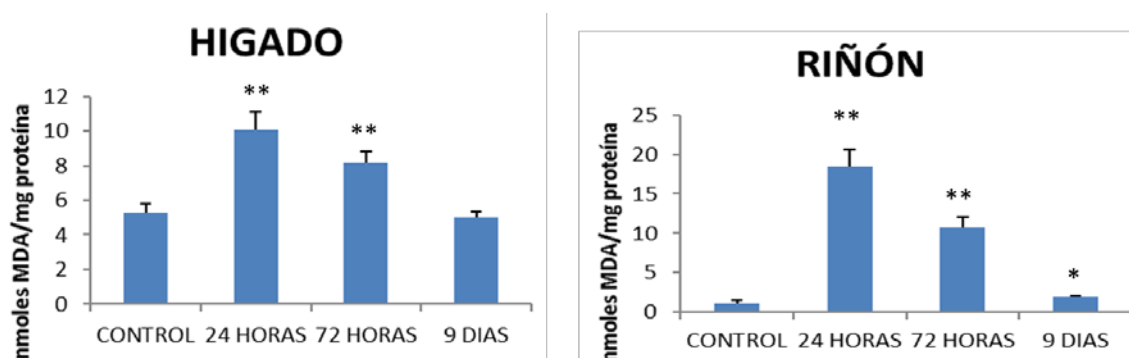


Figura R15. Cantidad de MDA (nmoles/mg proteína) en cada una de las fases del experimento. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; ** $\leq 0,01$; * $\leq 0,05$.

Respecto al intestino delgado se observan diferentes comportamientos según la parte de éste de que se trate (Figura R16). En la porción proximal del intestino delgado se observa que la cantidad de MDA aumenta de forma significativa respecto al control. Transcurridas 72 horas la cantidad de MDA aún es significativamente mayor que la cantidad de MDA que encontramos en la fase control, aunque ya se observa una disminución respecto a las 24 horas. Cuando han transcurrido 9 días desde el inicio del tratamiento la

cantidad de MDA en el intestino delgado próximo es prácticamente la misma.

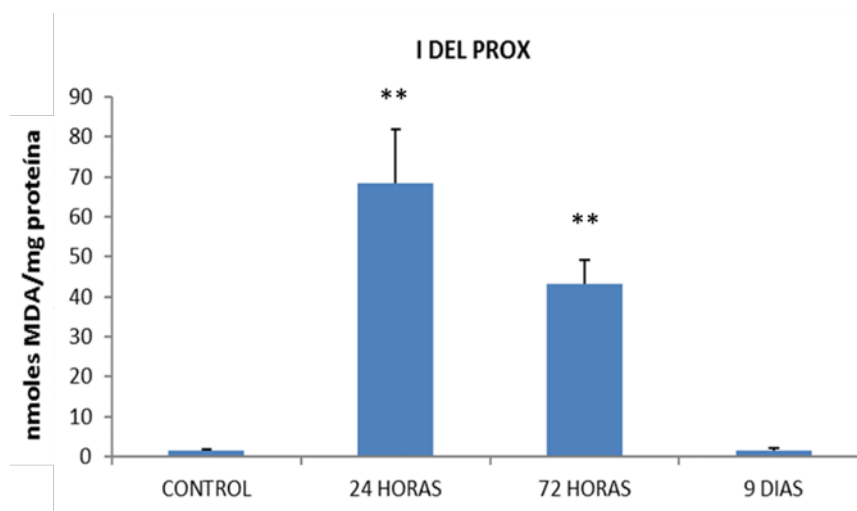


Figura R16. Cantidad de MDA (nmoles/mg proteína) en el intestino delgado próximo. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; ** $\leq 0,01$.

En la figura R17 se muestra la variación de MDA, en las distintas fases del experimento, en la porción media del intestino delgado.

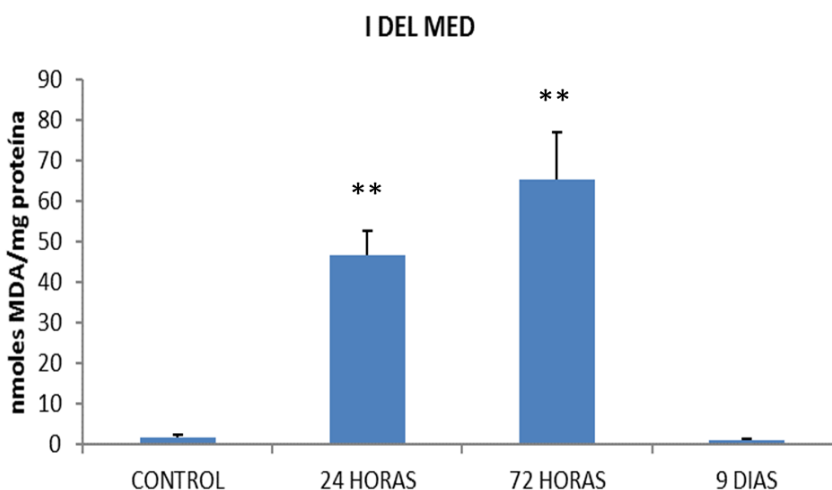


Figura R17. Variación de la cantidad de MDA (nmoles/mg proteína) en el intestino delgado medio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; ** $\leq 0,01$.

A las 24 horas hay un aumento significativo de la cantidad de MDA respecto al control. A las 72 horas, también hay un aumento significativo respecto al control y la cantidad de MDA es superior a la de las 24 horas. Pero transcurridos 9 días la cantidad de MDA en la porción media del intestino delgado es muy parecida a la de la fase control.

En la parte distal del intestino delgado (Figura 18) hay un incremento significativo respecto al control de la cantidad de MDA. También hay un incremento significativo a las 72 horas, e incluso en esta fase la cantidad de MDA es superior a la cantidad que encontramos a las 24 horas del inicio del tratamiento. Después de 9 días del inicio del tratamiento la cantidad de MDA de la porción distal del intestino delgado es prácticamente la misma que en la fase control.

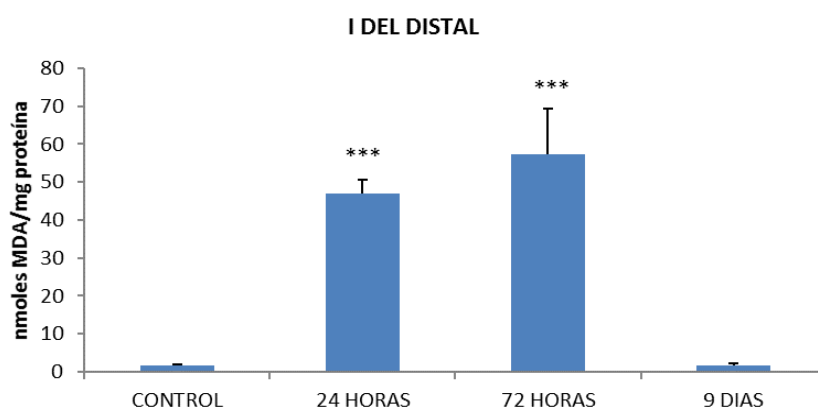


Figura R18. Variación de la cantidad de MDA (nmoles/mg proteína) en el intestino delgado distal. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$.

Para poder visualizar mejor los cambios experimentados en la concentración de MDA como consecuencia del tratamiento con nigrina b, hemos representado todos los valores del intestino delgado en la figura R19.

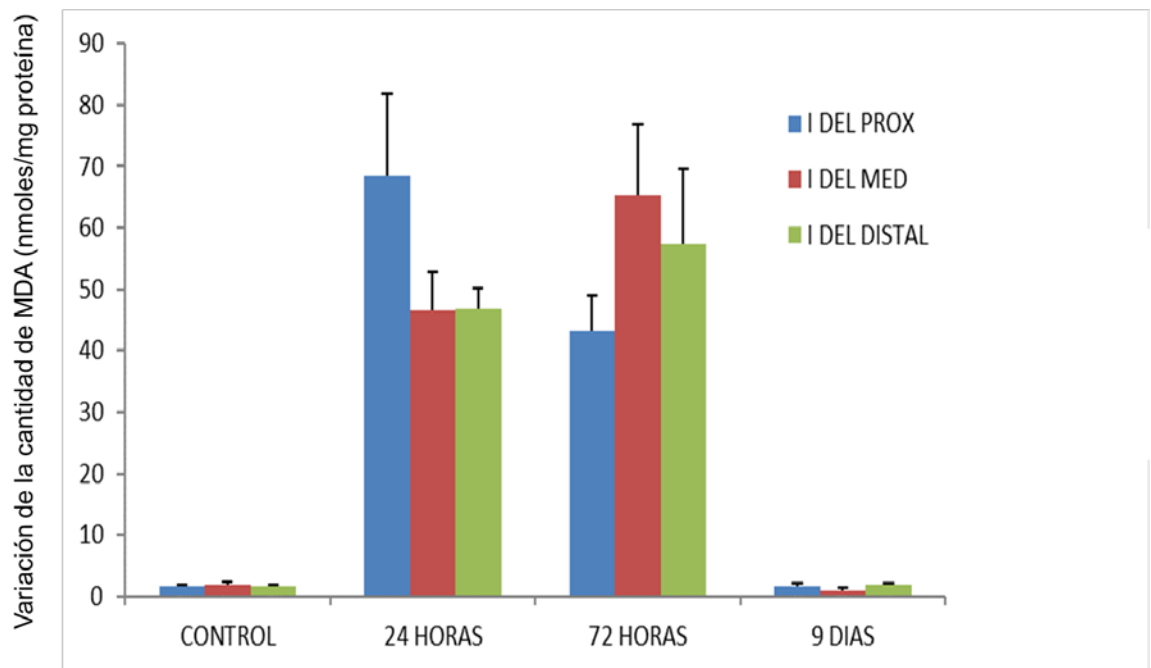


Figura R19. Datos agrupados de la variación de la cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en las tres porciones del intestino delgado, para cada una de las fases del estudio.

4.4.3. Enzimas antioxidantes.

4.4.3.1. Catalasa.

En la figura R20 podemos observar la actividad catalasa en diferentes órganos para ratones que no han tenido ningún tratamiento. Encontramos que el hígado es el órgano en el que esta enzima presenta una mayor actividad, seguido del riñón. La actividad en el intestino delgado es la menor de todas, y dentro de éste la porción correspondiente a la parte proximal es la que presenta una menor actividad de esta enzima.

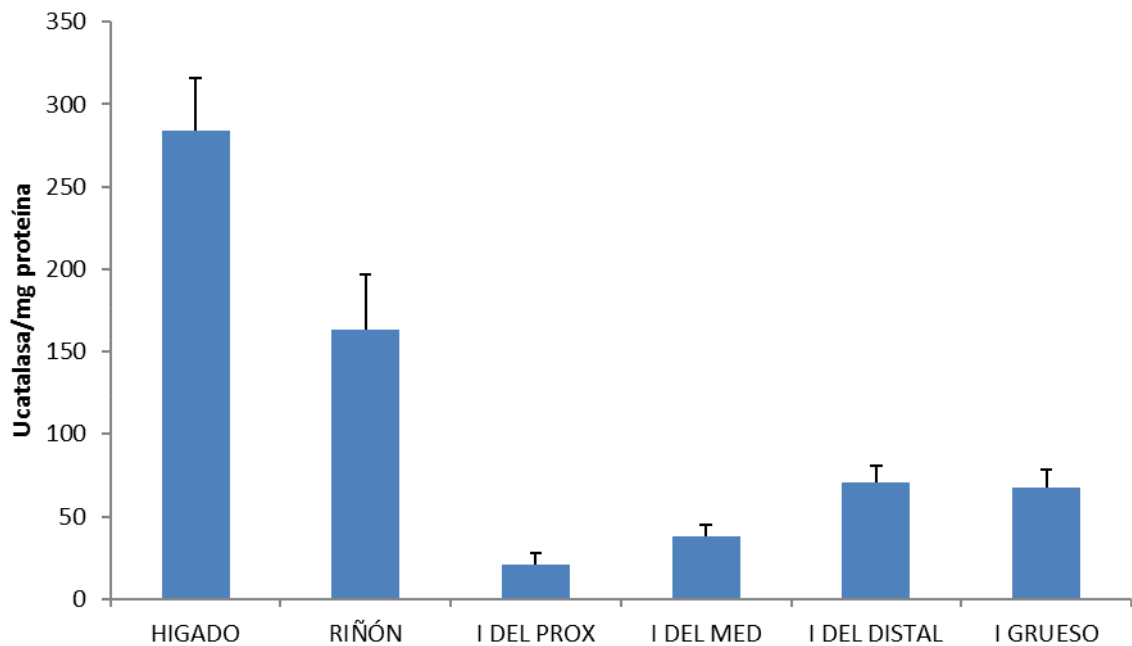


Figura R20. Actividad de la catalasa en diferentes órganos antes de iniciar el tratamiento.

La actividad de la enzima catalasa, en los diferentes órganos, transcurridas 24 horas del inicio del tratamiento sigue la misma dinámica que para la fase control. Encontramos que el hígado continúa siendo el órgano con mayor actividad y la parte proximal del intestino delgado la de menor actividad, esto lo podemos observar en la figura R21.

La figura R22 nos muestra la actividad de la catalasa en los órganos estudiados transcurridas 72 horas desde la inyección de nigrina b. El hígado es el órgano que presenta una mayor actividad, seguido del riñón. La parte proximal del intestino delgado es la que presenta una menor actividad de la enzima. Además se observa que la actividad enzimática del intestino grueso es menor que la de la zona distal del intestino delgado, mientras que a las 24 horas ocurría lo contrario.

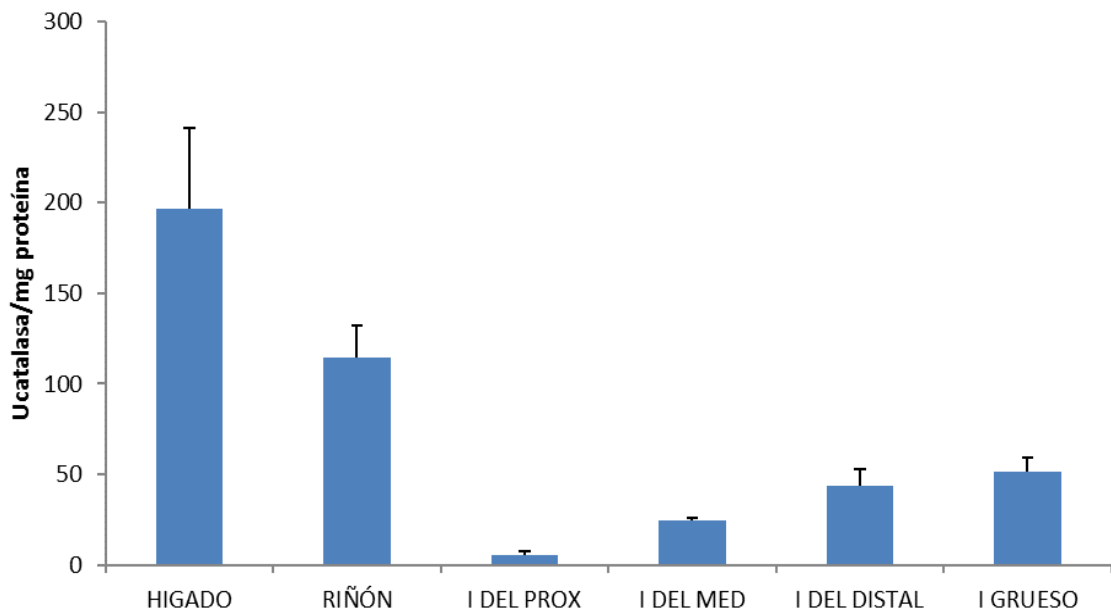


Figura R21. Actividad de la catalasa en diferentes órganos transcurridas 24 horas de la inyección de nigrina.

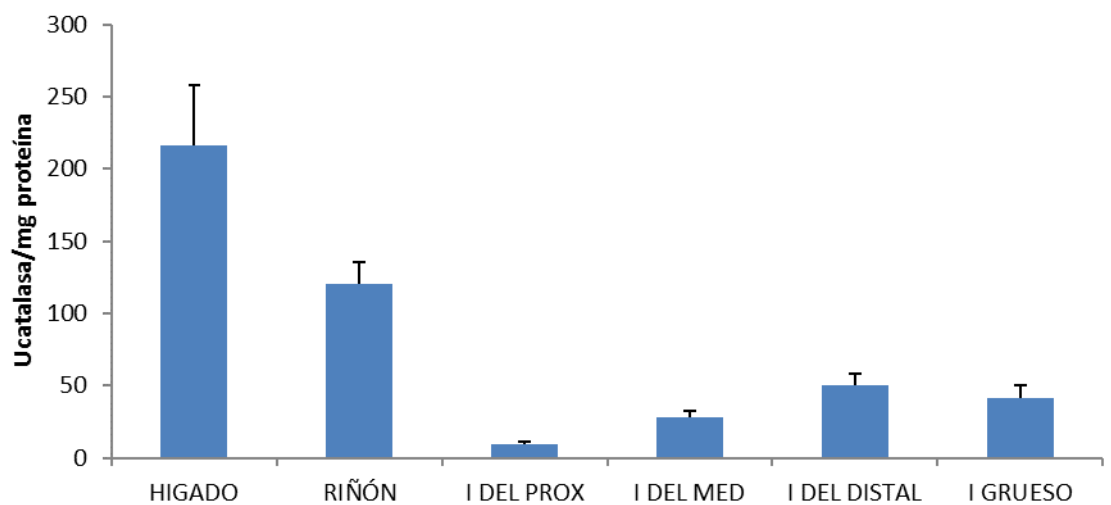


Figura R22. Actividad de la catalasa en diferentes órganos, transcurridas 72 horas desde la inyección de nigrina b.

Quando han transcurrido 9 días desde el inicio del tratamiento (Figura R23) observamos que el hígado continúa siendo el órgano con una mayor actividad de la catalasa, seguido del riñón. Las diferencias en la actividad de

la enzima entre las tres partes del intestino delgado son menores que en las fases anteriores, y también la diferencia con la actividad que presenta el riñón. En el caso del intestino grueso, la actividad de la catalasa es inferior que la de cualquiera de las porciones del intestino delgado.

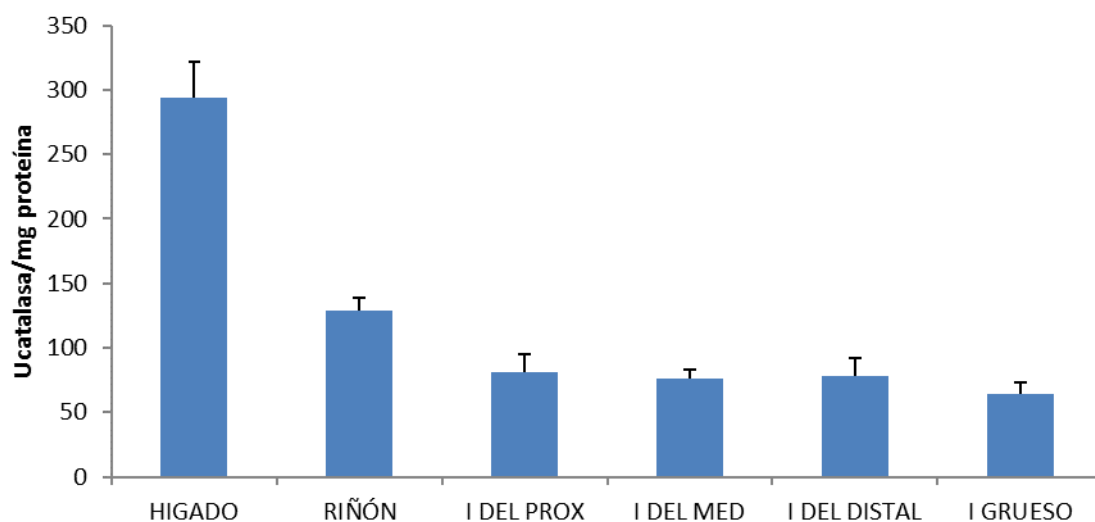


Figura R23. Actividad de la catalasa en diferentes órganos transcurridos 9 días desde la inyección de nigrina b.

En la figura R24 está representada la actividad de la catalasa en las distintas fases del experimento del hígado y del riñón. En el hígado hay una disminución estadísticamente significativa, respecto a la fase control, de la actividad de la catalasa cuando han transcurrido 24 horas de la inyección de nigrina b. A las 72 horas también la actividad es menor significativamente respecto al control aunque empieza a aumentar. Cuando han pasado 9 días la actividad enzimática es prácticamente la misma que la de la fase control. En la misma figura también encontramos la actividad enzimática en el riñón, en las diferentes fases del estudio. Tanto a las 24 horas, como a las 72 horas y a los 9 días hay una disminución significativa de la actividad enzimática.

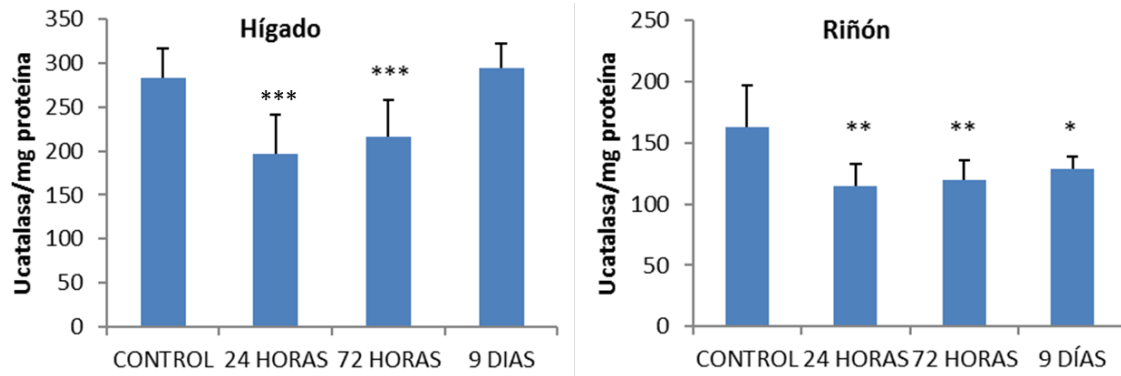


Figura R24. Actividad de la catalasa en el hígado y riñón durante las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$; ** $\leq 0,01$; * $\leq 0,05$.

Respecto al intestino proximal, como puede observarse en la Figura R25 se produce una disminución significativa a las 24 horas y a las 72 horas del inicio del tratamiento, respecto al control. También se puede observar un aumento significativo respecto al control transcurridos 9 días del inicio del tratamiento.

En la parte media del intestino delgado, la actividad de la catalasa disminuye significativamente, respecto al control, transcurridas 24 horas y 72 horas de la inyección de nigrina b. En cambio se observa un aumento de la actividad, respecto al control, cuando han transcurrido 9 días (Figura R25).

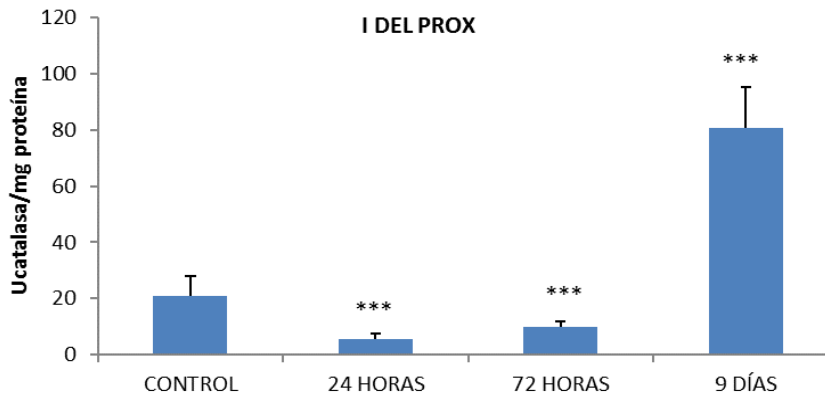


Figura R25. Actividad de la catalasa en el intestino delgado próximo.
Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$.

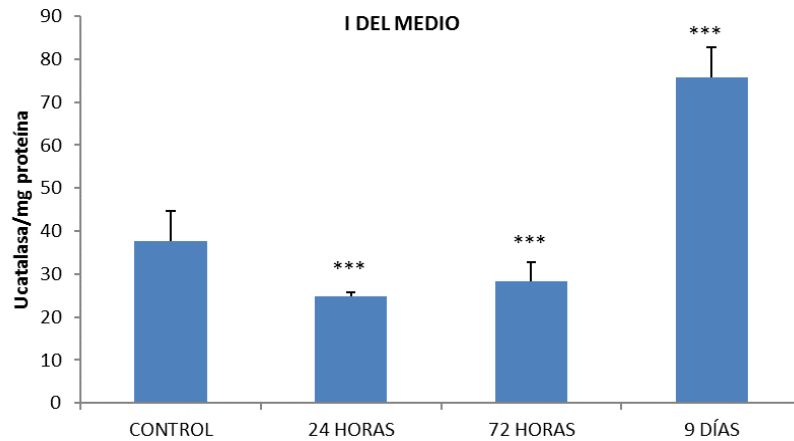


Figura R26. Actividad de la catalasa en el intestino delgado medio.
Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$.

En la figura R27 vemos la actividad de la catalasa en la zona distal del intestino delgado. Hay una disminución significativa, respecto al control, a las 24 horas y 72 horas del inicio del tratamiento. A los 9 días de la inyección la actividad de la catalasa ha aumentado y es prácticamente igual que la de los animales que no han tenido ningún tratamiento.

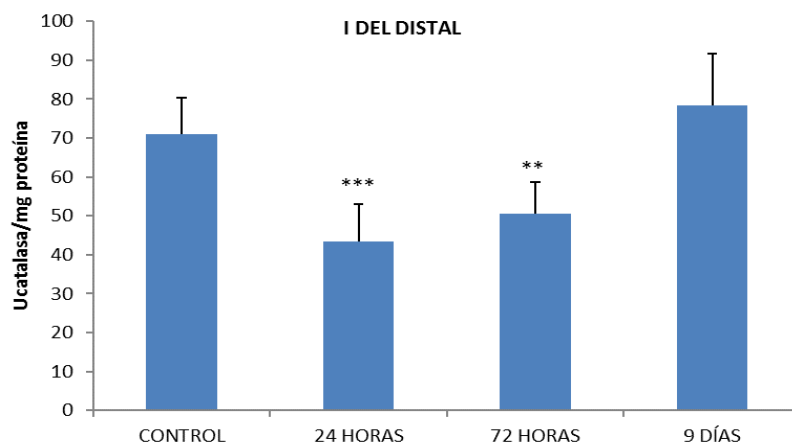


Figura R27. Actividad de la catalasa en el intestino delgado distal.

Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$; ** $\leq 0,01$.

La actividad de la catalasa, respecto al control, en el intestino grueso, disminuye significativamente a las 24 horas del inicio del tratamiento y aún disminuye algo más a las 72 horas. A los 9 días la actividad de la catalasa es prácticamente igual que en la fase control (Figura R28)

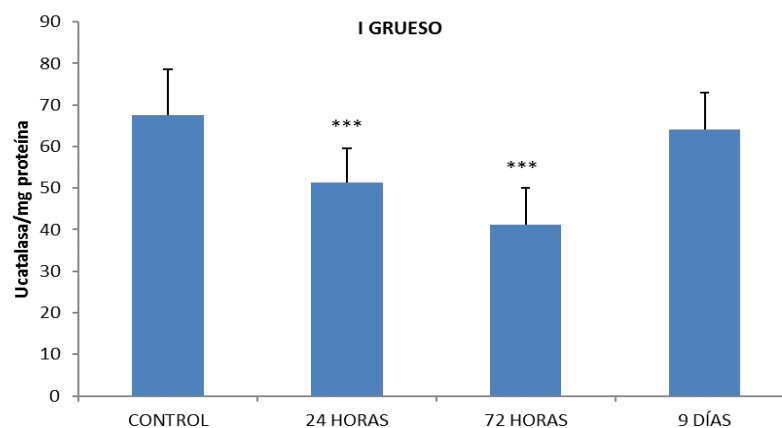


Figura R28. Actividad de la catalasa en el intestino grueso. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$.

4.4.3.2. SUPERÓXIDO DISMUTASA.

La actividad de la SOD se expresará en U SOD/mg proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima requerida para producir la inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción de detector utilizado (Nitroazul de Tetrazolio) a 25°C.

En la figura R29 se muestra la actividad de la enzima SOD en ratones que no han tenido ningún tratamiento. Se puede observar que el riñón es el órgano que presenta una mayor actividad seguido del hígado. En el intestino grueso la actividad enzimática es superior que la del intestino delgado.

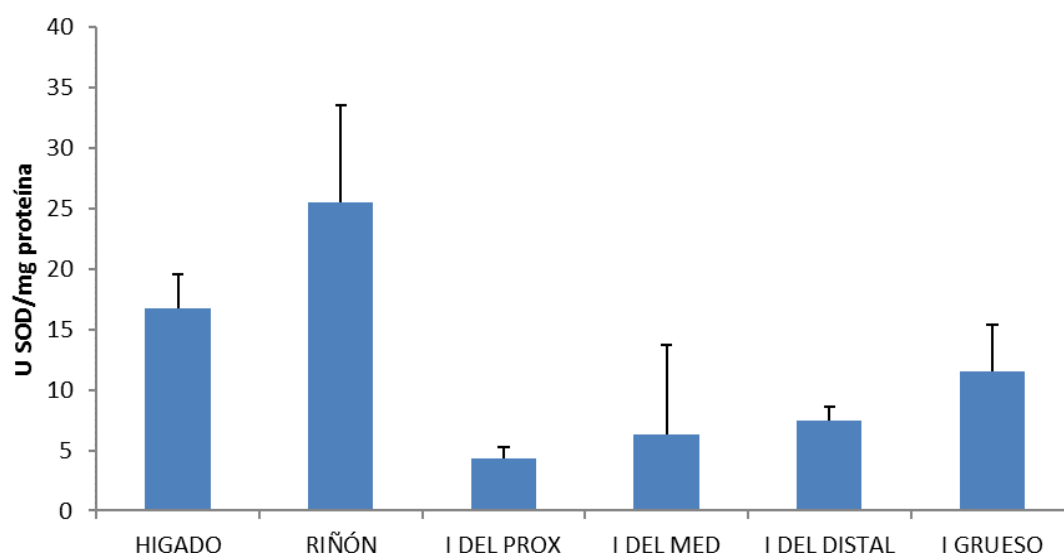


Figura R29. Actividad de la SOD en diferentes órganos en animales antes del tratamiento.

Cuando han transcurrido 24 horas desde el inicio del tratamiento la actividad enzimática ha variado en cada uno de los órganos. El órgano con mayor actividad continúa siendo el riñón, aunque ahora hay menor diferencia con el hígado. En el intestino grueso la actividad enzimática sigue siendo superior a la del intestino delgado (Figura R30).

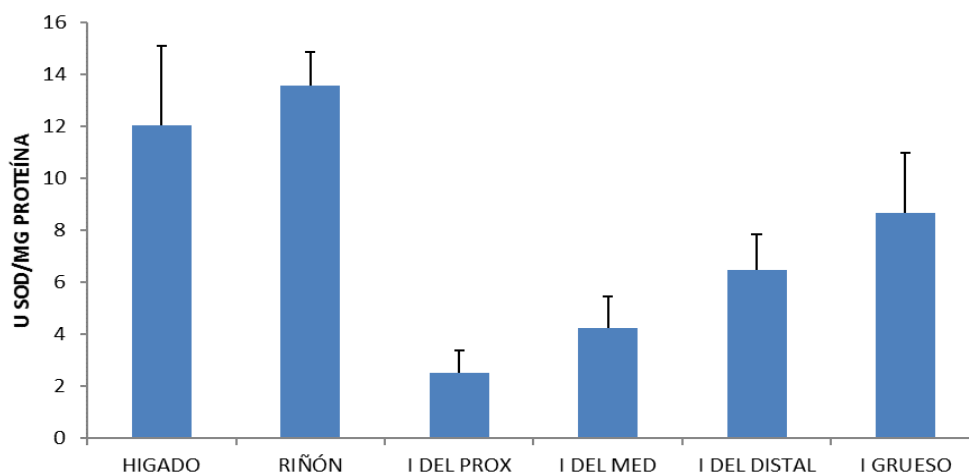


Figura R30. Actividad de la SOD en diferentes órganos a las 24 horas del inicio del tratamiento.

En la figura R31 se muestra la actividad enzimática cuando han transcurrido 72 horas desde el inicio del tratamiento. Se puede observar que la actividad enzimática en hígado y riñón es prácticamente la misma.

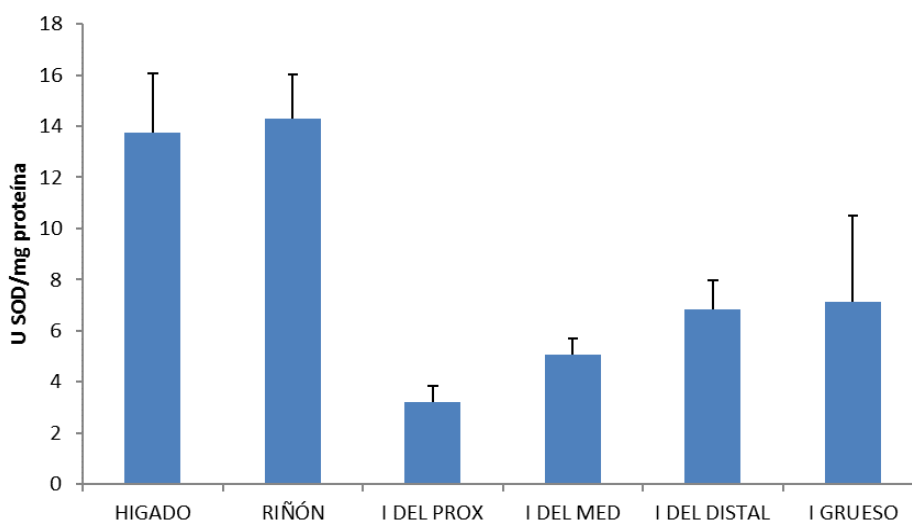


Figura R31. Actividad de la SOD en diferentes órganos a las 72 horas del inicio del tratamiento.

En la figura R32 está representada la actividad enzimática cuando ya han transcurrido 9 días desde el inicio del tratamiento. El riñón continúa

siendo el órgano con mayor actividad enzimática y el intestino grueso presenta mayor actividad que el intestino delgado.

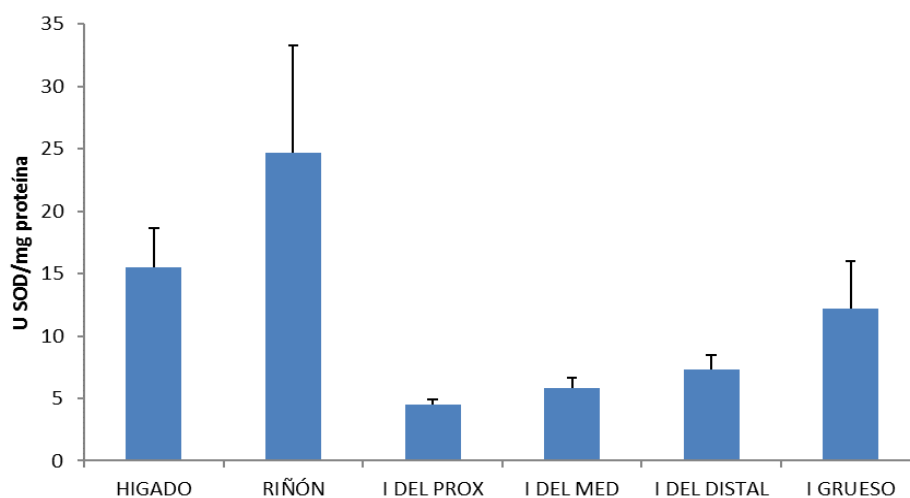


Figura R32. Actividad de la SOD en diferentes órganos a los 9 días del inicio del tratamiento.

En la figura R33 aparece la actividad de la SOD en hígado y riñón en las distintas fases del estudio.

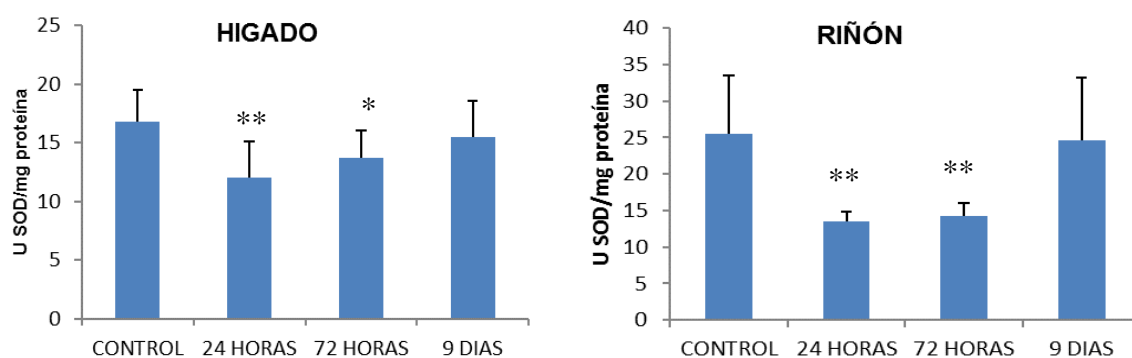


Figura R33. Actividad enzimática de la SOD en hígado y riñón.

Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; ** $\leq 0,01$; * $\leq 0,05$.

Para ambos órganos se observa una disminución a las 24 horas y a las 72 horas que es estadísticamente significativa respecto a la fase control. También se observa que transcurridos 9 días desde que se inyectó la nigrina b, las actividades de esta enzima se han recuperado para ambos órganos.

En la parte proximal del intestino delgado, se puede observar una disminución significativa, respecto a la fase control, de la actividad enzimática una vez que han transcurrido 24 horas y 72 horas desde el inicio del tratamiento (Figura 34). Cuando llega el noveno día tras la inyección de nigrina b, la actividad enzimática aumenta respecto a las dos fases anteriores y llega a ser prácticamente la misma que en la fase control.

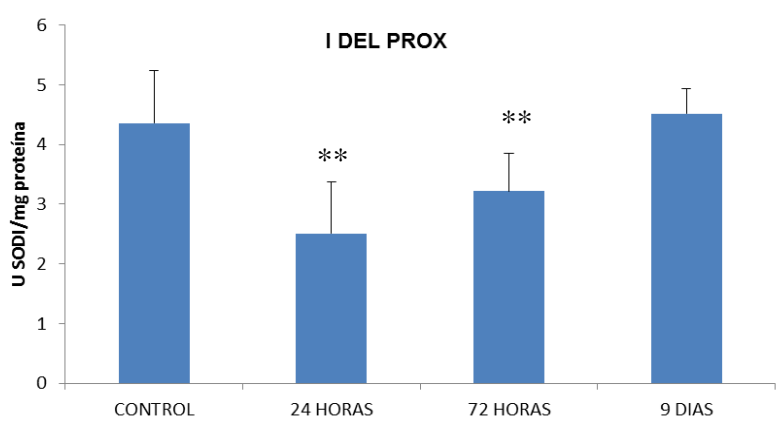


Figura R34. Actividad de la SOD en el intestino delgado próximo en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; ** $\leq 0,01$.

En cuanto al intestino delgado medio en la figura R35 se pueden comprobar las variaciones de la actividad enzimática. A las 24 horas hay una disminución significativa de la actividad enzimática respecto a la fase control. Lo mismo ocurre a las 72 horas de la inyección, también hay una disminución significativa respecto al control pero menor que en el caso

anterior. A los 9 días del inicio del tratamiento la actividad de la SOD es prácticamente la misma que en la fase control.

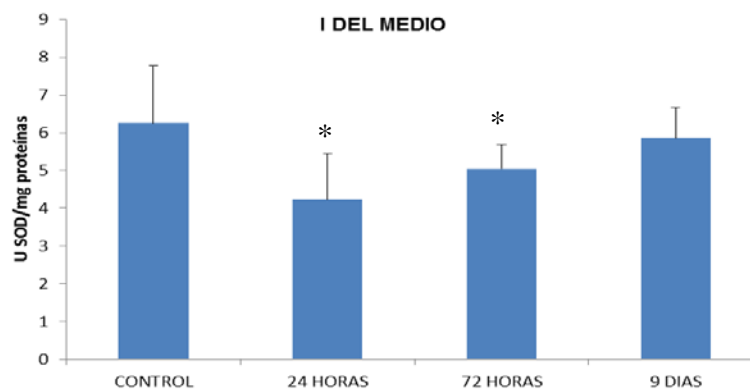


Figura R35. Actividad de la SOD en el intestino delgado medio en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; * $\leq 0,05$.

En la figura R36 se muestra la actividad de la SOD en la sección distal del intestino delgado en las diferentes fases del experimento.

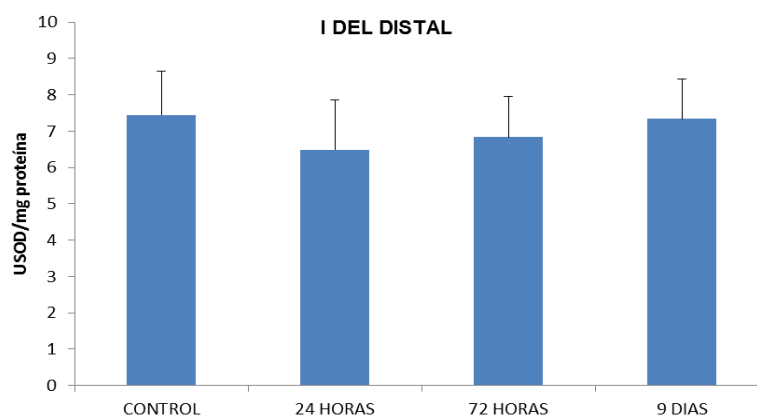


Figura R36. Actividad de la SOD en el intestino delgado distal en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; diferencias no significativas.

En este caso se puede observar una ligera disminución de la actividad, respecto al control, a las 24 horas y a las 72 horas del inicio del tratamiento,

pero no son significativas. Transcurridos 9 días del inicio del tratamiento la actividad de la SOD es prácticamente igual que la del control.

En cuanto a la actividad de la SOD en el intestino grueso la podemos observar en la figura R37. En esta ocasión disminuye la actividad enzimática a las 24 horas del inicio del tratamiento, respecto al control, y a las 72 horas esta disminución, respecto a la fase control, la disminución es significativa. A los 9 días del inicio del tratamiento la actividad de la enzima es ligeramente superior que en la fase control.

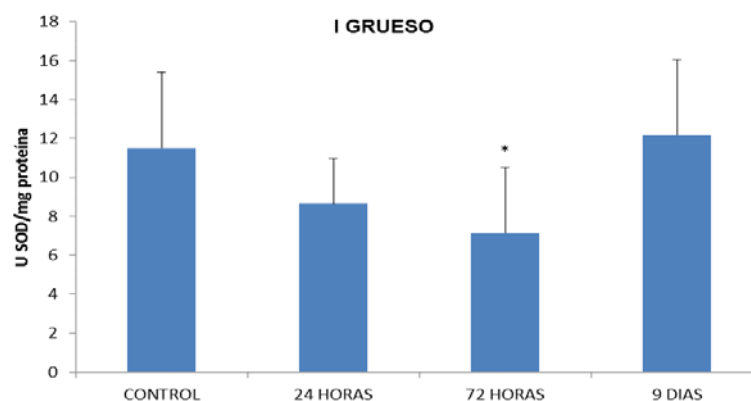


Figura R37. Actividad de la SOD en el intestino delgado distal en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; * $\leq 0,05$.

4.4.3.3. Glutation peroxidasa (GSH-Px).

La actividad de la GSH-Px se expresará en U ml/mg proteína. En la figura R38 se muestra la actividad de la enzima en ratones antes del tratamiento. Se puede observar que el hígado es el órgano que presenta una mayor actividad seguido del riñón. En el intestino delgado proximal la actividad enzimática es superior que la del intestino grueso.

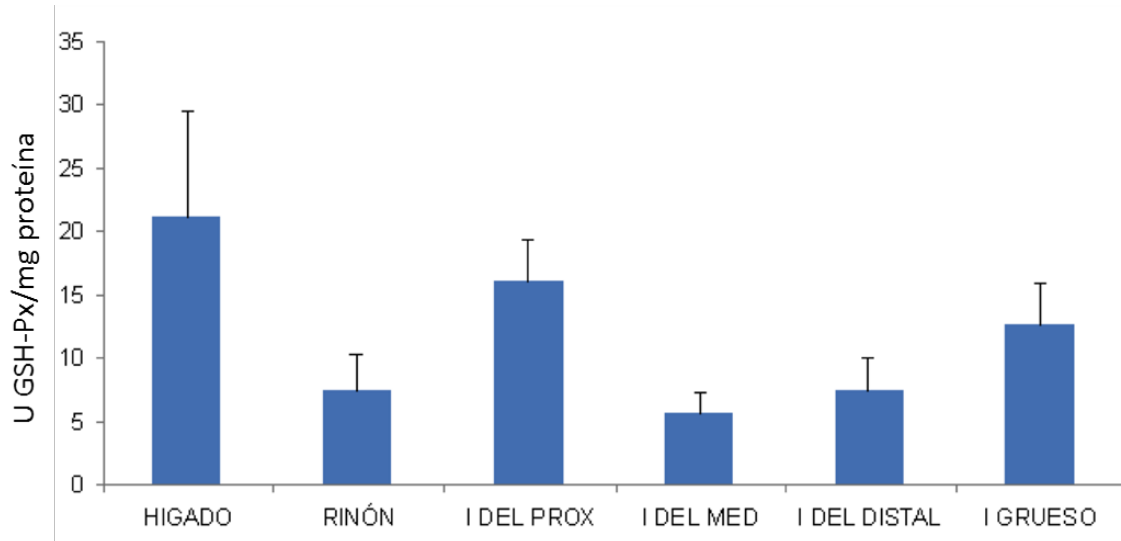


Figura R38. Actividad de la GSH-Px en diferentes órganos en animales antes del tratamiento.

Cuando han transcurrido 24 horas desde el inicio del tratamiento la actividad enzimática ha variado en cada uno de los órganos (Figura 39). El órgano con mayor actividad continúa siendo el hígado. En el intestino grueso la actividad enzimática es ya superior a la del intestino delgado.

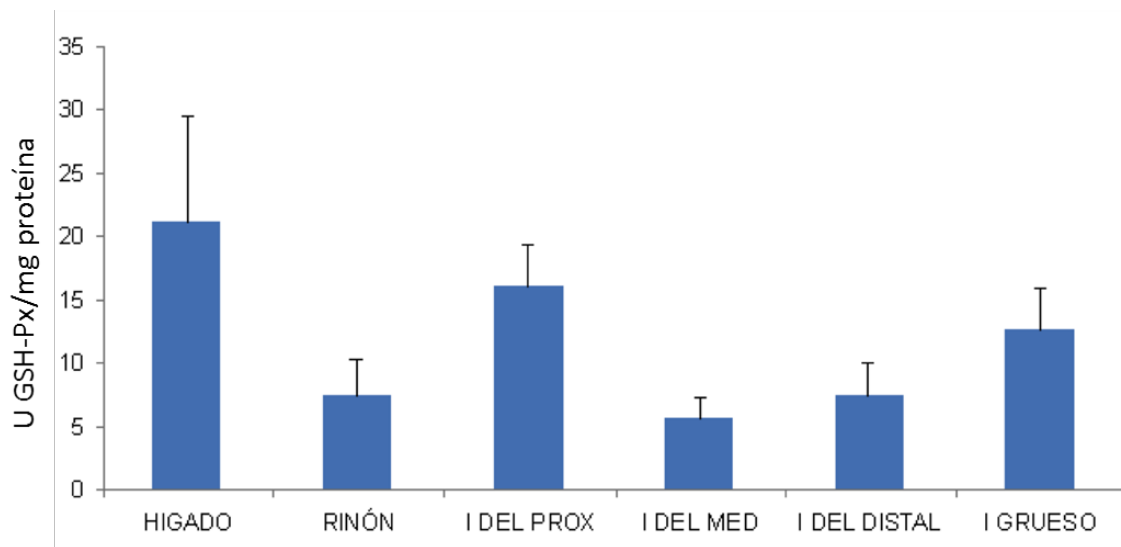


Figura R39. Actividad de la GSH-Px en diferentes órganos a las 24 horas del inicio del tratamiento.

En la figura R40 se muestra la actividad enzimática cuando han transcurrido 72 horas desde el inicio del tratamiento. El perfil hígado riñón se mantiene, y la actividad enzimática del intestino grueso es ligeramente superior a la del intestino delgado proximal.

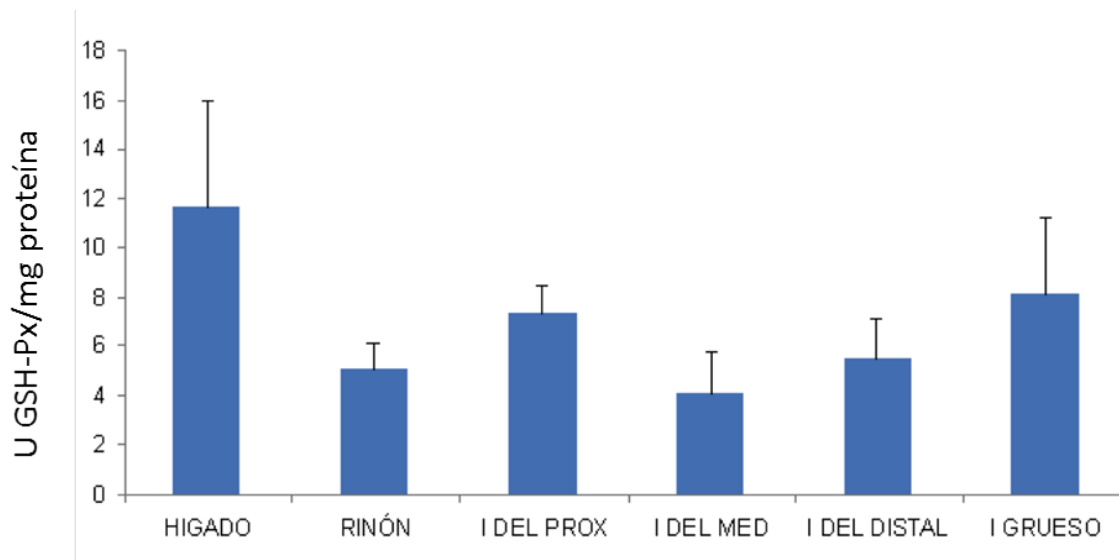


Figura R40. Actividad de la GSH-Px en diferentes órganos a las 72 horas del inicio del tratamiento.

En la figura R41 está representada la actividad enzimática cuando ya han transcurrido 9 días desde el inicio del tratamiento.

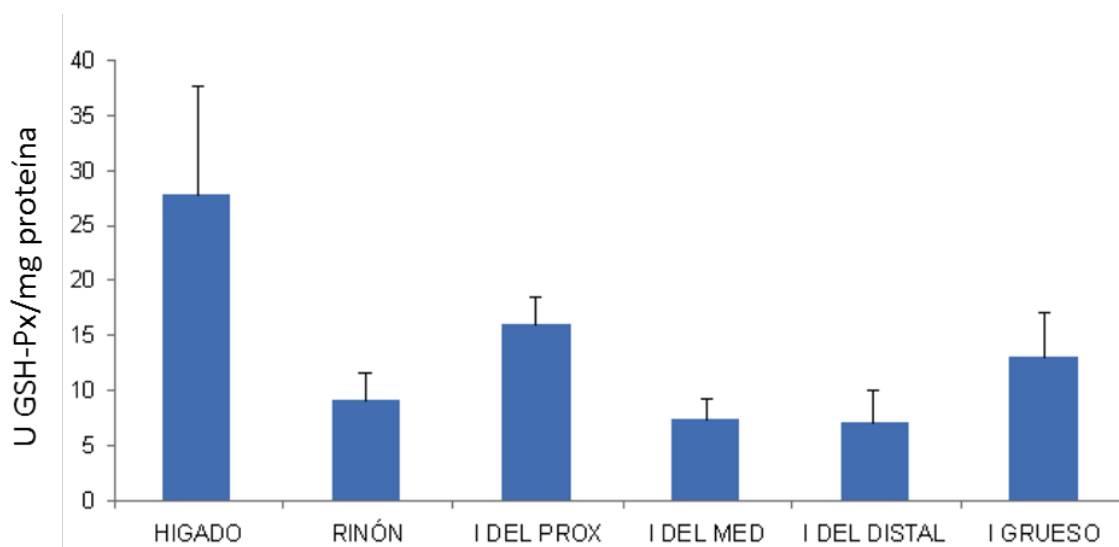


Figura R41. Actividad de la GSH-Px en diferentes órganos a los 9 días del inicio del tratamiento.

El hígado continúa siendo con mucho el órgano con mayor actividad enzimática y el intestino delgado proximal presenta mayor actividad que el intestino grueso.

A continuación se muestran figuras en las que se verá la variación de la actividad enzimática de cada uno de los órganos manera individualizada y en cada una de las fases del estudio.

En la figura R42 aparece la actividad de la GSH-Px en hígado y riñón en las distintas fases del estudio. Para ambos órganos se observa una disminución a las 24 horas y a las 72 horas que es estadísticamente significativa respecto a la fase control. También se observa que transcurridos 9 días, las actividades de esta enzima se han recuperado para ambos órganos.

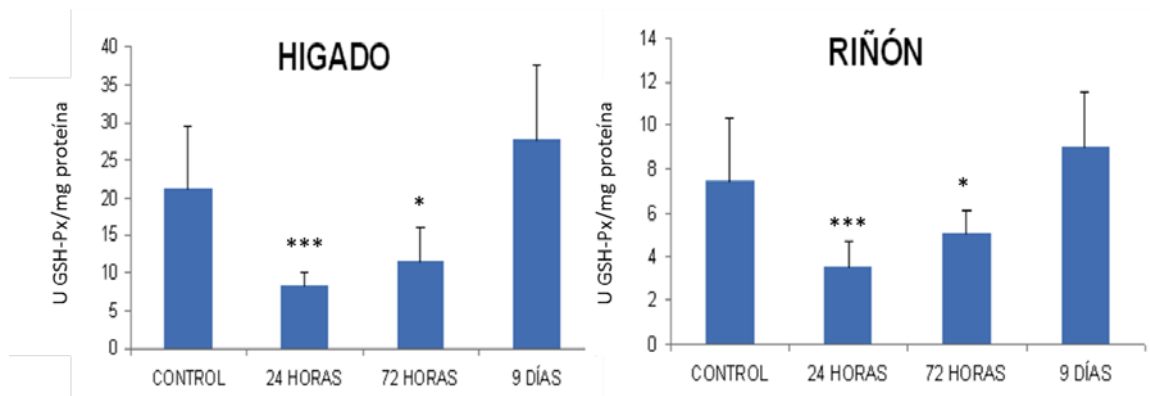


Figura R42. Actividad enzimática de la GSH-Px en hígado y riñón, en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$; * $\leq 0,05$.

En la parte proximal del intestino delgado, se puede observar una disminución significativa, respecto a la fase control, de la actividad enzimática una vez que han transcurrido 24 horas y 72 horas desde el inicio del tratamiento (Figura 43). Cuando llega el noveno día tras la inyección de nigrina b, la actividad enzimática aumenta respecto a las dos fases anteriores y llega a ser prácticamente la misma que en la fase control.

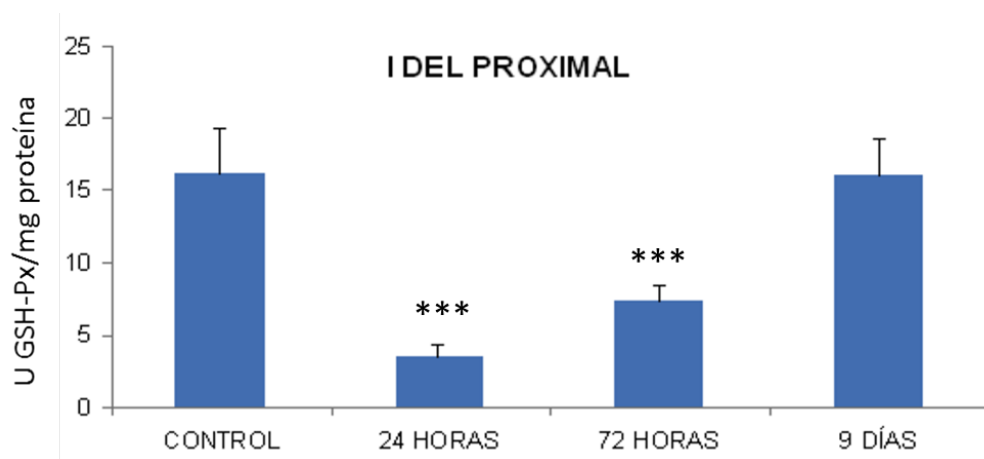


Figura R43. Actividad de la GSH-Px en el intestino delgado proximal en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $\leq 0,001$.

En cuanto al intestino delgado medio en la figura R44 se pueden comprobar las variaciones de la actividad enzimática. A las 24 horas hay una disminución significativa de la actividad enzimática respecto al control.

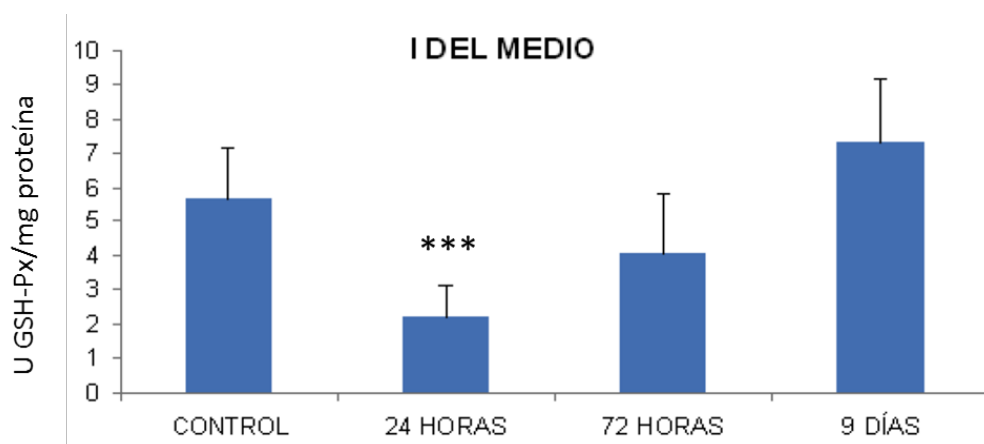


Figura R44. Actividad de la GSH-Px en el intestino delgado medio en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $p < 0,01$.

Lo mismo ocurre a las 72 horas de la inyección, también hay una disminución significativa respecto al control pero menor que en el caso anterior. A los 9 días del inicio del tratamiento la actividad de la GSH-Px es prácticamente la misma que en la fase control.

En la figura R45 se muestra la actividad de la GSH-Px en la sección distal del intestino delgado en las diferentes fases del experimento. En este caso se puede observar una ligera disminución de la actividad, respecto al control, a las 24 horas y a las 72 horas del inicio del tratamiento. Transcurridos 9 días del inicio del tratamiento la actividad de la GSH-Px es prácticamente igual que la del control.

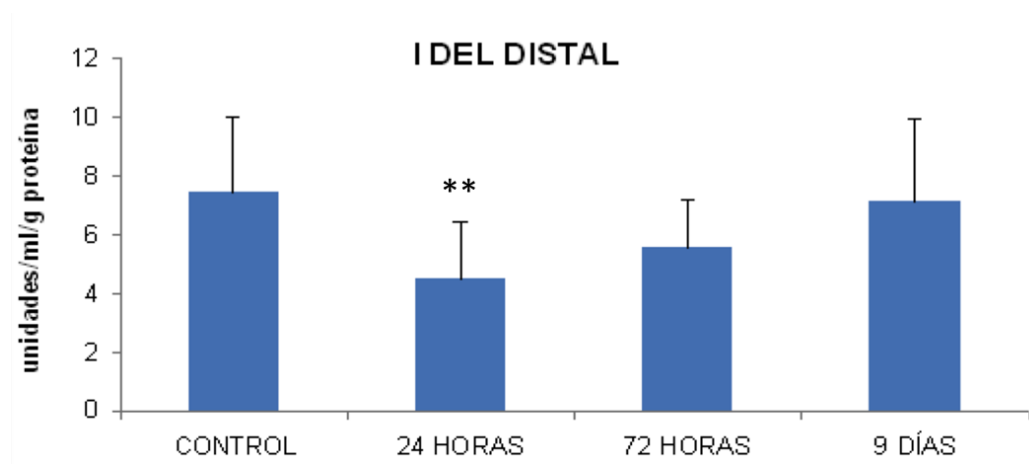


Figura R45. Actividad de la GSH-Px en el intestino delgado distal en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; * $\leq 0,05$.

En cuanto a la actividad de la GSH-Px en el intestino grueso la podemos observar en la figura R46. En este caso disminuye fuertemente la

actividad enzimática a las 24 horas del inicio del tratamiento, respecto al control: A las 72 horas la disminución es menor, y a los 9 días del inicio del tratamiento la actividad de la enzima es prácticamente igual que en el control.

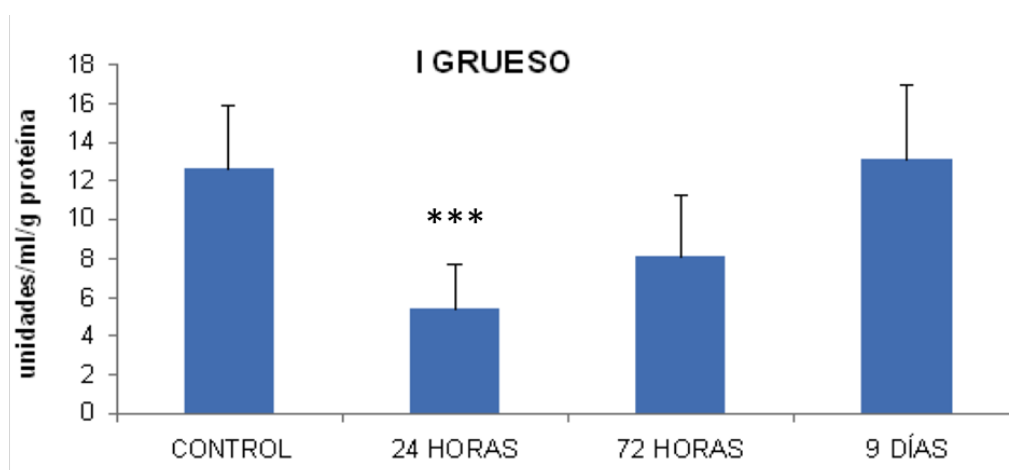


Figura R46. Actividad de la GSH-Px en el intestino grueso en las diferentes fases del estudio. Valores-p según estudio de la t-student: control vs.muestra; *** $p < 0,01$.

4.5. Estudio de la toxicidad en ratones provocada por la administración i.v. de nigrina b.

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

La dosis i.p. subletal de nigrina b que produce la misma toxicidad que la administración de 5 mg/kg de la vía i.v. es 10 mg/kg (Jiménez y cols., 2013; datos no publicados del Prof. Girbés). La administración i.p. 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.

4.5.1. Análisis histológicos.

El análisis histológico de los efectos tóxicos de nigrina b se realizó mediante administración i.p. La administración i.p. 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 y que coincide con los datos publicados previamente (Gayoso y cols., 2005; Jiménez y cols., 2013).

En la figura R47 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).

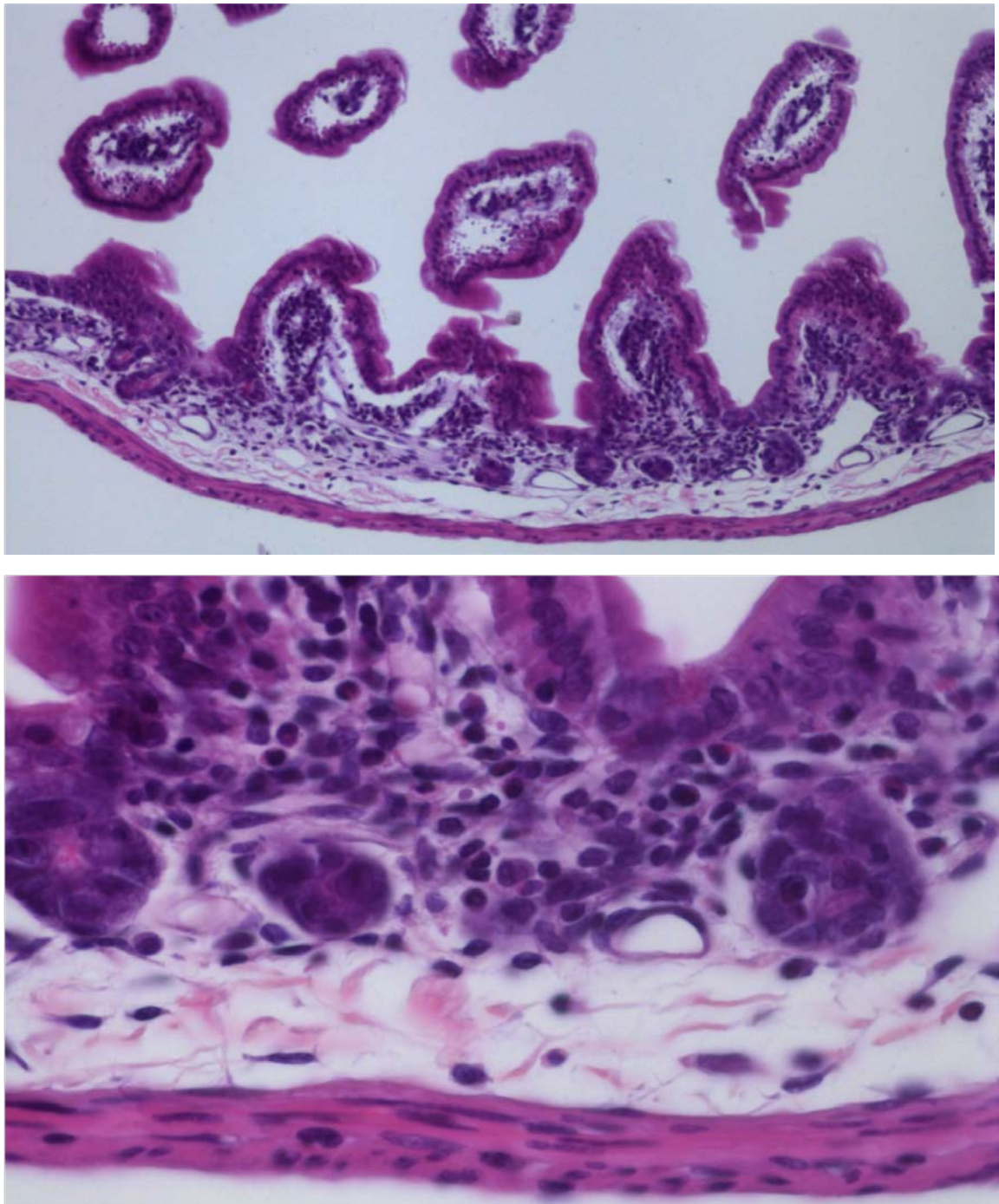


Figura R47. Análisis histológico de los efectos de la administración

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).

El tratamiento con nigrina b conlleva la destrucción de la mayor parte de estas células pero no totalmente, permitiendo que las células remanentes regeneren las criptas con el tiempo y por ello el efecto es reversible.

Por el contrario, los villi muestran una estructura relativamente bien conservada con la disposición característica de enterocitos alineados y distribución cilíndrica (figura R48).

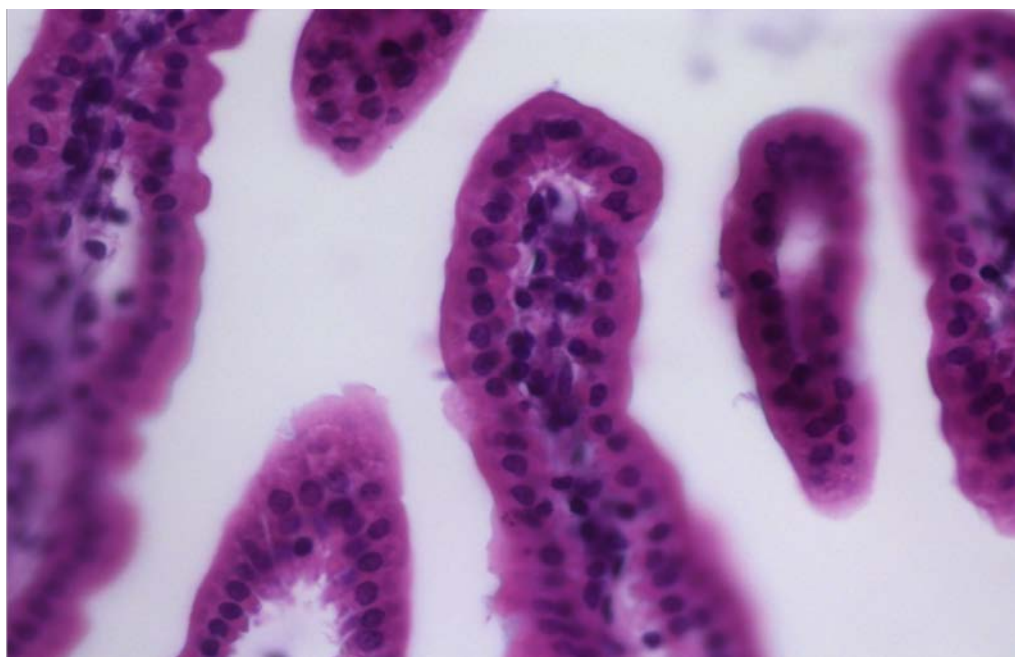


Figura R48. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre los villi (680 aumentos).

Respecto al intestino grueso (figura R49), se observa una estructura poco dañada, pero con algunas apoptosis.

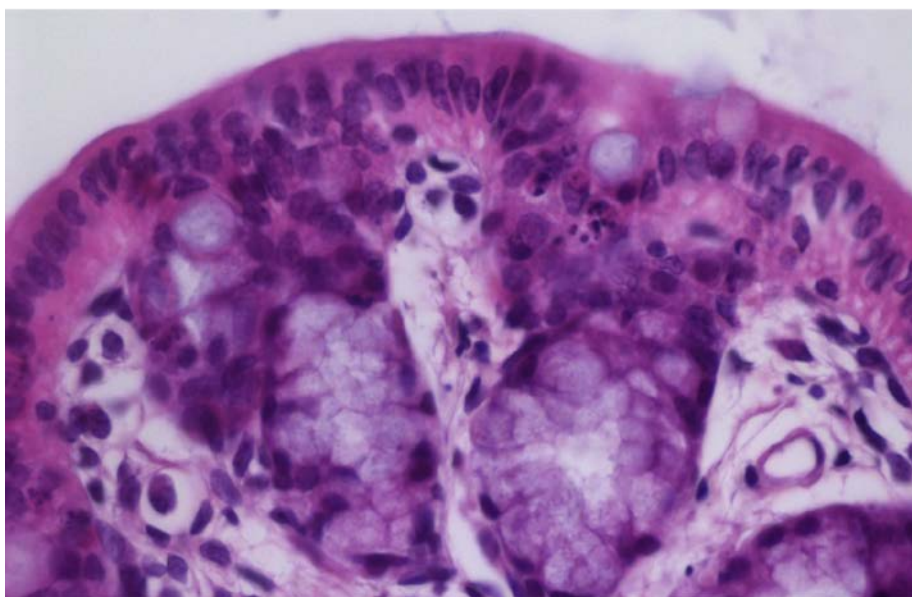


Figura R49. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 24 h sobre el intestino grueso. (680 aumentos).

A las 48 horas después de la administración IP de nigrina 10 mg/kg como puede observarse en la figura R50, 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.

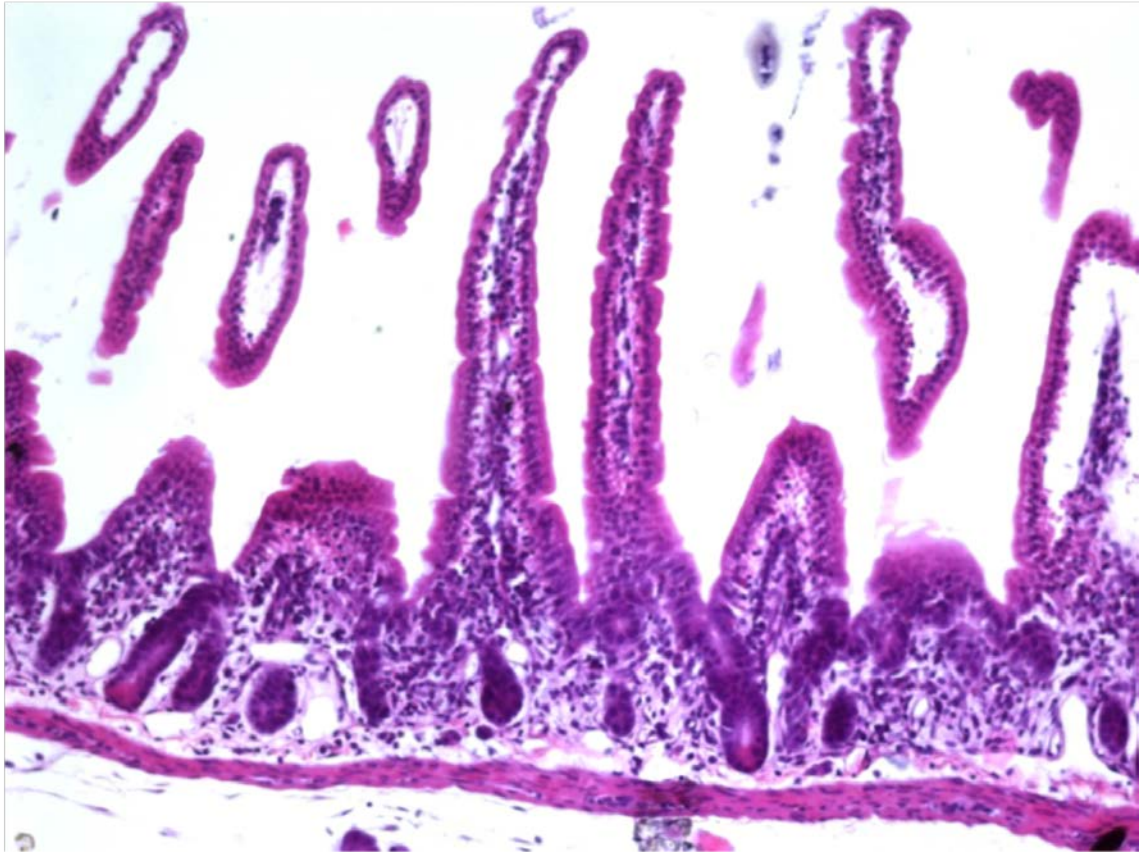


Figura R50. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 48 h sobre el intestino. (170 aumentos).

Respecto al intestino grueso se aprecian apoptosis pero la apariencia en general no es mala, con poca destrucción de tejido (Figura 51).

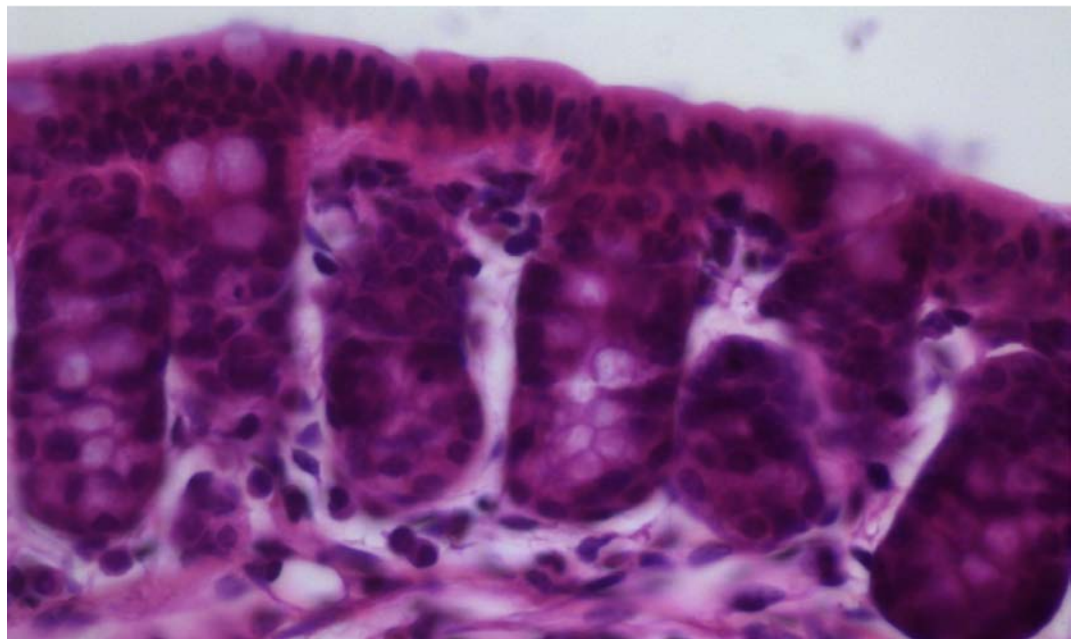
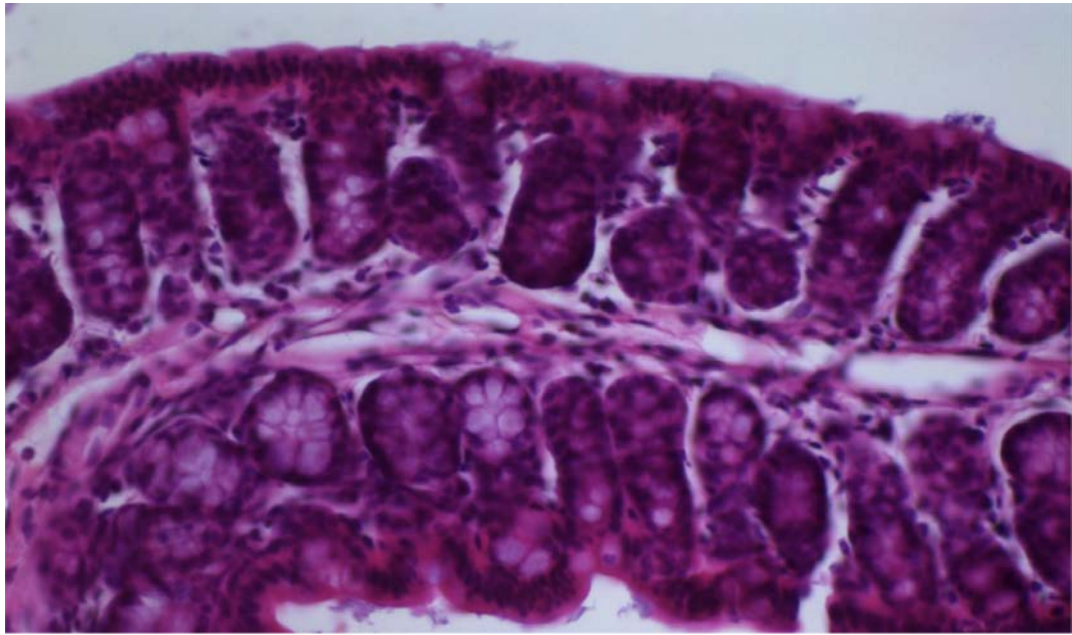


Figura R51. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 48 h sobre el intestino grueso. Parte superior: epitelio del intestino grueso (340 aumentos); parte inferior: detalle de las criptas (680 aumentos).

Como puede verse en la figura R52 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 (Gayoso y cols., 2005; Jiménez y cols., 2013).

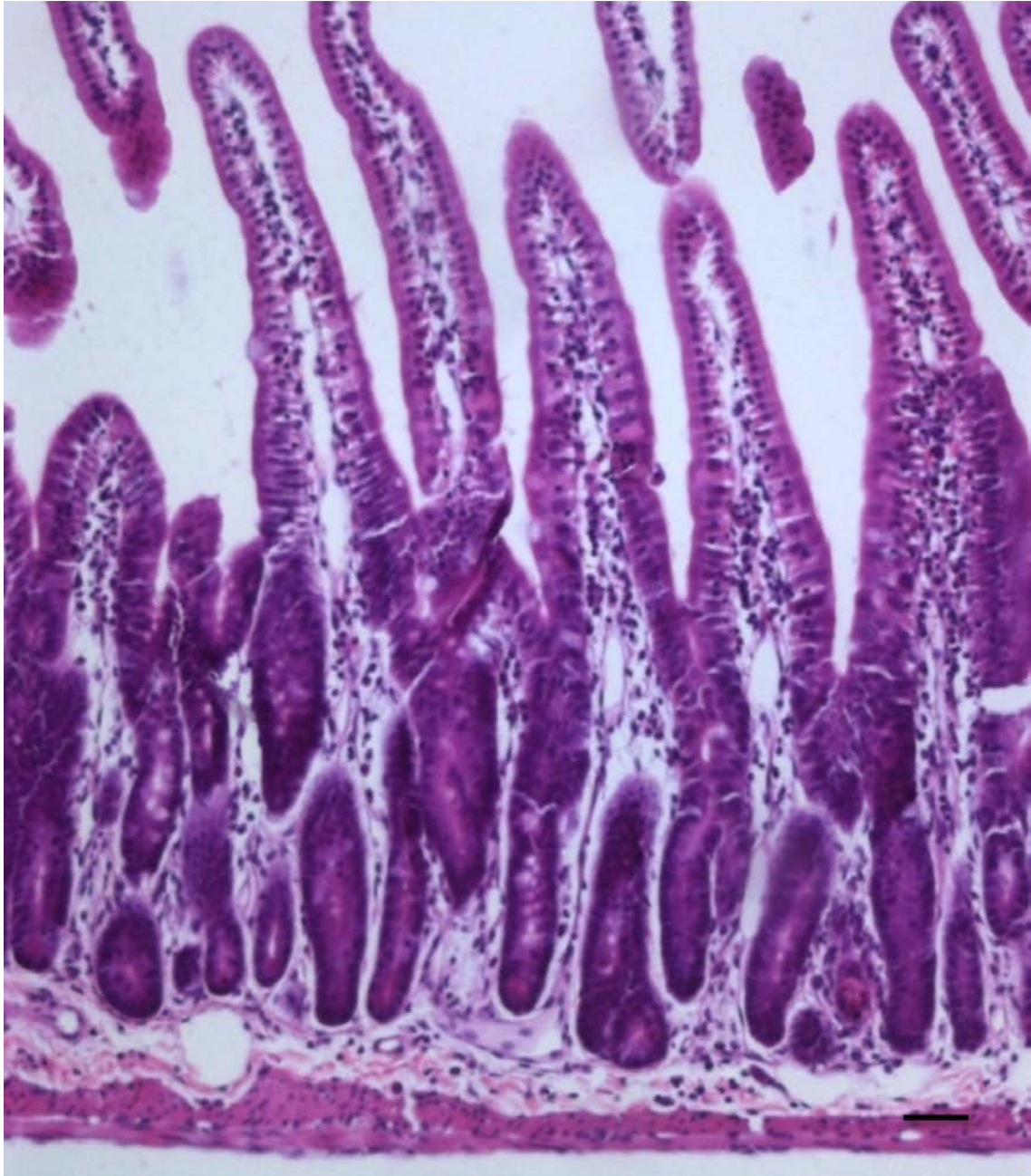


Figura R52. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal después de 72 h sobre el intestino delgado. Vista general de criptas y villi (450 aumentos).

El aspecto del intestino grueso muestra también una disposición normal con criptas alargadas y bien constituidas (Figura 53). No obstante, se observa alguna apoptosis que pudiera ser resultado de una actividad fisiológica de recambio.

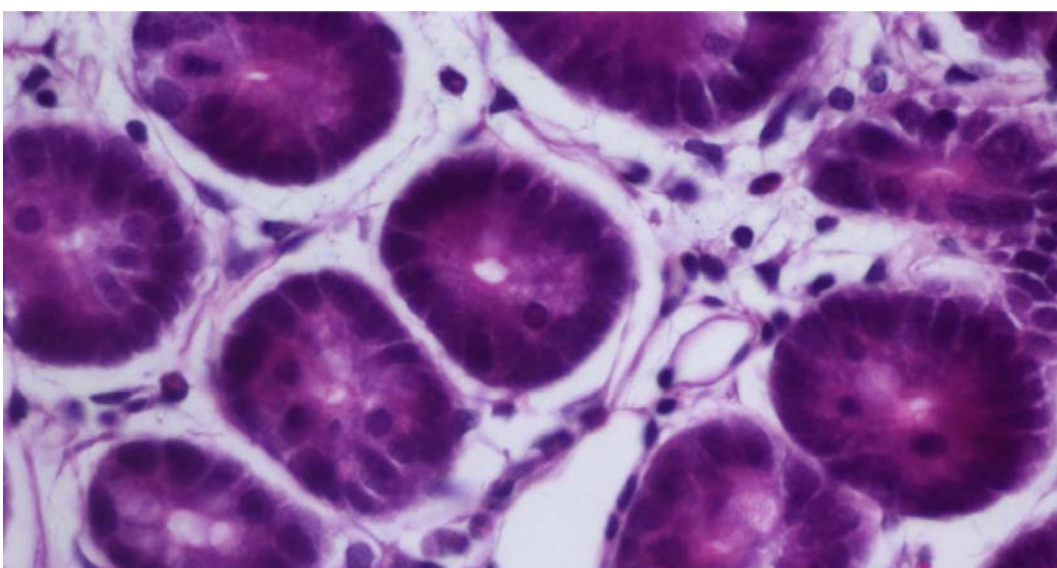
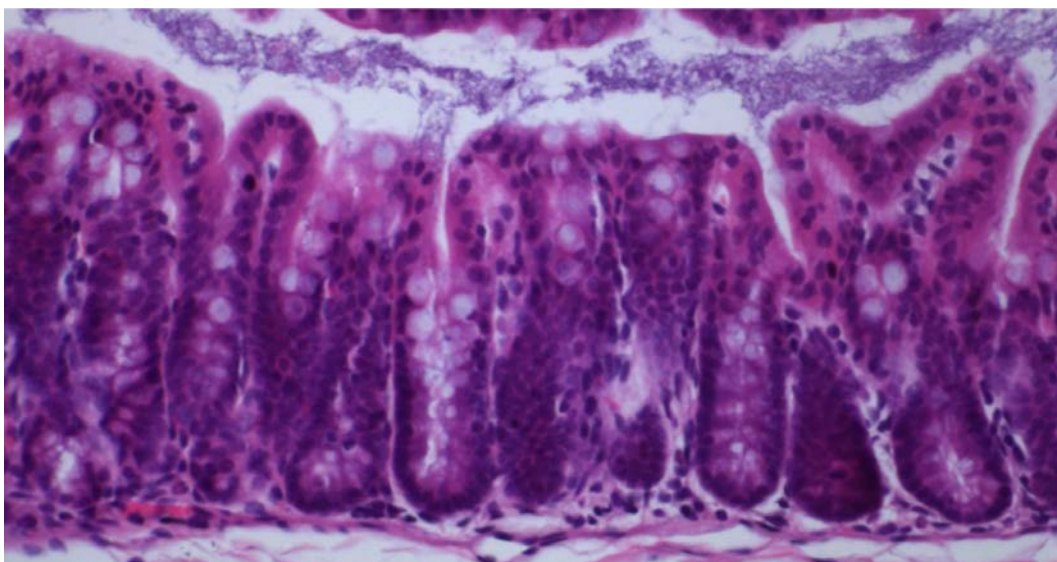


Figura R53. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b 10 mg/kg de peso corporal sobre el intestino grueso después de 72 h longitudinal (340 aumentos); parte inferior: detalle de las criptas en corte en sección (680 aumentos).

5. DISCUSIÓN.

El análisis histológico de los tejidos de ratones Swiss sometidos a tratamiento con dosis subletales de nigrina b revela que se producen cambios morfológicos notables en los intestinos que son más prominentes en el intestino delgado (Gayoso y cols., 2005; Jiménez y cols., 2013; Jiménez y cols., 2014). Este efecto de nigrina b es reversible y dependiente de la dosis administrada.

La dosis de nigrina b a utilizar para obtener los efectos intestinales deseados es diferente en función de la vía de administración. Cuando se utiliza la vía intravenosa la dosis subletal elegida para observar el efecto tóxico reversible es de 5 mg/kg, mientras que para obtener el mismo efecto por la vía intraperitoneal la dosis subletal es de 10 mg/kg (Gayoso y cols., 2005; Jiménez y cols., 2013). En ambos casos se observan alteraciones importantes a las 24 horas de la administración, pero posteriormente el epitelio se recupera de manera que la recuperación total tiene lugar a partir de los nueve días.

Después de 24 horas tras la administración de nigrina b hay una importante destrucción de las criptas de Lieberkühn lo que provoca una atrofia del epitelio intestinal. Se comprueba la destrucción de la mayor parte, pero no todas, de las llamadas células “Transit Amplifying Compartment” o TAC (Gayoso y cols., 2005; Jiménez y cols., 2013). Las células TAC se encuentran en el tercio medio de las criptas y son precursoras de proliferación derivadas directamente de las células madre totipotentes de las criptas (Simons y Clevers., 2011; Potten y cols., 2009). El efecto reversible viene dado por el hecho de que la nigrina b no destruye todas las células APC, las células remanentes pueden regenerar las criptas con el tiempo suficiente. Recientemente se ha demostrado que a concentraciones letales de

nigrina b (16 mg/Kg peso corporal) se afectan también las células de Paneth que se encuentran en el fondo de las criptas de Lieberkühn (Jiménez y cols., 2014b). En cuanto al intestino grueso, aparecen algunas apoptosis pero en general la estructura no está muy dañada.

Transcurridas 48 horas de la administración de nigrina b las criptas del intestino delgado comienzan a recuperarse, son más numerosas y su estructura es más cilíndrica. En cambio los villi aparecen más desestructurados. El intestino grueso, a las 48 horas tras la inyección de nigrina b, presenta una apariencia general parecida a las 24 h.

Transcurridas 72 horas después del tratamiento, las criptas se han regenerado totalmente y son más numerosas y alargadas. En cuanto a los villi también se observa una completa regeneración. El intestino grueso, en esta fase, también presenta una disposición normal, con criptas alargadas y bien constituidas.

Una vez comprobada la recuperación histológica de las células de los intestinos delgado y grueso, es importante comprobar que además se recupera la funcionalidad de esas células. Para ello hemos realizado estudios de absorción de vitaminas y efectos de polifenoles (Jiménez y cols., 2013; Jiménez y cols., 2014) que han llevado a definir los efectos de nigrina b en ratones como un modelo para el estudio de la destrucción-regeneración de los intestinos en el que ensayar distintas funciones biológicas y nutracéuticos.

En el presente trabajo se han complementado los estudios realizados previamente sobre el modelo de nigrina b con el estudio de las

características del modelo, la absorción y acumulación de minerales y la actividad de las enzimas del sistema antioxidante celular.

- **Variación del peso, longitud intestino delgado, cantidad de heces y comida ingerida.**

Los animales han sido tratados con una inyección intravenosa de 5 mg/Kg de nigrina b, esta vía de administración nos garantiza que llegará a todos los tejidos y además el efecto es más rápido que utilizando otras vías. Pero tiene inconvenientes, puesto que el pinchazo es complicado, no siempre se consigue pinchar en la vena sin romperla y puede haber trasvasaciones. De hecho se han realizado estudios con la administración intraperitoneal (Aracil, 2012; Jiménez y cols., 2013), pero en este caso es necesario aumentar la dosis para obtener los mismos resultados (10 mg/Kg). Para asegurarnos que la inyección se ha realizado de manera correcta comprobamos el peso de los animales en cada una de las fases.

Los animales sufren importantes alteraciones en el intestino delgado y grueso (Gayoso y cols., 2005), lo que va a provocar una disminución de peso fundamentalmente a las 24 horas, que es cuando el daño es más acusado (Gayoso y cols., 2005). Teniendo en cuenta que todos los animales a los que se les han inyectado correctamente la dosis de 5 mg/kg de nigrina b sufren una importante disminución de peso, descartaremos aquellos animales que mantengan o incluso incrementen o disminuyan en poca cantidad su peso a las 24 horas de haber sido inyectada la nigrina b.

Encontramos en varios trabajos resultados similares en cuanto a la variación de peso (Cabrero, P.; 2012; Jiménez y cols. 2013) que puede ser

debida a la disminución de absorción de nutrientes e incluso al malestar general de los animales y al dolor producido, pero según se va recuperando la estructura fisiológica de la pared del intestino los animales van recuperando el peso debido a que también recuperan la capacidad de absorber nutrientes y su salud, además al transcurrir los 9 días, cuando la recuperación es completa se observa incluso un aumento de peso que probablemente sea debido a la falta de alimento y de nutrientes absorbidos en los días anteriores. Trabajos similares en los que se ve alterada la mucosa intestinal también demuestran esta recuperación (Aracil, 2012).

También comprobamos la disminución en la cantidad de comida ingerida, esto lo podemos achacar al malestar de los animales por las graves lesiones del intestino que ha provocado la inyección de nigrina b, probablemente el dolor provocado hace que los animales pierdan el apetito e ingieran menor cantidad de comida.

Lo mismo ocurre con la cantidad de heces excretadas. Es evidente que si los animales ingieren menos alimentos la cantidad de heces que excreten también sea menor. Además se observan diferencias morfológicas en las heces recogidas en las diferentes fases del experimento. Transcurridas 24 horas tras la inyección de nigrina b observamos que las heces son de menor tamaño, más duras y contienen una cantidad elevada de mucosidad y en algunos casos incluso sangre lo que indica que proviene del intestino. En las siguientes fases se observa una recuperación de la morfología de las heces, pero incluso al noveno día aún son un poco más pequeñas que las heces de la fase control, aunque ya no se observa la mucosidad de las fases anteriores ni la sangre.

Estos resultados apoyan claramente la propuesta de considerar modelo de regeneración a los efectos reversibles de nigrina b a dosis subletales. El efecto de nigrina b i.v. a 5mg/kg de nigrina b se asocia a un acortamiento de los intestinos, fundamentalmente del intestino delgado. La longitud del intestino delgado se va recuperando hasta llegar a ser prácticamente la misma a los 9 días.

Existen estudios en los que se concluye que el ayuno en roedores provoca un acortamiento intestinal atrófico asociado a una importante reducción de la ingesta de comida durante las primeras 24 horas, para ir recuperándose en los siguientes días y llegar a ser la misma o incluso algo superior a los 9 días (Chappell y cols., 2003).

- **Variación en la absorción de minerales.**

La absorción de nutrientes tiene lugar fundamentalmente en el intestino delgado. Cuanto mayor será su longitud mayor capacidad absorptiva presentará, puesto que los nutrientes tendrán más superficie de contacto para ser absorbidos. Una de las características es la presencia de vellosidades o villi que tienen forma de dedo y por ello aumentan la superficie de contacto con los nutrientes.

Nuestro trabajo actual ha consistido en comprobar que la capacidad absorptiva de las células del intestino delgado, que han sufrido daño histológico, también se recupera y vuelve a la normalidad transcurridos los 9 días. Para ello hemos medido la absorción de cuatro minerales importantes como calcio, magnesio, cobre y cinc. Además este trabajo nos ha servido para confirmar el tipo de transporte en el intestino de estos minerales.

Para conocer la cantidad de minerales absorbido hemos pesado la cantidad de comida ingerida en cada periodo del experimento y la cantidad de heces excretadas en estos mismos tiempos. Con esto hemos comprobado que los ratones a las 24 horas del tratamiento ingieren una cantidad significativamente menor de comida. En cuanto a la absorción de minerales, comprobamos que ocurre prácticamente lo mismo.

Vemos en los cuatro minerales medidos, que la absorción se ve muy disminuida a las 24 horas, sin duda por las lesiones en el epitelio intestinal, al estar prácticamente destruidas las células de la pared intestinal, e incluso desaparecer las criptas y los villi. Por ello el intestino no puede cumplir con su función de absorción de los minerales. La absorción se va recuperando con el tiempo y a las 72 horas se observa una buena recuperación histológica del intestino supone también una recuperación en su capacidad de absorción de los cuatro minerales estudiados. La absorción de los minerales a los 9 días es prácticamente la misma que antes de iniciar el tratamiento. Por lo que podemos concluir que la recuperación del tejido epitelial de ambos intestinos conlleva a una recuperación en la capacidad funcional de las células, puesto que recuperan su capacidad de absorción de los minerales estudiados.

Si observamos cada uno de los minerales por separado vemos que siguen un patrón común, de tal forma que a las 72 horas de iniciado el tratamiento se ha recuperado totalmente o casi totalmente la absorción. Esto indica que la absorción tiene lugar fundamentalmente en el intestino delgado puesto que a las 24 horas el epitelio del intestino grueso no aparece dañado y sí a las 72 horas.

El 90% del calcio se absorbe en el intestino delgado, fundamentalmente en el duodeno, mientras que la absorción en el intestino grueso es muy pequeña, probablemente no más del 10% (Bronner y cols., 1999). Observamos que la disminución en la absorción de calcio es la más importante de los minerales estudiados, esto puede ser debido a que la absorción más importante del calcio tiene lugar en el duodeno (Bronner y cols., 2003), y esta parte del intestino delgado es la más afectada tras el tratamiento con nigrina b.

El magnesio se absorbe en su mayoría en la zona del yeyuno y también en el intestino grueso. Estos segmentos del intestino delgado sufren un importante daño en la estructura de sus células absortivas, aunque es menor que en el duodeno, por eso comprobamos que la absorción de magnesio está muy disminuida transcurridas 24 horas de la inyección de nigrina b, para ir recuperándose poco a poco. También podemos comprobar que la absorción de calcio a las 24 horas del inicio del tratamiento está más disminuida que la de magnesio, esto puede ser debido al lugar del intestino delgado donde tiene lugar la absorción de cada uno de estos minerales. La nigrina b provoca importantes daños en todo el intestino, pero fundamentalmente en el duodeno, lugar donde se absorbe mayoritariamente el calcio, mientras que el magnesio se absorbe fundamentalmente en el íleon y yeyuno.

Para el cobre y el cinc ocurre algo parecido y la variación entre ambos es prácticamente la misma. Se observa una importante disminución de la absorción a las 24 horas del tratamiento, para recuperarse y normalizarse a las 72 horas. A los 9 días la absorción es mayor que para la fase control.

En todos los casos comprobamos que a los 9 días de tratamiento la absorción es mayor que para la fase control. Esto puede ser debido a la falta de minerales generalizada que han sufrido los animales durante 72 horas, y por este motivo la absorción está incrementada para aprovechar al máximo el contenido de minerales de los alimentos ingeridos y así conseguir llegar a los niveles normales con mayor rapidez.

La recuperación de la capacidad de absorción no va asociada a la recuperación de la longitud del intestino delgado, ya que a las 72 h si bien se ha recuperado la absorción de los minerales, no lo ha hecho la longitud del intestino delgado que permanece constante a las 24 h. Por otro lado, a los 9 días se produce un incremento de la longitud del intestino delgado y un aumento muy notable de la capacidad de absorción de los cuatro minerales. Este efecto podría estar relacionado con la necesidad del animal de restaurar en lo posible los minerales movilizados de los tejidos estructurales, en particular el calcio del hueso.

- **Enzimas antioxidantes y estrés oxidativo.**

La administración de ricina, una RIP de tipo II extraordinariamente tóxica conlleva, una serie de daños entre los que se incluyen la apoptosis y una serie de cambios que producen estrés oxidativo (Stirpe, BJ). Los efectos iniciales de la administración de ricina son entre otros, el daño intestinal que llega a ser tan profundo que provoca destrucción del tejido (Spooner y Lord, 2015).

Dado el efecto tóxico reversible de nigrina b se consideró importante para avanzar en el mecanismo de acción tisular de nigrina b en ratones,

estudiar los efectos de la proteína sobre los sistemas enzimáticos fundamentales que conforman la respuesta antioxidante celular como son catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Además se consideró importante determinar la producción de malóndialdehído (MDA), que como hemos comentado ya es un marcador de lipoperoxidación de las membranas plasmáticas.

Nuestros resultados indican que nigrina b promueve la producción de MDA con un patrón inversamente proporcional al observado en la absorción de minerales. Así tanto en hígado como en riñón, tejidos muy metabólicos, se produce la máxima producción de MDA 24 horas después de la administración de nigrina b. El incremento se mantiene, aunque en menor extensión, a las 72 horas, y 9 días después la producción de MDA vuelve a la producción inicial. El riñón sufre la mayor producción de MDA, probablemente por ser un órgano que contiene glicoproteínas en la superficie celular capaces de captar lectinas.

Esta nefrotoxicidad se ha descrito tanto para ricina (Spooner y Lord, 2015), como la toxina Shiga, Shiga-like toxins (Pilar y cols, 2012a y 2012b). Esta nefrotoxicidad conduce en el caso de la toxina Shiga al denominado síndrome urémico-hemolítico.

La comparación de los efectos de nigrina b sobre la longitud del intestino delgado y la producción de MDA a las 72 horas, indica que aunque la longitud del intestino delgado es la misma que a las 24 horas la producción de MDA es inferior lo que sugiere que a las 72 horas se producen mecanismos de regeneración celular y tisular, con reducción de la

lipoperoxidación, que son consistentes con la recuperación de las criptas de Lieberkühn observada en los análisis histológicos.

La evolución en la producción de MDA en tres segmentos del intestino delgado proximal, medio y distal refleja la evolución del daño histológico promovido por la nigrina b.

La recuperación completa de los niveles de MDA previos al tratamiento con nigrina b demuestra que el tejido del intestino delgado se ha recuperado totalmente en lo que respecta a estado de los lípidos de las membranas plasmáticas. La recuperación del tejido intestinal cursa con una reducción notable de las apoptosis promovidas por la administración de nigrina b, como hemos visto en los estudios histológicos.

La lipoperoxidación promovida por nigrina b, se debe a la acumulación de peróxidos y superóxidos que atacan a los lípidos de las membranas plasmáticas. Esta acumulación muy probablemente es debida a la reducción de la actividad de los enzimas antioxidantes. Como hemos demostrado en este trabajo la administración intravenosa de nigrina b 5 mg/kg, promueve una fuerte reducción en las actividades catalasa, superoxidodismutasa y glutathionperoxidasa. El patrón seguido por esta reducción de actividad es similar al observado en la absorción de nutrientes. La mayor reducción se produce a las 24 horas y a las 72 horas la reducción es notablemente menor, produciéndose la recuperación total 9 días después de la administración de nigrina b.

Tanto la reducción de la absorción de minerales, como de las actividades de las enzimas antioxidantes puede deberse a una reducción en

la longitud del intestino delgado, y la restauración de los valores puede deberse a la regeneración del tejido que se inicia ya a las 72 horas, aunque la longitud inicial no se recupera hasta mucho después. De hecho a los 9 días existe un notable incremento en la longitud del intestino delgado probablemente para compensar las pérdidas derivadas del efecto tóxico y así poder mantener la captación de nutrientes que permita la recuperación total del animal.

En resumen, estamos ante un fenómeno tóxico subletal originado por la administración intravenosa de nigrina b, que permite la presencia de esta proteína de manera prácticamente instantánea en todo el organismo. Ello permite que la nigrina b interaccione con los lechos vasculares más activos, y por lo tanto con los tejidos más vascularizados. Allí se produce la interacción de nigrina b con las glucoproteínas de las membranas plasmáticas.

Estos complejos nigrina b-glucoproteínas se internalizan desatando el proceso tóxico mediado muy probablemente por dos grandes grupos de factores. El primer grupo incluye los fenómenos relacionados con el tránsito intracelular de nigrina b, que concluyen en el efecto inhibitorio de la síntesis de proteínas que provoca apoptosis (Girbes y cols. 2004; Tejero y cols. 2015). El otro gran grupo de factores incluye la señalización celular promovida por nigrina b que incluiría la interacción con rutas metabólicas bajo la regulación de citoquinas y quimioquinas, como se ha visto con ricina (Spooner y Lord, 2015), y que por su extensión y complejidad, su estudio en el caso de nigrina b cae fuera de esta tesis.

Este proceso de regeneración tisular promovido por dosis subletales de nigrina b nos permitió formular un modelo de ratón, modelo de nigrina b

(Jiménez y cols, 2013; Jiménez y cols, 2013; datos no publicados del profesor Girbés sobre transporte de vitamina C y glucosa) así como el efecto de nutracéuticos como los polifenoles del té verde (Jiménez y cols. 2013).

6. CONCLUSIONES.

-
1. La administración intravenosa de 5 de nigrina b 5 mg/kg a ratones swiss provoca un daño subletal reversible fundamentalmente en el intestino delgado que va asociado a la reducción de la ingesta de alimentos, de la producción y naturaleza de heces, de la reducción de la longitud del intestino delgado.
 2. La reducción de la longitud del intestino delgado es consecuencia de la destrucción de criptas y villi del intestino delgado según una secuencia temporal, afectándose las criptas de Lieberkühn a las 24 horas del tratamiento, y los villi a las 72 horas.
 3. La administración de nigrina b provoca una fuerte reducción en la absorción de los minerales calcio, magnesio, cobre y zinc a las 24 horas del tratamiento y tiende a recuperarse después, llegando a valores muy superiores a los controles previos al tratamiento, 9 días después de la administración de nigrina b.
 4. El incremento de la absorción de minerales sobre controles que se observa 9 días después de la administración de la nigrina b es debido probablemente a la necesidad del organismo de restaurar los niveles de minerales reducidos por el tratamiento, en particular el calcio de los huesos.
 5. La administración intravenosa de nigrina b 5 mg/kg promueve un estrés oxidativo caracterizado por lipoperoxidación lipídica, medida como malóndialdehído, responsable en parte de la apoptosis de las células de las criptas de Lieberkühn que se observa en los análisis histológicos.

-
6. La administración intravenosa de nigrina b 5 mg/kg provoca una notable reducción en los sistemas enzimáticos antioxidantes, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, reducción que es la responsable del aumento de peróxidos y superóxidos que conducen al aumento de niveles de malóndialdehído.

 7. Los efectos de nigrina b sobre los enzimas antioxidantes son completamente reversible y apoyan la consideración del tratamiento de ratones con nigrina b subletal como modelo de daño regeneración intestinal.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Aoyagi, K., Iida, M., Yao, T., Matsui, T., Okada, M., Oh, K., y cols., (1997). Characteristic endoscopic features of intestinal lymphangiectasia: Correlation with histological findings. *Hepato-Gastroenterology*, 44(13), 133-138.

Aoyama K, Nakaki T. (2015). Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules*. 20(5):8742-8758.

Aracil Fernández, M. Efectos de la administración intraperitoneal de nigrina B sobre la absorción intestinal de vitamina B6 en ratones. Tesis Doctoral. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/2786>.

Barbieri, L., Battelli, M. G., Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1154(3), 237-282.

Barbieri L, Ciani M, Girbés T, Liu WY, Van Damme EJ, Peumans WJ, Stirpe F. (2004). Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett*. 2004 Apr 9; 563:219-222.

Barbieri, L., Polito, L., Bolognesi, A., Ciani, M., Pelosi, E., Farini, V., y cols., (2006). Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(5), 783-792.

Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe, F. (1997). Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly (A). *Nucleic Acids Research*. 25, 518-522.

Battelli, M. G., Citores, L., Buonamici, L., Ferreras, J. M., De Benito, F., Stirpe, F., y cols., (1997). Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *sambucus nigra*: Comparison with ricin. *Archives of Toxicology*, 71(6), 360-364.

Behne D, Scheid S, Hilmert H, Gessner H, Gawlik D, Kyriakopoulos A. (1990). Combination of neutron activation analysis, tracer techniques, and biochemical methods in the investigation of selenium metabolism. *Biol Trace Elem Res*. 26-27:439-47.

Bridle, P., Garcia-Viguera, C. (1997) Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry*, 59: 299-304.

Brink, E. J., Beynen, A. C. (1992). Nutrition and magnesium absorption: A review. *Progress in Food & Nutrition Science*, 16(2), 125-162.

Bronner, F., Pansu, D. (1999). Nutritional aspects of calcium absorption. *The Journal of Nutrition*, 129: 9-12.

Bronner, F. (2003). Mechanisms of intestinal calcium absorption. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88, 387-393.

Bułdak RJ, Bułdak Ł, Kukla M, Gabriel A, Zwirska-Korczala K. (2014). Significance of selected antioxidant enzymes in cancer cell progression. *Pol J Pathol*. 65:167-175.

Cabrero L. Tesis Doctoral (2012). Caracterización de los efectos de la administración de la lectina antinutricional nigrina de corteza de sambucus nigra L. y efecto sinérgico con los polifenoles del té verde. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/2765>.

Chance B., Williams GR (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*. 176:250-254.

Chand, N., Mihas, A. A. (2006). Celiac disease: Current concepts in diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40, 3-14.

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 heterodimeric lectin in fruits of *Sambucus ebulus* L. *Planta*, 204, 310-317.

Citores, L., de Benito, F.M., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Jiménez, P., Argüeso, P., Farias, G., Méndez, E., Girbés, T. (1996a) Isolation and characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein from fruits of elder (*Sambucus nigra* L.). *Journal of Experimental Botany*, 47: 1577-1585.

Citores, L., Muñoz, R., De Benito, F.M., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Girbés, T. (1996b) Differential sensitivity of HELA cells to the type 2 ribosome-inactivating proteins ebulin I, nigrin b and nigrin f as compared with ricin. *Cellular and Molecular Biology*, 42:473-476.

Citores L1, Rojo MA, Jiménez P, Ferreras JM, Iglesias R, Aranguéz I, Girbés T. (2008) Transient occurrence of an ebulin-related D-galactose-lectin in shoots of *Sambucus ebulus* L. *Phytochemistry*. 69:857-864.

Dahl JU, Gray MJ, Jakob U (2015). Protein quality control under oxidative stress conditions. *J Mol Biol*. 427:1549-1563.

De Benito, F. M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J. M., Camafeita, E., Méndez, E., et al. (1997). Isolation and partial characterization of a novel and uncommon two-chain 64-kDa ribosome-inactivating protein from the bark of elder (*sambucus nigra* L.). *FEBS Letters*, 413: 85-91.

Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M., & Lord, J. M. (2002). The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry*, 41: 3405-3413.

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*.15: 353-363.

Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT.(2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24: 367-380.

Ferreras, J.M., Citores, L. Iglesias, R. Souza, A.M. Jiménez, P. Gayoso, M. and T. Girbés. (2011). Occurrence of the type two ribosome-inactivating protein nigrin b in elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark. *Food Research International*, 44: 2798-2280.

Ferreras, J., Citores, L., De Benito, F., Arias, F., Rojo, M., Muñoz, R., y cols., (2000). Ribosome-inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. *Curr. Top. Phytochem*, 3: 113-128.

Font-Quer, P. (1988) Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado. Editorial Labor, 11ª edición, pág. 752-757, Barcelona.

Gayoso, M., Muñoz, R., Arias, Y., Villar, R., Rojo, M., Jiménez, P. (2005). Specific dose-dependent damage of lieberkühn 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. (2009). Tesis doctoral. Mecanismos de acción de las lectinas antinutrientes con actividad antirribosómica ricina, volkensina, nigrina y ebulina y aplicaciones terapéuticas de nigrina y ebulina. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Basterrechea J.E. (2013). Tesis doctoral. Capacidad antioxidante y antirradicalaria, y nuevas lectinas SELblo y ebulina blo presentes en las inflorescencias del saúco enano. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Girbés, T., Barbieri, L., Ferreras, J.M., Arias, F.J., Rojo, M.A., Iglesias, R., y cols., (1993c) Effects of ribosome-inactivating proteins on *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* translation systems. *Journal of Bacteriology*, 175: 6721-6724.

Girbés, T., Citores, L., Ferreras, J.M., Rojo, M.A., Iglesias, R., Muñoz, R., (1993a). Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol Biol*. 22: 1181-1186.

Girbés, T., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Rojo, M.A., y cols., (1993b) Ebulin 1, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J Biol Chem*. 268: 18195-18199.

Girbés, T., De Torre, C., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Méndez, E. (1996) RIP for viruses. *Nature*. 379: 777-778.

Girbes, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., Stirpe, F. (2004). Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 4: 461-476.

Girbes, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., Munoz, R., Iglesias, R., Jimenez, P., y cols. (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, France)*, 49: 537-545.

Jiménez, P., Gayoso, MJ, Girbes, T., (2014). Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. En *Ribosome-inactivating Proteins: Ricin and Related Proteins*, First Edition. Edited by Fiorenzo Stirpe and Douglas A. Lappi. John Wiley & Sons, Inc. pp 67-82.

Gray, A.M., Abdel-Wahab YH, Flatt PR. (2000). The traditional plant treatment, *Sambucus nigra* (elder), exhibits insulin-like and insulin-releasing actions in vitro. *Journal of Nutrition*, 130:15-20.

Griffiths, G. D. (2011). Understanding ricin from a defensive viewpoint. *Toxins*, 3: 1373-1392.

Hajdu J, Wyss SR, Aebi H. (1977). Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents. Symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem.* 80:199-207.

Hao, Q., Van Damme, E. J., Hause, B., Barre, A., Chen, Y., Rouge, P., y cols., (2001). Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome-inactivating proteins with unusual properties. *Plant Physiology*, 125: 866-876.

He, W., Liu, W. (2003). Cinnamomin: A multifunctional type II ribosome-inactivating protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 1021-1027.

Hoenderop, J. G., Nilius, B., & Bindels, R. J. (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiological Reviews*, 85: 373-422.

Huang, P.L., Chen, H.C., Kung, H.F., Huang, P.L., Huang, P., Huang, H.I. Lee-Huang, S. (1992). Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms. *Biofactors*, 4: 37-41.

Jiménez, P., Cabrero, P., Tejero, J., Gayoso, MJ., Garrosa, M., Córdoba-Díaz, D., y cols., (2014). Concentrated extract of green tea polyphenols enhances the toxicity of the elderberry lectin nigrin b to mice. *Food and Nutrition Sciences*, 5: 466-471.

Jiménez P, Gayoso MJ, Garrosa M, Córdoba-Díaz D, Cabrero P, Tejero J, y cols., (2014b). Paneth cells are also target of the ribotoxic lectin nigrin b. *Histol Histopathol.* 29:1057-1063.

Jiménez, P., Córdoba-Díaz, D, Cabrero, O., Aracil, M., Gayoso, MJ., Garrosa, M., y cols., (2013). Plasma accumulation of vitamin B6 from an oral dose in a new gut injury-regeneration reversible mouse model. *Food and Nutrition Sciences*, 4: 908-917.

Jiménez, P., Córdoba-Díaz, D., Córdoba-Díaz, M., Aracil, M., Girbés, T. (2012). Las toxinas Shiga de *Escherichia coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina (I). *Industria Farmacéutica*, 171: 70-75.

-
- Jiménez, P., Córdoba-Díaz, D., Córdoba-Díaz, M., Aracil, M., Girbés, T. (2012). Las toxinas Shiga de *Escherichia coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina (II). *Industria Farmacéutica*, 173: 76-82.
- Kemmerly T, Kaunitz JD. (2014). Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol.* 30: 583-588.
- Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71: 477-494.
- Kaur, I., Gupta, R., & Puri, M. (2011). Ribosome inactivating proteins from plants inhibiting viruses. *Virologica Sinica*, 26: 357-365.
- Khan, S. (2005). Eosinophilic gastroenteritis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19: 177-198.
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Bourinbaiar, A.S., Chen, H.C., Kung, H.F. (1995). Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 y GAP31. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 92: 8818-8822.
- Li, X., Chen, W., Liu, W., Wang, G. (1997). Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating Proteins—Cinnamomin and camphorin from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Protein Expression and Purification*, 10: 27-31.
- 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). *Veget Hist Archaeobot.* 17 (Suppl 1), S113–S122.
- Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. (1999). *In Vivo.* 13: 295-309.
- Montanaro, L., Sperti, S., Stirpe, F. (1973). Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem.J.* 136: 677-683.
- Nielsen, K., Boston, R. (2001). Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52: 785-816.
-

Nsimba-Lubaki, M., Peumans, W.J. (1986). Seasonal Fluctuations of Lectins in Barks of Elderberry (*Sambucus nigra*) and Black Locust (*Robinia pseudoacacia*). *Plant Physiology*, 80: 747-751.

Olsnes, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, 44: 361-370.

Olsnes, S., Pihl A.C (1982). In: Cohen, P., Van Heyningen, S. Editors. *Molecular Action of Toxins and Viruses*. 51-105.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. (2014). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 30:11-26.

Pascual P, Martinez-Lara E, Bárcena JA, López-Barea J, Toribio F. (1992). Direct assay of glutathione peroxidase activity using high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr*. 581: 49-56.

Pawłowicz Z, Zachara BA, Trafikowska U, Maciag A, Marchaluk E, Nowicki A. (1991). Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with breast cancer and with advanced gastrointestinal cancer. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis*. 5:275-277.

Peumans, W. J., Hao, Q., Van Damme, E. J. (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: More than RNA N-glycosidases? *FASEB Journal*, 15: 1493-1506.

Quamme, G. A., de Rouffignac, C. (2000). Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front Biosci*. 5: (D694-711).

Rottoli, M., Castiglioni, E. (2009). Prehistory of plant growing and collecting in northern Italy, based on seed remains from the early Neolithic and Chalcolithic (c.5600-2100 cal BC). *Vegetation History and Archaeobotany*. 18: 91-103.

Russo, P. A., Brochu, P., Seidman, E. G., Roy, C. C. (1999). Autoimmune enteropathy. *Pediatric Develop. Pathol*. 2: 65-71.

Santanam N, Ramachandran S, Parthasarathy S. (1998). Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Semin Reprod Endocrinol*. 16:275-280.

Sentman ML, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 281: 6904-6909.

Shih, N. R., McDonald, K. A., Jackman, A. P., Girbés, T., Iglesias, R. (1997). Bifunctional plant defence enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from *trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Science*, 130: 145-150.

Siu, M. T., Wiley, M. J., Wells, P. G. (2013). Methanol teratogenicity in mutant mice with deficient catalase activity and transgenic mice expressing human catalase. *Reprod. Toxicol.* 36: 33-39.

Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia.* 30:513-523.

Spiegel, P.C., Ermolenko, D.N, Noller, H.F. (2007). Elongation factor G stabilizes the hybrid-state conformation of the 70S ribosome. *RNA.* 13: 1473-1482.

Spooner R.A, and J. Michael Lord (2015). Ricin Trafficking in Cells. *TT Toxins* 7: 49-65.

Stirpe, F., Battelli, M. (2006). Ribosome-inactivating proteins: Progress and problems. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1850-1866.

Stirpe, F. (2013). Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon*, 67: 12-16.

Tejero del Río, J. (2012). Tesis Doctoral. Caracterización químico-física y toxicología de las lectinas antinutricionales ebulina F y SELfd de frutos de *Sambucus ebulus* L. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/2769>.

Tejero J, Jiménez P, Quinto EJ, Cordoba-Diaz D, Garrosa M, Cordoba-Diaz y cols., (2015). Elderberries: a source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity. *Molecules.* 20: 2364-2387.

Timberlake, C.F., Bridle, P. (1977) Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *J, Sci. Food Agric.* 28:539-544.

Mihara, M., Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 86: 271-278

Van Damme, E. J., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandebussche, F., Desmyter, S., y cols., (2001). Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Critical Rev. Plant Sci.*, 20: 395-465.

Van Damme, E.J., Roy, S., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1997). The major elderberry (*Sambucus nigra*) fruit protein is a lectin derived from a truncated type 2 ribosome-inactivating protein. *Plant J.*, 12:1251-1260.

Vertechy M1, Cooper MB, Ghirardi O, Ramacci MT. (1993). The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain. *Exp Gerontol.* 28:77-85.

Vlassopoulos A, Lean ME, Combet E. (2014). Protein-phenolic interactions and inhibition of glycation. Combining a systematic review and experimental models for enhanced physiological relevance. *Food Funct.* 5:2646-2655.

Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. (2006). The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2725-2737.

Yeoh, E., Horowitz, M., Russo, A., Muecke, T., Robb, T., Maddox, A., et al. (1993). Effect of pelvic irradiation on gastrointestinal function: A prospective longitudinal study. *Amer. J. Med.* 95: 397-406.

Youngman, E.M., Green, R. (2007). Ribosomal translocation: LepA does it backwards. *Curr Biol.* 17R: 136-139.