



TFG en Nutrición Humana y Dietética

4º Curso

Lectinas vegetales: utilización en histoquímica y en terapia antitumoral

Autor: Felipe Velasco Martín

Tutor: Tomás Girbés Juan

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

DAMPs: Daño asociado a patrones moleculares

EUL: *Euonymus* lectins

GalNAc: N-acetilgalatosamina

GlcNAc: N-Acetilglucosamina

IC₅₀: Concentración de proteína que inhibe el 50% de la síntesis proteica

JRL: Jacalin-related lectins

kDa: kilodalton

LecRKs: lectinas receptoras de quinasas

Mr: Masa relativa

nM: nanomolar

P/MAMPs: percepción de patógenos/microbios asociados a patrones moleculares

RE: Retículo endoplasmático

RIP: Proteína inactivadora de ribosoma

SNA: *Sambucus nigra* agglutinin

SNLRP: *Sambucus nigra* lectin-related protein

SSA: *Sambucus sieboldiana* agglutinin

Índice

Resumen.....	4
1. Introducción.....	4
2. Justificación.....	5
3. Objetivos.....	5
4. Metodología	6
5. Reconocimiento de glúcidos	6
6. Clasificación.....	9
7. Lectinas de <i>Sambucus</i>	13
8. Hololectinas del <i>Sambucus</i>	14
9. Proteínas inactivadoras de ribosomas (ribosome-inactivating proteins; RIPs)	15
10. Internalización de ricina, nigrina y ebulina	18
11. Aplicaciones de las lectinas	20
12. Bibliografía	22

Resumen

Numerosas plantas expresan en su composición una o más lectinas o bien proteínas con un dominio lectina, permitiendo a éstas seleccionar y unirse a determinadas estructuras. El grupo de lectinas vegetales es bastante heterogéneo ya que difieren en su estructura molecular, actividades biológicas y especificidad por ciertas estructuras como la manosa o complejos N-glicosilados. No son solo importantes para la defensa de la planta. Debido a que son capaces de unirse a estructuras carbonadas, se utilizan como herramientas en glicobiología.

Palabras clave: lectinas, hololectinas, RIP, histoquímica, inmunotoxinas

1. Introducción

En la naturaleza las plantas están constantemente expuestas a una gran cantidad de patógenos, entre los que se encuentran: bacterias, virus y hongos. Aunque la interacción con algunos de ellos es beneficiosa, la mayoría de las infecciones microbianas son perjudiciales para la planta. Con el fin de evitar la colonización de patógenos, las plantas han desarrollado un sistema que les permite reconocer las sustancias invasoras y activar determinadas respuestas de defensa [1].

Una de estas partículas capaces de reconocer y unirse a glucoconjugados presentes en la superficie de los microorganismos, son las lectinas. El término apareció a finales del siglo XIX refiriéndose a aquellas moléculas capaces de reconocer los antígenos del grupo sanguíneo [2] y gracias a las cuales se descubrió la fucosa como determinante clave del epítipo H(0) [3]. La palabra *lectina* proviene del latín, del verbo *legere*, que significa *leer* y fue dado por Sharpey y Boyd para describir a aquella proteína capaz de formar uniones no covalentes y reversibles con carbohidratos, y aglutinar y/o precipitar polisacáridos y glucoproteínas. Aun así el término no se estableció estrictamente como tal y se aplicó a todas las proteínas que presentaban función aglutinante, por lo que el significado general de la palabra se perdió.

Algunas lectinas son tóxicas como la *Phaseolus vulgaris*. Esta lectina en particular es muy importante por estar presente en los frijoles, fuente proteica de los países latinoamericanos [4]. La toxicidad de este tipo de legumbre radica al comerlas crudas,

desencadenando un cuadro de infección intestinal. La inactivación de la toxina se consigue mediante el remojo y posterior cocción de las leguminosas [5].

Las lectinas son por tanto proteínas que contienen al menos un dominio no catalítico, permitiéndole reconocer y unirse de forma reversible a determinados glúcidos que se encuentran, bien de forma libre o como parte de glucoproteínas y glucolípidos [6].

A nivel vegetal, las lectinas se acumulan en grandes cantidades en las semillas y en los tejidos de almacenamiento, donde han demostrado que ejercen un papel defensivo para la planta [6]. En concreto, residen en el núcleo y en el citoplasma de la célula, que en presencia de estrés son captadas por las vacuolas o liberadas al espacio extracelular [7].

2. Justificación

Las lectinas juegan un papel importante en el reconocimiento de las glucoproteínas de la superficie celular, lo que ha dado lugar a la aparición de un nuevo campo, la glicómica, basada en la interpretación del código de glucosilación mediante la utilización de herramientas moleculares como las lectinas. Debido a ello, las lectinas se han utilizado en la construcción de fármacos experimentales contra células tumorales. No obstante, algunas lectinas, incluso algunas contenidas en los alimentos, presentan toxicidad que se trata de contrarrestar mediante cocción. Por lo tanto está clara su importancia también desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. En el presente trabajo se revisan los conceptos básicos más importantes sobre las lectinas, su clasificación, así como un grupo de lectinas del género medicinal y alimentario *Sambucus*. Este género se caracteriza por contener especies con mezclas de lectinas con y sin actividad antirribosómica.

3. Objetivos

Con la información anteriormente expuesta los objetivos planteados en este trabajo son:

- Comprender la importancia de las lectinas.
- Conocer sus aplicaciones más allá del papel que desempeñan en el mundo vegetal.

4. Metodología

Búsqueda en Pubmed.

Ítem	Nº de artículos	Rango de publicación	Tipo de artículo
Lectins	102920	Total	Todos
Lectins	13190	Últimos 5 años	Todos

Type lectins	25846	Total	Todos
--------------	-------	-------	-------

Lectin review	7079	Total	Todos
Lectin review	1482	Últimos 5 años	Todos

Lectin receptors	4584	Últimos 5 años	Todos
Lectin histochemistry	966	Últimos 5 años	Todos
Lectin cancer	3298	Últimos 5 años	Todos
Lectin array	499	Últimos 5 años	Todos
Lectin binding	6261	Últimos 5 años	Todos
Lectin binding blood	2007	Últimos 5 años	Todos
Lectin affinity	1262	Últimos 5 años	Todos

Lectins <i>Sambucus</i>	7	Total	Todos
Lectins <i>Sambucus</i>	2	Últimos 5 años	Todos

Ribosome-inactivating protein <i>Sambucus</i>	4	Total	Review
---	---	-------	--------

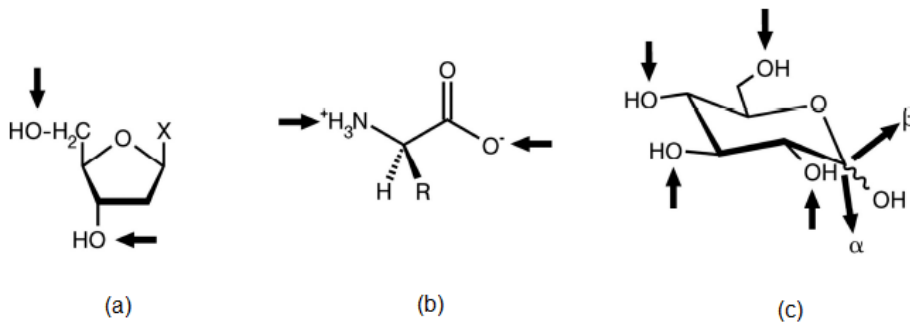
5. Reconocimiento de glúcidos

El código bioquímico puede interpretarse como un lenguaje. Oligómeros y polímeros son los equivalentes bioquímicos de “palabras” y “frases” respectivamente.

Construidos con un alfabeto de nucleótidos y aminoácidos, la información contenida en los ácidos nucleicos y las proteínas se determina por la secuencia (orden de las “letras”). En ambos casos las “letras” se conectan de la misma manera (tipo de enlace

y puntos de unión, Figura 1). Además la replicación del ADN y la producción de proteínas son posibles gracias a unos determinados pasos enzimáticos que requieren gran precisión. Inevitablemente existen límites en la codificación. El orden de los bloques es la que define la estructura primaria. En términos cuantitativos, las permutaciones o variaciones a la hora de colocar los bloques son el único factor que puede generar complejidad en la secuencia.

Figura 1. Ilustración de los puntos de unión en la formación de oligómeros indicado con flechas. Enlace fosfodiéster en la biosíntesis de ácidos nucleicos (a), enlace peptídico en la producción de proteínas (b) y enlace glucosídico en la formación de oligosacáridos (c). [8]



Un breve vistazo a la bioquímica de los carbohidratos revela el gran potencial que tienen para la codificación. Los azúcares en forma de anillo presentan grupos hidroxilo equivalentes. Cada uno de ellos (ya sea de un anillo furano, pirano o en posición exocíclica) puede formar en principio un enlace glucosídico con el centro anomérico de la siguiente unidad y formar un disacárido. Se crean por tanto diferentes conexiones, desde la posición 1 a las posiciones 1, 2, 3, 4 o 6. Tal y como muestra la Figura 1 el centro anomérico puede tener configuración α o β . Dependiendo del grupo hidroxilo escogido, sumado al parámetro de anomería, incrementa la capacidad de codificación más allá que las permutaciones [8].

Al contrario que los ácidos nucleicos, péptidos o proteínas, los glúcidos se ramifican fisiológicamente. El término antena en los glúcidos, hace referencia a la presencia de ramificaciones tal y como se observa en la Figura 2, en este caso fucosas con enlace $\alpha 1,2$ -, $\alpha 1,3$ -, o $\alpha 1,4$ - [8]. Cada enlace que se forma es llevado a cabo por distintas fucosiltransferasas, y los azúcares formados tienen su propio "significado". Dentro de estas estructuras se observan dos moléculas como son: la GlcNAc y la fucosa. Cada

una de ellas con especial importancia, ya que no se añaden de forma inerte a los sacáridos, sino que actúan en el equilibrio conformacional y de esta forma alteran las distancias entre las terminaciones de los azúcares, factor clave para la afinidad con los receptores [9]. Por tanto, los carbohidratos son más versátiles en comparación con los aminoácidos y los nucleótidos, ya que su capacidad de formación de isómeros es insuperable [8].

Aunque hay que tener en cuenta varios factores en la interacción con los carbohidratos, ya que el movimiento de éstos en solución, hace que se dispongan de distintas formas, cada una de las cuales puede ser captada por un receptor [10]. Teniendo esto en cuenta, la síntesis de glúcidos complejos así como su unión a otras moléculas y el reconocimiento de los isómeros por anticuerpos, convierte a las lectinas en los receptores ideales para “leer” la información contenida en los azúcares [11].

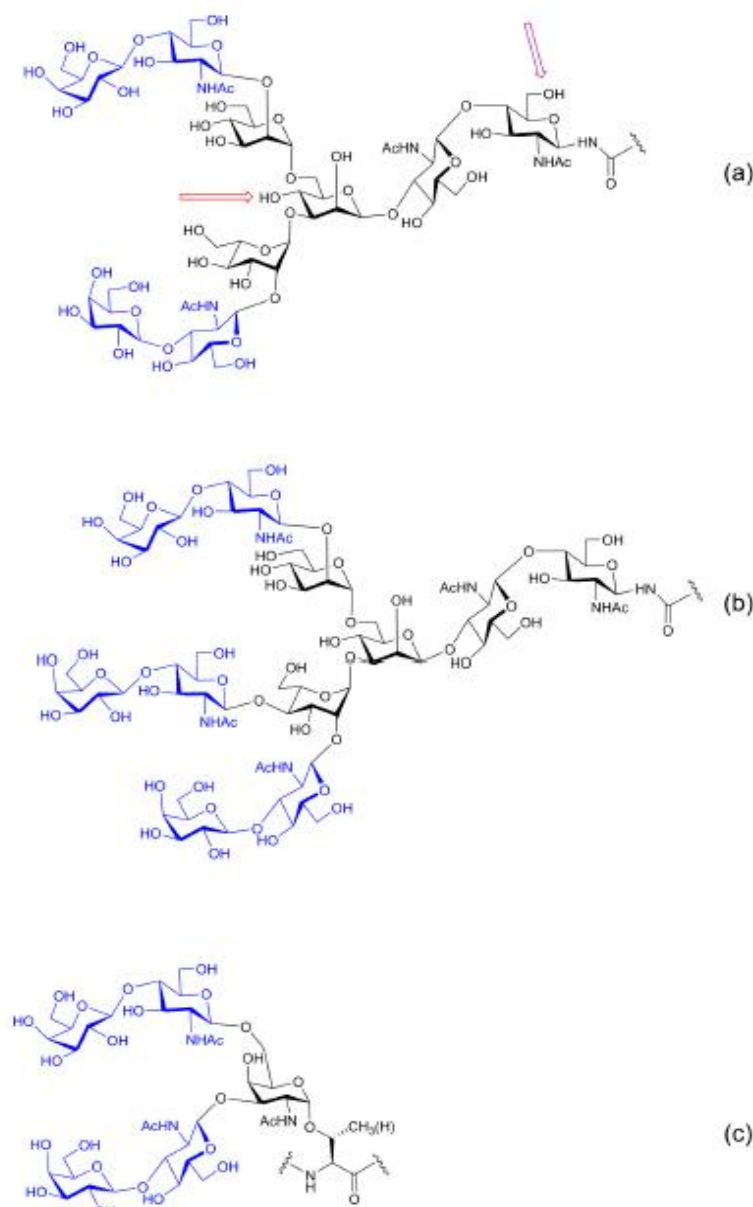


Figura 2.
Ilustración
esquemática de
la ramificación
fisiológica de los
azúcares [12]. A la izquierda en negro el pentasacárido $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ con extensión de dos (a) y tres (b) antenas respectivamente (en azul). Por último la ramificación del GlcNAc (en negro) con dos antenas (en azul) (c).

6. Clasificación (en la clasificación se ha seguido la revisión Van Damme, Lannoo, Peumans de 2008 [6]).

La mayoría de las lectinas vegetales conocidas se componen de uno o varios dominios similares a la lectina unidos a otro tipo de dominios como las aerolisinas, quitinasas y quinazas entre otras [6]. Se dio especial importancia a aquellas proteínas transmembrana cuyos dominios lectina se unían a dominios quinasa intracelular, y a los que se les atribuía la inmunidad innata de la planta. Sin embargo, las plantas usan una gran variedad de dominios lectina para contrarrestar el ataque de patógenos, en los que el dominio quinasa no es el elemento primordial.

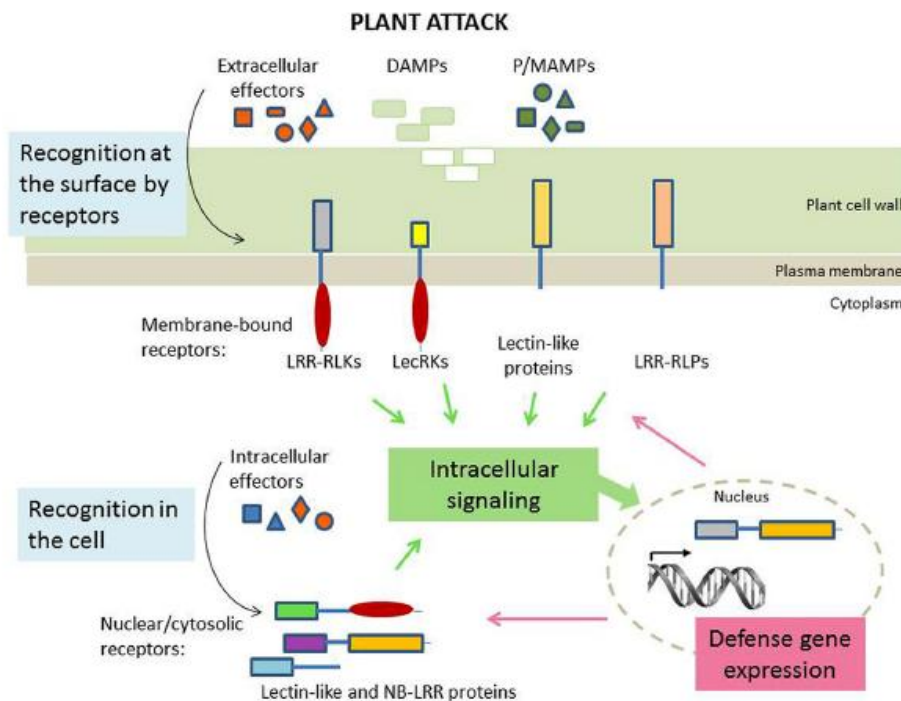


Figura 3. Inmunidad innata de la planta. Percepción de patógenos, microbios o daños moleculares por parte de los receptores y puesta en marcha de los mecanismos de defensa [6].

Las proteínas transmembrana más estudiadas son las lectinas receptoras de quinazas (LecRKs). Están formadas por el dominio lectina (extremo N-terminal extracelular) y el dominio quinasa (extremo C-terminal citosólico) separados por la región transmembrana. Poca información se conoce con respecto a la capacidad del dominio

lectina para reconocer e interactuar con estructuras carbonadas. Según el dominio antes citado se diferencian en cuatro tipos:

LecRKs tipo-G. Poseen un dominio lectina que se asemeja a la aglutinina *Galanthus nivalis* (GNA). Se han identificado cerca de 32 LecRKs tipo-G en la *Arabidopsis thaliana* y 100 en el arroz. Se encarga de las reacciones de autoincompatibilidad y de la defensa al estrés biótico y abiótico de la planta.

LecRKs tipo-C (dependientes de calcio). La mayoría de ellas son proteínas animales, responsables de la respuesta inmune y de participar en el reconocimiento de patógenos. En plantas son poco frecuentes.

LecRKs tipo-L (*legume-like*). Representa el grupo más numeroso de receptores de quinasas. Al igual que las otras dos anteriores también se encuentra en la *Arabidopsis thaliana*, en la que es muy abundante. Este tipo de lectina no solo está involucrada en la resistencia a patógenos, también se ha descubierto que actúa en la señalización hormonal y en la inmunidad de los estomas. Aún así no está claro que las tipo-L posean actividad lectina ya que la secuencia de aminoácidos responsable de la afinidad por los carbohidratos posee cambios en su organización. Por el contrario, el sitio hidrofóbico del dominio se mantiene igual, sugiriendo de esta manera su actuación en el reconocimiento de pequeños ligandos hidrofóbicos.

LecRKs LysM. Son el tipo de lectinas más estudiadas. Uno de sus dominios contiene una lisina que se une a varios tipos de peptidoglicanos bacterianos y a la quitina de los hongos. Esta variedad de lectinas no solo sirve para detectar patógenos, también percibe microorganismos beneficiosos como las micorrizas y las rizobacterias con las que participa en la inmunidad innata y en la simbiosis.

Con respecto a las proteínas solubles con un dominio lectina, implicadas en la defensa de la planta, podemos encontrar:

Amarantinas. Este grupo de proteínas relacionadas con el amaranto, presenta una lectina en las semillas del *Amaranthus caudatus*. La amarantina nativa es una proteína homodimérica formada por dos subunidades de 33 kDa, que reconoce el disacárido del antígeno-T Gal β (1,3)GalNAc aunque solo interactúa con el GalNAc (N-acetilgalactosamina). Es interesante destacar que el dominio amarantina no posee

sitios de unión para los azúcares, siendo la disposición que adquieren las dos subunidades de amarantina las que captan el disacárido del antígeno-T. Esta lectina nucleocitoplasmática potencia la resistencia de la planta frente al ataque de los pulgones y está ampliamente distribuida por el reino vegetal.

Calreticulina/calnexina. Son lectinas que se unen a azúcares y que residen en el retículo endoplasmático (RE) de las células eucariotas. Ambas son componentes esenciales del RE y actúan como chaperonas moleculares, asegurando el plegado y controlando la secreción de las glucoproteínas sintetizadas, antes de ser liberadas por el RE. Las chaperonas normalmente se suelen asociar a la parte peptídica de sus sustratos, mientras que estas dos lectinas se unen a las glucoproteínas de sus sustratos a través de un oligosacárido presente en las glucoproteínas nacientes ($\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$).

EUL-related lectins. Este amplio grupo de proteínas nucleocitoplasmáticas contiene al menos en su composición un dominio lectina *Euonymus* (EUL) que desempeña una función importante en la planta frente al estrés abiótico (deshidratación, salinidad y osmolaridad) y biótico (infecciones fúngicas y bacterianas). Según su estructura este grupo de proteínas se puede dividir en dos grupos: las que poseen un solo dominio EUL (denominadas tipo S) y las que están formadas por dos dominios EUL (conocidos como tipo D), dispuestos en tándem y separados por una secuencia de aminoácidos. Las dicotiledóneas pueden codificar uno o dos EUL tipo S, mientras que las monocotiledóneas y las especies talofitas contienen toda una variedad de secuencias EUL tipo S y D.

Jacalin-related lectins (JRL). Este grupo de lectinas se aisló por primera vez de las semillas de la yaca (*Artocarpus integrifolia*). Debido a las diferencias en la estructura molecular, localización subcelular y especificidad por carbohidratos, el amplio grupo de JRL puede dividirse en lectinas que se unen a galactosa y a manosa, situándose en las vacuolas y en el compartimento nucleocitoplasmático de la célula vegetal respectivamente. La especificidad de las JRL por la galactosa se ha relacionado principalmente con la familia Moraceae (árboles, arbustos, herbáceas y trepadoras), mientras que la especificidad por la manosa se corresponde con la Viridiplantae (algas y plantas terrestres). Algunos estudios han demostrado que el dominio jacalin no solo se restringe a proteínas vegetales, ya que dominios similares se han descubierto en eucariotas fuera del reino vegetal e incluso en algunas procariontas.

Al igual que con el resto de lectinas, las JRL están involucradas en los mecanismos de defensa de la planta. Éstas en especial se centran en cualquier tipo de estrés abiótico que sufra la planta y en la cicatrización de las heridas.

Nictaba-related lectins. Conocidas anteriormente como aglutininas del *Nicotiana tabacum* (abreviado en Nictaba), fueron descubiertas en las hojas del tabaco. Aunque las primeras lectinas descubiertas se unían a quito-oligosacáridos, las Nictaba también reaccionaban con estructuras de manosa y complejos N-glucosilados. Su expresión tiene lugar en el citoplasma. A pesar de la similitud en la composición de las diferentes variedades de lectinas Nictaba, los diferentes dominios pueden interactuar con distintos glúcidos y desempeñar por tanto diferentes funciones. Una de ellas es la actividad entomotóxica, ocasionada por la unión de la lectina con glucoconjugados presentes en el tracto digestivo de insectos.

Ricin-B lectins. Una de las familias proteicas más ampliamente distribuidas en la naturaleza. La más conocida es la ricina, una proteína tóxica procedente de las semillas del ricino y descubierta por Peter Hermann Stillmark en 1888. La ricina es una proteína constituida por una cadena A con actividad enzimática, unida mediante un puente disulfuro a una cadena B con actividad lectina. Esta cadena B está formada a su vez por dos dominios ricina, responsable de la unión de la proteína a estructuras galactosiladas. La actividad enzimática de la ricina se basa en la actividad N-glucosidasa del ARN y es responsable de la eliminación del residuo de adenina del ARN ribosómico 28S. Como resultado los ribosomas no son capaces de unirse al factor de elongación 2 y por tanto la síntesis proteica se bloquea (Figura 4). Debido a esta actividad catalítica, estas proteínas reciben el nombre de proteínas inhibitoras de ribosomas tipo 2 (RIPs) y se consideran tóxicas si consiguen entrar en la célula. La captación de la proteína por la célula se debe a la actividad lectina de la cadena B que interactúa con las estructuras glucoconjugadas de la superficie celular. Exceptuando la ricina y la abrina, la mayoría de las RIPs tipo 2 son poco o moderadamente tóxicas [13,14]. Esta familia de lectinas se ha caracterizado en detalle debido a la actividad biológica, y en especial por su toxicidad en algunas especies vegetales como el *Ricinus comunis* (ricino), *Abrus precatorius* (regaliz americano), *Viscum album* (muérdago blanco) y *Sambucus nigra* (saúco). A diferencia de las otras proteínas solubles descritas arriba, este grupo de lectinas se acumulan en las vacuolas o son secretadas al espacio extracelular [6]. Durante años el dominio ricina se ha identificado en plantas, animales, hongos y bacterias.

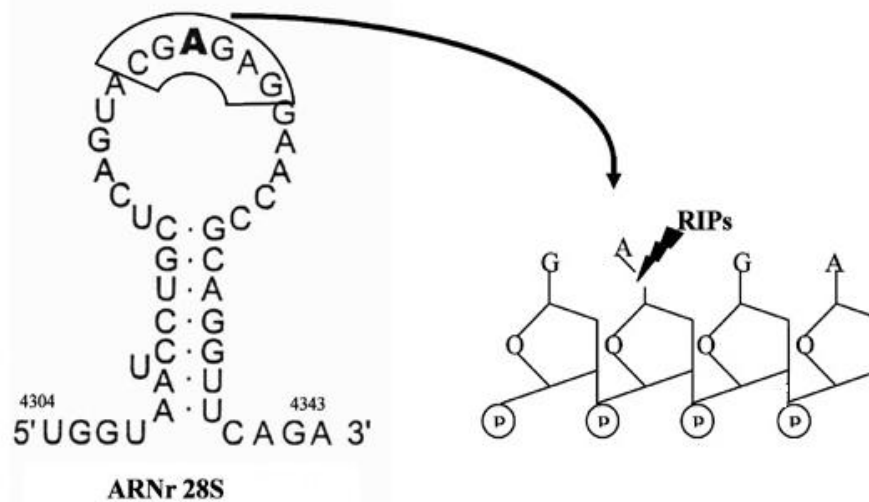


Figura 4. Secuencia de nucleótidos del bucle del ARNr responsable de la interacción del factor de elongación 2. El blanco específico es el enlace N-glucosídico que une la adenina resaltada en negro (A4324) con el esqueleto polirribosafosfato del ARNr (parte derecha de la figura); el ARNr depurinado no interacciona con el factor y por tanto la etapa de translocación se bloquea [14].

7. Lectinas de *Sambucus*

Dentro del género *Sambucus* existe una extensa familia de proteínas similares a la ricina, entre las que se incluyen algunas quimerolectinas y hololectinas [15]. Estas proteínas del *S. nigra* muestran diferente especificidad por carbohidratos, pudiendo clasificarlas en tres grupos. El primer grupo incluye las lectinas SNA-II y SNA-IV, así como la RIP tipo 2 SNA-V con especificidad hacia estructuras con Gal/GalNAc. El segundo grupo solo comprende la RIP tipo 2 SNA-I, que interactúa específicamente con residuos que contienen un ácido siálico terminal (Neu5Ac; α 2-6) unido a Gal/GalNAc. Finalmente, la RIP tipo 2 SNLRP (*Sambucus nigra* lectin –related protein) constituye el tercer grupo con una fuerte interacción con oligómeros de N-acetilglucosamina [15].

8. Hololectinas del *Sambucus*

Algunas especies del *Sambucus* contienen en su composición lectinas formadas por cadenas de polipéptidos con una secuencia de aminoácidos similar a la cadena B de las RIPs tipo 2. A este tipo de lectinas se las conoce como hololectinas y se dividen en dos grupos: lectinas monoméricas, formadas por una cadena tipo B y lectinas homodiméricas, con dos cadenas tipo B unidas por un puente disulfuro (B-S-S-B) [16].

Tabla 1. Lectinas monoméricas procedentes del *S. ebulus*, *S. nigra* y la variedad japonesa *S. sieboldiana* [14,16].

Especie	Fuente	Lectina	Mr (kDa)
<i>S. ebulus</i>	Brotes	SELM	34
	Hojas	SEAlm	33.5
	Rizomas	SEAr	34
<i>S. nigra</i>	Corteza	SNA-II	30
	Semillas	SNA-III	30
	Frutos	SNA-IV	30
<i>S. sieboldiana</i>	Corteza	SSA-b-3	35
	Corteza	SSA-b-4	33

Tabla 2. Lectinas homodiméricas de las especies *S. ebulus* y *S. nigra* [14,16].

Especie	Fuente	Lectina	Mr (kDa)
<i>S. ebulus</i>	Flores	SELblo	68
	Frutos	SELfd	68
	Hojas	SELld	68
<i>S. nigra</i>	Hojas	SNAld	60

Como muestran las tablas, las especies muestran lectinas en diversos tejidos, aunque su presencia varía en función de la época estacional y/o del desarrollo de la planta.

Todas las lectinas muestran afinidad por estructuras galactosiladas.

9. Proteínas inactivadoras de ribosomas (ribosome-inactivating proteins; RIPs)

Son enzimas con actividad N-glucosidasa en las subunidades de los ribosomas del ARN, que inhiben la síntesis proteica durante la translocación de las cadenas polipeptídicas [14].

Las RIPs pueden clasificarse en dos tipos. Las RIP tipo 1 como las saporinas, dianthins (proteínas del clavel), beetins (proteínas de la remolacha), etc. compuestas por una sola cadena polipeptídica con actividad enzimática. Las RIP tipo 2, tal y como se explicó anteriormente están formadas por dos cadenas unidas por un puente disulfuro: una cadena A (con actividad enzimática, similar a una RIP tipo 1) y una cadena B (capaz de unirse a estructuras glucosiladas presentes en la superficie celular, al igual que una lectina).

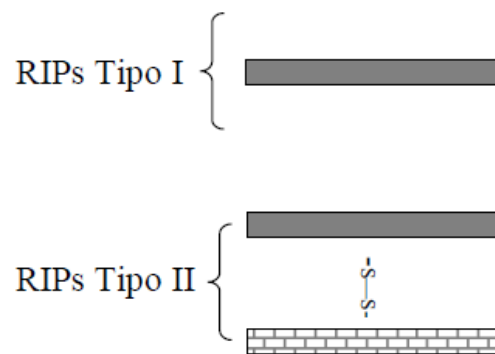


Figura 5. Representación de los tipos de RIPs. Barra gris, cadena con actividad enzimática; barra enladrillada, actividad lectina [14].

La cadena B es la que permite a la RIP tipo 2 penetrar la célula, permitiendo a la cadena A llegar a los ribosomas y provocar su inactivación. Ejemplos de RIP tipo 2 son: la ricina, la abrina y otras toxinas relacionadas. A su vez las RIP tipo 2 se subdividen en dos grupos: heterodiméricas (tipo A-B) y tetraméricas (A-B-B-A). Las tetraméricas consisten en 2 dímeros del tipo A-B unidos por un puente disulfuro.

La gran cantidad de RIPs que se han encontrado en la familia *Sambucaceae* hacen de ésta un modelo ideal para la realización de estudios y obtener más información sobre su papel biológico.

Tabla 3. RIPs tipo 1 de *Sambucus ebulus* y *Sambucus nigra*.

Especie	Fuente	RIP	Mr (kDa)
<i>S. ebulus</i>	Hojas	Ebulitina α	32
	Hojas	Ebulitina β	29
	Hojas	Ebulitina γ	29
<i>S. nigra</i>	Frutos	Nigritina f1	24.1
	Frutos	Nigritina f2	23.6

Todavía no ha sido posible determinar la secuencia amino terminal de las ebulitinas. Sin embargo su composición en aminoácidos sugiere que las ebulitinas β y γ son similares entre sí y difieren de la α [14,16].

Con respecto a las nigritinas, es importante mencionar que muestran actividad topológica, es decir, intervienen tanto en el ARN como en el ADN. Aún así muestran diferencias tanto en su composición (la nigritina f1 está glucosilada y la f2 no), como en el IC₅₀ (concentración de proteína que inhibe el 50% de la síntesis proteica), siendo mayor en la nigritina f2 con un valor de 268 nM, frente a los 15 nM de la nigritina f1 [14].

Tabla 4. RIPs tipo 2 heterodiméricas [14].

Especie	Fuente	RIP	Mr (kDa)
<i>S. ebulus</i>	Hojas	Ebulina l	56
	Rizomas	Ebulina r1	56
	Rizomas	Ebulina r2	56
	Frutos	Ebulina f	56
	Flores	Ebulina blo	63
<i>S. nigra</i>	Corteza	Nigrina b	58
	Corteza	Nigrina b básica	64
	Frutos	Nigrina f	58
	Semillas	Nigrina s	57.3
	Hojas	Nigrina l1	60
	Hojas	Nigrina l2	60
	Corteza	SNLRP 1	68
	Corteza	SNLRP 2	62
<i>S. sieboldiana</i>	Corteza	Sieboldina b	60

Algunas de las características más destacables de este tipo de lectinas es el período de acumulación en la planta, maduración y/o toxicidad [16]. La expresión de la ebulina I por ejemplo, es máxima en los brotes de primavera, a diferencia de la nigrina b básica cuya concentración en la corteza es mayor en los meses de Septiembre- Octubre (llegando a 900mg/kg). Otra lectina como la ebulina f, se acumula en los frutos verdes y desaparece por completo con la maduración. Al igual que ocurre con la ebulina blo (pero en el caso de las flores) y las nigrinas I1 y I2, completamente ausentes en hojas senescentes.

La nigrina f es considerada hasta la fecha la RIP tipo 2 más tóxica del género *Sambucus*. Aunque se ha encontrado en frutas verdes y maduras, la maduración también juega un papel esencial aquí, ya que lleva a una reducción sustancial de la concentración [14].

La nigrina b inhibe la síntesis proteica en las células de mamíferos con la misma eficiencia que la ebulina I, y al igual que ésta, es inactiva en los ribosomas de plantas y bacterias [14]. La nigrina b comparte con la ricina un mecanismo de internalización similar que se explicará más adelante.

Tabla 5. RIPs tipo 2 tetraméricas [14,16].

Especie	Fuente	RIP	Mr (kDa)
<i>S. ebulus</i>	Rizomas	SEA	140
<i>S. nigra</i>	Corteza	SNA-I'	120
	Corteza	SNA-I (*)	240
	Corteza	SNA-V	120
<i>S. sieboldiana</i>	Corteza	SSA	115.4

Nota: * SNA I es una RIP tipo 2 octamérica formada por dos tetrámeros idénticos unidos por fuerzas no covalentes.

El RIP procedente de los rizomas del *S. ebulus* (SEA) se describió hace años como una aglutinina específica a ácido siálico [16]. Estudios recientes han demostrado que este tipo de RIP se une al moco de las células caliciformes del intestino delgado en ratas [17].

En cuanto a las RIP pertenecientes a la especie *S. nigra*, la SNA-I es una herramienta importante en la investigación de tumores [14].

La única RIP tetramérica descubierta hasta el momento de la variedad *S. sieboldiana* muestra una actividad inhibitoria bastante baja comparada con el resto de RIPs del *Sambucus* [14].

10. Internalización de ricina, nigrina y ebulina

La ricina y las RIPs relacionadas son extremadamente tóxicas para las células intactas debido a la presencia de la cadena B translocadora que es capaz de internalizar al dímero A-B, que posteriormente entra en el citosol y se disocia liberando la cadena A, que es la especie activa [14,18,19]. En cambio, existen RIPs relacionadas con la ricina pero mucho menos tóxicas como ebulina y nigrina [14].

Estudios de endocitosis fluida realizados con la cadena A de la ricina, varios mutantes de dicha cadena, la cadena A de la ebulina de *Sambucus ebulus* y RIPs monocatenarias como la PAP de *Phytolacca americana* que no posee actividad de lectina, indican que la toxicidad de ricina y ebulina sobre los ribosomas depende únicamente de la actividad intrínseca de dichas cadenas A, y que las posibles diferencias de toxicidad *in vivo* y en células cultivadas dependen de las cadenas B, de su afinidad por sus receptores, de su capacidad de transporte intracelular y de su destino final [20].

Las diferencias de toxicidad *in vivo* y en células cultivadas entre ricina y ebulina parecen residir en las correspondientes cadenas B que poseen actividad lectina, en particular de la geometría del sitio de fijación de azúcares conocido como dominio 2 γ . Este sitio es muy especial y posee una tirosina cuyo grupo hidroxilo es el responsable del aumento de afinidad por los galactósidos presentes en la membrana plasmática [21].

La ebulina, con una elevada homología en la secuencia de aminoácidos, posee en ese mismo sitio una fenilalanina y el resultado es la pérdida de afinidad por galactósidos y la reducción de la actividad tóxica más de 1.000 veces [22]. La nigrina b, una RIP muy relacionada estructural y funcionalmente con la ebulina, presenta también una fenilalanina en la misma posición crítica del sitio de unión de azúcares 2 γ [14]. En la Figura 6 se muestra un modelo hipotético para el tráfico intracelular de ricina y de nigrina/ebulina [14,23]. Las moléculas de ricina se internalizan y después pasan por compartimentos endosómicos sensibles al NH₄Cl. Desde los endosomas primarios, la

ricina atraviesa compartimentos termosensibles que se bloquean a una temperatura inferior a 180 °C, indicando con ello que en el proceso están involucrados fenómenos de fusión de membranas intracelulares. Finalmente, la ricina es translocada en el aparato de Golgi en un proceso que es sensible a la brefeldina, droga conocida por su efecto desorganizador del aparato de Golgi. La mayor parte de la ricina internalizada se degrada totalmente en los lisosomas, por lo que solo unas cuantas moléculas logran alcanzar el citosol a través del aparato de Golgi e inactivar los ribosomas.

La nigrina b se internaliza inicialmente también a través de endosomas sensibles a NH_4Cl y se degrada también en los lisosomas. Sin embargo a partir de los endosomas, la ruta seguida por la nigrina b es diferente a la seguida por la ricina ya que los efectos antirribosómicos obtenidos a altas concentraciones son independientes de temperatura e insensibles a brefeldina. Prácticamente todas las moléculas de nigrina b son transportadas desde los endosomas hacia los lisosomas, donde se degradan [24]. Solo a concentraciones 4 o 5 órdenes de magnitud superiores a la ricina se acumulan suficientes moléculas de nigrina b en los endosomas como para que se dé la translocación espontánea de nigrina b desde el endosoma al citosol (Figura 6).

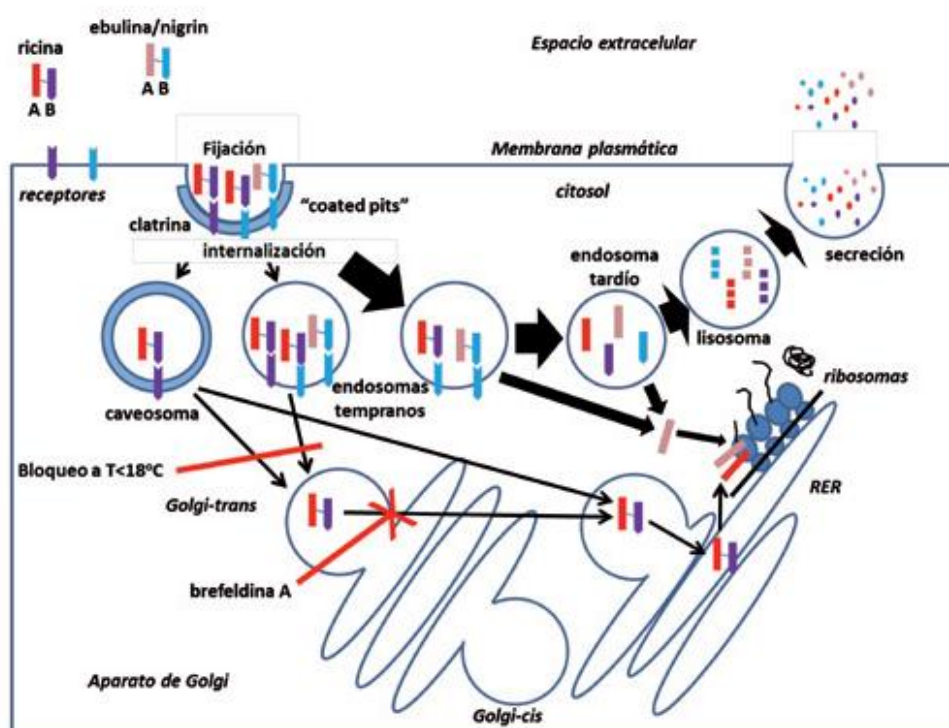


Figura 6. Tránsito intracelular de ricina, ebulina/nigrina [23].

11. Aplicaciones de las lectinas

Como reactivo histoquímico en reacciones de tinción

Tras haber dejado huella en el campo de la hematología, las lectinas pronto adquirieron el estatus de reactivos versátiles para la localización, aislamiento y caracterización de azúcares. Junto a la especificidad ejercida por los anticuerpos monoclonales, se adquirió una gran evidencia de la presencia de glúcidos, así como de la dinámica de su regulación, posición y estructura en células y tejidos.

La primera especificidad por carbohidratos llevada a cabo por una lectina se realizó en 1936 y fue con concanavalina A: que ocurriría si se deja reposar una parte de glucógeno en 500.000 partes de agua cuando se añade un exceso de concanavalina A [25].

Debido a que la precipitación que se producía se asemejaba a una reacción antígeno-anticuerpo, donde el glucógeno formaba parte del hapteno (sustancia química de pequeño peso molecular que no induce por sí misma la formación de anticuerpos, pero al unirse a una proteína transportadora, estimula una respuesta inmunitaria). Se concluyó que esa molécula similar al hapteno a la que se unía la concanavalina A podría ser un grupo de carbohidratos [26]. Hoy en día existen varios métodos para evaluar las uniones de los carbohidratos [27]. Estos datos son extremadamente útiles para interpretar los resultados procedentes de la aplicación de lectinas en cito e histoquímica [28-30]. Por ello, el descubrimiento de nuevas lectinas aportaría nuevos reactivos y abriría las puertas a aquellos epítomos (porción del antígeno que se une al anticuerpo) a los que todavía no se ha asignado una señal de reconocimiento. En particular, la intensidad de la tinción que aporta el SNA-I es un parámetro muy válido para predecir la recurrencia de cáncer colorrectal [31].

En la construcción de conjugados/inmunotoxinas para terapia antitumoral

Durante los últimos treinta años, las RIPs tipo 1 y tipo 2 se han usado experimentalmente en la producción de fármacos, en particular contra células cancerosas [32,33]. Estos fármacos se construyen química o genéticamente y contienen dos partes: una parte conductora que marca las células deseadas y una parte tóxica, normalmente una RIP. Cuando los conjugados se fabrican químicamente la toxina va unida a un anticuerpo o ligando. Cuando se utiliza la genética, los fármacos creados son el resultado de la fusión de proteínas con dos tipos de dominios,

denominados dominio de marcación y dominio tóxico. Aquellos fármacos cuyo dominio de marcación deriva de anticuerpos, se les conoce como inmunotoxinas. Este tipo de fármacos se utilizan *in vitro* en ensayos clínicos para tratar diferentes tumores. La ricina es la RIP más usada en la construcción de conjugados e inmunotoxinas para focalizar las células tumorales [34].

Algunas RIPs del *Sambucus*, la ebulina I y la nigrina b se han convertido en excelentes candidatos para la fabricación de conjugados e inmunotoxinas debido a la menor toxicidad (unas 100 veces menos) y a la ausencia de toxicidad inespecífica a baja concentración, como la que muestra la ricina [14,16].

Otra de las RIP pertenecientes a la especie *S. nigra*, la SNA-I es potencialmente útil en investigación, tal y como se decía arriba, ya que detecta la presencia de terminaciones Neu5Ac(α -2,6) en la superficie de células tumorales [35]. De hecho la inducción con la correspondiente sialiltransferasa se asocia con el comienzo de diversos cánceres, en particular el de colon [35].

Debido a que la transferrina humana se expresa en la mayoría de las células y su expresión aumenta en células tumorales, también se ha utilizado en combinación con RIPs tipo 2 para la creación de conjugados y son: la transferrina-nigrina b y la transferrina-ebulina I [36]. Ambos han demostrado ser más activos (20-40 veces) en células HeLa (células usadas en investigación científica) que otro tipo de RIPs [14,16].

En terapia antiangiogénica se han construido numerosas inmunotoxinas teniendo como objetivo un marcador de proliferación como es el CD105 (endoglina), correceptor del TGF- β y cuya expresión aumenta con la proliferación de las células endoteliales en la neovascularización de varios tipos de cáncer [37]. Las inmunotoxinas creadas contenían el anticuerpo monoclonal 44G4 unido a nigrina b o a ebulina I [34]. Ambas inmunotoxinas mostraban citotoxicidad, con valores picomolares, por lo que se concluyó que tanto la nigrina b como la ebulina I podrían ser usadas para fabricar potentes inmunotoxinas.

Otro tipo de inmunotoxina, formada por nigrina-b y el anticuerpo monoclonal MJ7 se utilizó contra el mismo marcador de proliferación (CD105) [38]. Se estudió *in vivo* los efectos en ratas a las que se les había inducido un tumor, hasta el punto de ser palpable. Los resultados de la aplicación de la inmunotoxina MJ7-nigrina-b indicaban

que ésta atacaba rápidamente el crecimiento de la neovasculatura formada por el tumor una vez se creaba, cuando la concentración de la inmunotoxina superaba el mínimo requerido para ejercer la citotoxicidad. Este ataque fomentaba la apoptosis de las suficientes células endoteliales para provocar hemorragias en el tumor y promover la fibrosis en el mismo sitio. Dicho efecto se correspondía con el incremento de la expresión del marcador CD105 en el tumor, que provocaba un aumento local de su densidad y esto desencadenaba el aumento de la citotoxicidad de la inmunotoxina.

11. Conclusiones

Las lectinas no son solo moléculas de reconocimiento. Están involucradas en la defensa de la planta contra virus, microorganismos y depredadores, así como en cualquier tipo de estrés al que esté sometida la planta. Algunas de ellas tienen un impacto en la seguridad alimentaria como las RIPs tipo 2 presentes en el saúco, tóxicas a altas concentraciones, como por ejemplo, la ebulina f.

No sólo a nivel vegetal, también son extremadamente útiles en la identificación de los antígenos del grupo sanguíneo. Las lectinas son herramientas importantes para tinciones, histoquímica y sobretodo en la fabricación de conjugados e inmunotoxinas para la investigación contra el cáncer.

A pesar de su importancia y los logros que han conseguido, es necesario que se sigan haciendo más estudios y descubrir el verdadero potencial de estas pequeñas moléculas.

12. Bibliografía

1. Muthamilarasan M, Prasad, M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J Biosci.* (2013). Jun; 38(2): 433-449
2. Peumans WJ, Van Damme EJ. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* (1995) Oct; 109(2): 347-352.
3. Watkins WM. A half century of blood-group antigen research: Some personal recollections. *Trends Glycosci. Glicotechnol.* (1999) 11: 391-411.
4. Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant Soil.* (2003) 252: 55-128.

5. Bender AE, Reaidi GB. Toxicity of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) with particular reference to lectins. *J Plant Foods*. (1982) 4: 15-22.
6. Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. Plant lectins. *Adv. Bot. Res.* (2008) 48: 107-209.
7. Lannoo N, Van Damme EJ. Nucleocytoplasmatic plant lectins. *Biochem. Biophys.* (2010) Acta 1800, 190-201.
8. Rüdiger H, Gabius H-J. The biochemical basis and coding capacity of the sugar code. In *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Gabius H-J, Ed.; Wiley-VCH. Weinheim, Germany. (2009) 3-13.
9. André S, Kozár T, Schuberth R, Unverzagt C, Kojima S, Gabius H-J. Substitutions in the N-glycan core as regulators of biorecognition: The case of core-fucose and bisecting GlcNAc moieties. *Biochemistry*. (2007) 46: 6984-6995.
10. Hardy BJ. The glycosidic linkage flexibility and time-scale similarity hypotheses. *J. Mol. Struct.* (1997) 395-396, 187-200.
11. Murphy PV, André S, Gabius H-J. The third dimension of reading the sugar code by lectins: Design of glycoclusters with cyclic scaffolds as tools with the aim to define correlations between spatial presentation and activity. *Molecules*. (2013) 18: 4026-4053.
12. André S, Kaltner H, Manning JC, Murphy PV, Gabius H-J. Lectins: Getting familiar with translators of sugar code. *Molecules*. (2015) 20: 1788-1823.
13. Stripe F, Battelli MG. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell. Mol. Life Sci.* (2006) 63: 1850-1866.
14. Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Rev. Med. Chem.* (2004) 4: 461-476.
15. Shang C, Van Damme EJM. Comparative analysis of carbohydrate-binding properties of *Sambucus nigra* lectins and ribosome-inactivating proteins. *Glycoconj. J.* (2014) 31: 345-354.
16. Tejero J, Jiménez P, Quinto EJ, Cordoba-Diaz D, Garrosa M, Cordoba-Diaz M et al. Elderberries: a source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity. *Molecules*. (2015) 20: 2364-2387.
17. Iglesias R, Citores L, Ferreras JM, Pérez Y, Jiménez P, Gayoso MJ et al. Sialic acid-binding dwarf elder four-chain lectin displays nucleic acid N-glycosidase activity. *Biochimie*. (2010) 92: 71-80.
18. Lord JM, Roberts LM, Robertus JD. Ricin: structure, mode of action and some current applications. *FASEB J.* (1994) 8: 201-208.

19. Barbieri L, Ciani M, Girbés T, Liu WY, Van Damme EJ, Peumans WJ et al. Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett.* (2004) 563: 219-222.
20. Svinth M, Steighardt J, Hernández R, Suh JK, Kelly C, Day P et al. Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998) 249: 637-642.
21. Pascal JM. 2,8-A crystal structure of a non-toxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins.* (2001) 43: 319-326.
22. Battelli MG, Citores L, Buonamici L, Ferreras JM, de Benito FM, Stirepe F et al. Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: a comparison with ricin. *Arch. Toxicol.* (1997) 71: 360-364.
23. Jiménez P, Córdoba D, Córdoba M, Aracil M, Girbés T. Las toxinas Shiga de *E. coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina. *Industria Farmacéutica. Vol.2.* (2012) 173: 76-82.
24. Battelli MG, Musiani S, Buonamici L, Santi S, Riccio M, Maraldi NM et al. Interaction of volkensin with HeLa cells: Binding, uptake, intracellular localization, degradation and exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* (2004) 61: 1975-1984.
25. Sumner JB, Howell SF. The identification of a hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* (1936) 32: 227-237.
26. Solís D, Bovin NV, Davis AP, Jiménez-Barbero J, Romero A, Roy R et al. A guide into glycosciences: How chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code. *Biochim. Biophys. Acta.* (2015) 1850: 186-235.
27. Gupta G, Surolia A, Sampathkumar SG. Lectin microarrays for glycomic analysis. *Omics.* (2010) 14: 419-436.
28. Danguy A, Akif F Pajak B, Gabius H-J. Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. *Histol. Histopathol.* (1994) 9: 155-171.
29. Roth J. Protein glycosylation in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and cell-type specificity of cell surface glycoconjugate expression: Analysis by protein A-gold and lectin-gold techniques. *Histochem. Cell Biol.* (1996) 106: 79-92-
30. Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem. Cell Biol.* (2011) 136: 117-130.
31. Fernández-Rodríguez J, Feijoo-Carnero C, Merino-Trigo A, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal FJ, de Carlos A et al. Immunohistochemical analysis of sialic acid and fucose composition in human colorectal adenocarcinoma. *Tumour Biol.* (2000) 21: 153-164.

32. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu. Rev. Med.* (2007) 58: 221-237.
33. Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins in the treatment of hematologic malignancies. *Curr. Drug Targets.* (2006) 7: 1301-1311.
34. Ferreras JM, Citores L, Iglesias R, Jiménez P, Girbés T. Use of ribosome-inactivating proteins from *Sambucus* for the construction of immunotoxins and conjugates for cáncer therapy. *Toxins.* (2011) 3: 420-441.
35. Dall'Olio F, Malagolini N, Trinchera M, Chiricolo M. Sialosignaling: Sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta.* (2014) 1840: 2752-2764.
36. Citores L, Ferreras JM, Muñoz R, Benitez J, Jiménez P, Girbés T. Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin I. *Cancer Lett.* (2002) 184: 29-35.
37. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): A powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene.* (2003) 22: 6557-6563.
38. Muñoz R, Arias Y, Ferreras JM, Jiménez P, Langa C, Rojo MA et al. In vitro and *in vivo* effects of an anti-mouse endoglin (CD105)-immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* (2013) 62: 541-551.