



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y
FARMACOLOGÍA.

TESIS DOCTORAL:

Caracterización de los efectos de la administración intraperitoneal de la lectina antinutricional nigrina de corteza de *Sambucus nigra* L. y efecto sinérgico con los polifenoles del té verde.

Presentada por Patricia Cabrero Lobato para optar al grado de doctora por la **Universidad de Valladolid**

Dirigida por:
D. Tomás Girbés Juan y Dña. Pilar Jiménez López

2012

D. Tomás Girbés Juan, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y Dña. Pilar Jiménez López, Profesor Contratado Doctor 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. Patricia Cabrero Lobato puede ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Valladolid, a 21 de Agosto de 2012

Fdo.: Tomás Girbés Juan

Fdo.: Pilar Jiménez López

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando y corrigiendo.

Agradezco en especial al Prof. Tomás Girbés Juan (Dpto. Nutrición y Bromatología, UVA) y a la Profa. Pilar Jiménez (Dpto. Nutrición y Bromatología, UVA) por sus enseñanzas, por haber confiado en mí y haberme acogido en su grupo de investigación, por su paciencia y por la dirección de esta tesis y sus adecuadas correcciones.

Al Prof. Manolo Gayoso por su inestimable ayuda en el manejo del microscopio, sus ánimos y sus comentarios esenciales para la realización de este trabajo.

Al Veterinario Jefe del animalario de la facultad de Medicina, D. Ángel Álvarez Barcia, por su colaboración, predisposición y ayuda.

A los técnicos del departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología, D. Luis Santiago Bucero y a Dña. M^a Teresa Rodríguez Martín, que me enseñaron mucho sobre los aspectos prácticos de las preparaciones histológicas.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por esos buenos momentos entre bambalinas, en especial a Jesús Tejero, José-Ezequiel Basterrechea (Joseba) y Mónica Aracil.

Y finalmente a mi familia que sin sus ánimos y su apoyo moral esto no hubiera sido posible.

Gracias a todos aquellos que me han devuelto una sonrisa, a todos que han puesto de su parte para que el ajetreo diario sea más llevadero...

Gracias a todos.

TRABAJOS CIENTIFICOS EN PREPARACIÓN.

Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, Jesús Tejero, Manuel Gayoso, Damián Córdoba-Díaz and Tomás Girbés

Effects of polyphenol ingestion on the oral toxicity of the lectin nigrin b from elderberry (*Sambucus nigra* L.) in mice.

Food Research International, enviado (número especial) (2012)

Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, Jesús Tejero, Damián Córdoba-Díaz, and Tomás Girbés.

Sensitivity of elderberry lectins to pepsin and effects of heat.

Plant Foods for Human Nutrition, en preparación (2012).

Patricia Cabrero, Jesús Tejero, Damián Córdoba-Díaz, Manuel Gayoso, Tomás Girbés and Pilar Jiménez,

Preparation of nigrin b from dry bark elderberry.

Journal of Food Biochemistry, en preparación (2012)

FINANCIACIÓN.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación, en parte, de los siguientes proyectos:

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

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: 2009-2012

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

COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Patricia Cabrero, Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Manuel J. Gayoso, D. Cordoba, M. Aracil and Tomás Girbés.

Mouse model for the study of the intestinal regeneration.
VI Congress of the Federation of Spanish Biotechnologists.
Madrid, 18-20 Julio 2012.

Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Patricia Cabrero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba and Tomás Girbés.

Sensitivity of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) fruit lectins to a simulated gastric fluid.
22º Congreso de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) y el 37º Congreso de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica y Biología Molecular (FEBS), XXXV SEBBM.

P27-142, Sevilla, 4-9 septiembre de 2012.

Patricia Cabrero, Jesús Tejero, Pilar Jiménez, Manuel J. Gayoso, Damián Córdoba and Tomás Girbés.

Green tea polyphenols enhance the toxicity of nigrin in mice.
22º Congreso de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) y el 37º Congreso de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica y Biología Molecular (FEBS), XXXV SEBBM.

P27-143, Sevilla, 4-9 septiembre de 2012.

Jesús Tejero, Pilar Jiménez, Patricia Cabrero, José E. Basterrechea, Damián Córdoba and Tomás Girbés

Toxicity of the type 2 ribosome-inactivating protein from dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) fruit on mice.

22º Congreso de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) y el 37º Congreso de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica y Biología Molecular (FEBS), XXXV SEBBM

P27-101, Sevilla, 4-9 septiembre de 2012.

ABREVIATURAS.

28S: 28 Svedberg.

2ME: 2-mercaptoetanol.

A₂₃₀: Absorbancia a 230 nm.

A₂₆₀: Absorbancia a 260 nm.

A₂₈₀: Absorbancia a 280 nm.

A₃₂₀: Absorbancia a 320 nm.

A₄₃₂₄: Adenina en posición 4324 del 28S del ARNr.

A₄₆₀: Absorbancia a 460 nm.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosina difosfato.

ANOVA: Análisis de la varianza.

Anti-VIH: Antivirus de la inmunodeficiencia humana.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico.

ARNt: Ácido ribonucleico transferente.

AT-Sepharose: Sepharose tratada con ácido clorhídrico.

BSA: Albúmina bovina sérica.

C: Catequina.

CBC: Base columnar de la cripta.

CG: Catequina galato.

Da: Dalton.

EC: Epicatequina.

ECG: Epicatequina-3-galato.

EGC: Epigalato catequina.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGC: Epigalocatequina.

EGCG: Epigalocatequina-3-galato.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FE: Factor de elongación.

FE-2: Factor de elongación 2.

G₄₃₂₅: Guanina en la posición 4325.

GC: Galocatequina.

GCG: Galocatequina galato.

GDP: Guanosin difosfato.

GTE: Extracto de té verde.

GTP: Guanosina Trifosfato.

H₂O_d: Agua destilada.

I.V.: Intravenosa.

IC₅₀: Concentración de proteína que inhibe el 50 % de la población celular.

IgG: Inmunoglobulina G.

IP: Intraperitoneal.

LD₅₀: Dosis a la que mueren el 50 % de los animales del estudio.

M: Molar.

Mr: Peso molecular relativo.

N.F.: Formulación nacional.

NBT: Cloruro de nitroblue tetrazolium.

Ng b: Nigrina b (obtenida de la corteza).

Ng f: Nigrina f (obtenida de frutos).

O: Oral.

Pancr.: Pancreatina.

PBS: Tampón fosfato salino.

Peps.: Pepsina.

Phe: Fenilalanina.

PNa: Fosfato monosódico.

Pol E: Polyphenon E.

PVDF: Difluoruro de polivinilideno.

RIP: Proteína inactivadora de ribosoma.

rpm: Revoluciones por minuto.

S. *ebulus*: Sambucus ebulus.

S. *nigra*: Sambucus nigra.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SEM: Error estándar de la media.

SGF: Fluido gástrico simulado.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SIF: Fluido intestinal simulado.

SLT: Shiga-like toxins.

TAC: Compartimento de células de amplificación transiente.

TBS: Tampón salino Tris.

TCA: Ácido tricloroacético.

TEMED: Tetrametiletilenodiamina.

TMV: Virus del mosaico del tabaco.

TNBS: Ácido sulfónico-2,4,6-trinitrobenceno.

Tyr: Tirosina.

U.S.P.: Farmacopea de los Estados Unidos.

X-fosfato: 5-Bromo-4-chloro-3-indolylfosfato.

μS: micro-Siemen.

ÍNDICE.

1. Introducción.	14
1.1 Clasificación.	15
1.2 Estructura.	17
1.3 Distribución en la naturaleza.	18
1.4 Actividad enzimática.	20
1.4.1 Actividad antirribosómica.	20
1.4.2 Glucosidasa de polinucleótidos.	24
1.4.3 Acción específica sobre ARNm.	24
1.4.4 Otras actividades sobre ADN.	24
1.4.5 Actividad lipasa.	25
1.4.6 Apoptosis inducida por RIPs.	25
1.4.7 Actividades antivirales.	26
1.4.8 Actividad bifuncional.	27
1.4.9 Otras actividades enzimáticas.	27
1.5 Toxicidad.	27
1.6 Uso de las RIPs en aplicaciones médicas.	29
1.6.1 Como abortivo.	29
1.6.2 Como anticanceroso.	30
1.6.3 En inmunotoxinas y otros conjugados.	30
1.7 Proteínas de la familia <i>Sambucaceae</i>.	31
1.7.1 RIPs tipo I.	33
1.7.2 RIPs tipo II heterodiméricas.	33
1.7.3 RIPs tipo II tetraméricas.	34
1.7.4 Lectinas monoméricas.	35
1.7.5 Lectinas homodiméricas.	36
1.7.6 Similitudes entre proteínas del género <i>Sambucus</i>.	37
1.7.7 Estructura de la ebulina I.	38
1.7.8 Actividad enzimática de nigrinas y ebulinas.	39

1.7.9 Actividad en células y animales.	41
1.7.10 Usos biomédicos de las RIPs de <i>Sambucus</i>.	42
1.8 Nigrina b.	43
1.8.1 Hemoaglutinación.	44
1.8.2 Toxicidad <i>in vivo</i>.	44
1.8.3 Efectos celulares de la toxicidad a nivel intestinal.	46
1.8.4 Aplicaciones biomédicas de la nigrina b en la construcción de conjugados e inmunotoxinas.	48
1.9 Implicaciones inmunológicas de las proteínas de <i>Sambucus nigra</i>.	50
1.10 Polifenoles del té verde.	51
2. Objetivos.	53
3. Materiales y métodos experimentales.	56
3.1 Materiales.	57
3.1.1 Equipos.	57
3.1.2 Material fungible.	58
3.1.3 Reactivos químicos.	59
3.1.4 Materiales biológicos.	61
3.1.4.1 Vegetales.	61
3.1.4.2 Anticuerpos.	62
3.1.4.3 Sangre.	62
3.1.4.4 Animales de experimentación.	62
3.2 Métodos experimentales.	64
3.2.1 Preparación de disoluciones y filtración.	64
3.2.2 Esterilización.	65
3.2.3 Purificación de proteínas de corteza de <i>Sambucus nigra</i> L.	65
3.2.3.1 Preparación de la resina Sepharose 6B tratada con ácido.	65
3.2.3.2 Preparación de las membranas de diálisis.	66
3.2.3.3 Material biológico de partida.	67
3.2.3.4 Proceso de extracción de nigrina b.	68

3.2.3.5 Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose 6B.	69
3.2.3.6 Cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75.	71
3.2.3.7 Diálisis de proteínas.	72
3.2.3.8 Concentración de proteínas.	73
3.2.4 Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr.	74
3.2.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.	75
3.2.6 Detección de la actividad hemoaglutinante de eritrocitos.	77
3.2.7 Purificación de proteínas de frutos de <i>Sambucus nigra</i> L.	78
3.2.8 Operaciones con ratones.	79
3.2.8.1 Administración de sustancias.	79
3.2.8.1.1 Vía oral.	79
3.2.8.1.2 Vía intraperitoneal.	80
3.2.8.2 Control de peso, anestesia y eutanasia de los ratones.	80
3.2.8.3 Obtención de muestras.	81
3.2.8.3.1 Sangre.	81
3.2.8.3.2 Órganos.	82
3.2.8.4 Limpieza de intestinos.	82
3.2.8.5 Determinación de la longitud de los intestinos.	83
3.2.9 Actividad mieloperoxidasa por el procedimiento de la O-dianisidina.	83
3.2.10 Estudio de la mortalidad en ratones promovida por Polyphenon E en combinación con nigrina b.	85
3.2.11 Determinación histológica de los efectos del Polyphenon E.	86
3.2.11.1 Perfusión de los animales.	87
3.2.11.2 Toma de muestras de los tejidos.	87
3.2.11.3 Inclusión de los tejidos en parafina.	88
3.2.11.4 Realización de cortes de tejido.	88
3.2.11.5 Tinción con hematoxilina/eosina.	89
3.2.11.6 Visualización al microscopio óptico.	90
3.2.12 Digestibilidad de la nigrina b.	90

3.2.12.1 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la nigrina b.	90
3.2.12.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la nigrina f.	92
3.2.12.3 Digestibilidad de las proteínas de un jarabe comercial de saúco.	92
3.2.13 Obtención de anticuerpos policlonales.	93
3.2.13.1 Por inyección del antígeno en ganglio poplíteo.	93
3.2.13.2 Purificación de anticuerpos policlonales de suero de conejo.	94
3.2.14 Electrotransferencia de proteínas a membranas “Western blot”.	95
3.2.15 Inmunodetección de proteínas.	96
3.2.16 Farmacocinética de la nigrina b en suero.	97
3.2.17 Análisis estadístico.	98
4. Resultados.	99
4. 1 Aislamiento de nigrina b de corteza de <i>S. nigra</i> .	100
4.1.1 Obtención de nigrina b.	100
4.1.2 Caracterización químico-física y funcional de las lectinas de corteza de <i>S. nigra</i> .	105
4.1.3 Sensibilidad de las lectinas de corteza de <i>S. nigra</i> a pepsina ácida.	112
4.1.4 Sensibilidad de las lectinas de corteza de <i>S. nigra</i> a pancreatina.	114
4.1.5 Extracción de las lectinas de los frutos de <i>S. nigra</i> .	116
4.1.6 Sensibilidad de las lectinas de frutos de <i>S. nigra</i> a pepsina ácida.	118
4.1.7 Sensibilidad de las lectinas de jarabe de saúco a pepsina ácida.	120
4.1.8 Farmacocinética de nigrina b en sangre de ratones.	122
4.2 Estudios del modelo de nigrina b.	122
4.2.1 Efectos de la nigrina b sobre la longitud de los intestinos.	122
4.2.2 Efecto de la nigrina b sobre la actividad mieloperoxidasa en ratones.	124
4.3 Estudio de toxicidad.	126
4.3.1 Toxicidad de nigrina b en ratones.	126
4.3.2 Toxicidad de Polyphenon E en ratones.	129
4.4 Análisis histológico.	143
4.4.1 Efectos de la administración de nigrina b a ratones.	143
4.4.2 Efectos de la administración de Polyphenon E a ratones.	152

5. Discusión.	163
6. Conclusiones.	175
7. Referencias.	178

1. INTRODUCCIÓN.



En numerosos estudios se ha visto como muchas plantas contienen unas proteínas capaces de inactivar ribosomas, denominadas *Ribosome-Inactivating Proteins* (RIPs), que provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas. En el siglo XIX se asoció la alta toxicidad de las semillas de ricino, a la presencia de RIPs, pero sólo en 1987 el grupo de Endo encontró dicha actividad enzimática asociada a la cadena A de la ricina. (Ferrerías y cols., 2010; Endo y cols., 1987).

Desde el aislamiento y caracterización de la ricina se han identificado muchas proteínas relacionadas estructural y funcionalmente, en una gran variedad de plantas (Peumans y cols., 2001; Barbieri y cols., 1993). El interés en estas proteínas se debe a sus posibles aplicaciones médicas y terapéuticas, debido a que presentan una mayor toxicidad frente a células tumorales que frente a las normales, ofreciendo la oportunidad de desarrollar tratamientos antitumorales dirigidos. Una vez conocidos los mecanismos enzimáticos, se podrán utilizar las propiedades de las RIPs hacia diversas aplicaciones como inmunotoxinas (Peumans y cols., 2001), abortivos (Peumans y cols., 2001; Yeung y cols., 1988) y Anti-VIH (Peumans y cols., 2001; McGrath y cols., 1989), entre otras.

1.1 Clasificación.

Las RIPs se clasifican en dos grupos, RIPs tipo I que constan de una única cadena polipeptídica con actividad enzimática, de aproximadamente unos 30 KDa, (existen algunas excepciones) y las RIPs tipo II que consisten en dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro:

cadena A (similar a las RIP tipo I) con actividad enzimática de aproximadamente unos 30 KDa, y la cadena B de aproximadamente 35 KDa con propiedades lectina. La cadena B se une a los receptores de la superficie celular, facilitando la entrada de las RIPs en las células (Ferrerías y cols., 2010; Girbés y cols., 2004b; Stirpe y Battelli, 2006).

También se propuso las denominaciones de Holo-RIPs para aquellas con una única cadena polipeptídica o bien dos cadenas polipeptídicas pequeñas, es decir, RIPs tipo I, y Quimero-RIPs para aquellas proteínas de dos cadenas (RIPs tipo II y excepciones del tipo I) (Stirpe y Battelli, 2006). Pero la mayoría de los autores prefieren la nomenclatura inicial, que se basa en la clasificación en función de la ausencia (RIPs tipo I) o presencia (RIPs tipo II) de la cadena lectina, considerando como excepciones de las RIPs tipo I a aquellas RIPs con un segmento adicional (Stirpe y Battelli, 2006; Reinbothe y cols., 1994), Figura I1.

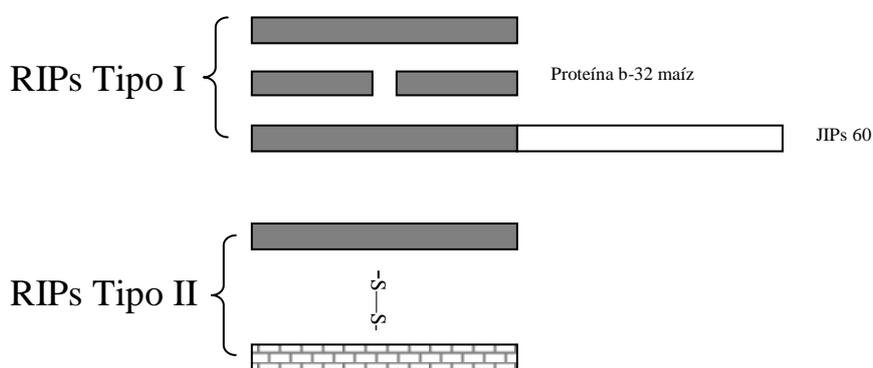


Fig. I1 Representación de los tipos de RIPs. Barra gris: la cadena con actividad enzimática; barra blanca: función desconocida; barra enladrillada: actividad lectina (Girbés y cols., 2004b; Reinbothe y cols., 1994).

1.2 Estructura.

Las cadenas A de las RIPs tipo II, poseen una alta homología con las cadenas de las RIPs tipo I. Esta homología también se encuentra entre las cadenas B de las diferentes RIPs tipo II. La similitud entre las secuencias amino terminales y las secuencias del núcleo estructural de las RIPs son mucho mayor que entre las secuencias carboxilo terminales. Estas diferencias en el grado de conservación explican porque algunas de las actividades principales están conservadas entre todas las RIPs, mientras que otras actividades no (Peumans y cols., 2001; Hartley y cols., 1996).

Gracias a la difracción de rayos X se ha determinado la estructura tridimensional de algunas RIPs, permitiendo comprender algunas de sus funciones. La primera resolución espacial de una RIP fue la de la ricina (Peumans y cols., 2001; Montfort y cols., 1987). La ricina es un heterodímero glucosilado, globular unido por un puente disulfuro. En la cadena A se distinguen tres dominios individuales. Una hendidura en la interfaz de los tres dominios forma el centro activo responsable de la actividad ARN N-glucosidasa. La cadena B es una estructura con forma bilobular compuesta por dos dominios homólogos; cada dominio presenta un sitio de unión a D-galactosa.

Se ha determinado la estructura espacial de varias RIPs tanto de tipo I como de tipo II. En general la estructura terciaria de las diferentes RIPs se encuentra conservada, como se demuestra por el hecho de que el carbono α , en la mayoría de las RIPs es superponible virtualmente. Sin embargo, hay importantes diferencias, especialmente en la región del carboxilo terminal y

en la estructura de la horquilla. Dichas diferencias podrían explicar las diferentes funciones y especificidades de sustrato de las diversas RIPs (Peumans y cols., 2001).

1.3 Distribución en la naturaleza.

El mayor número de RIPs se ha encontrado en el reino vegetal, principalmente entre un pequeño grupo de familias como *Caryophyllaceae*, *Sambucaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Phytolaccaceae* y *Poaceae*. Esto se debe a que la mayoría de las investigaciones se centraron en la búsqueda de plantas con altas concentraciones de RIPs pero de aquellas familias que de antemano se sabía que las contenían (Girbés y cols., 2004b).

Las RIPs pueden estar presentes en uno o más tejidos de la planta, incluso en más de una forma, por ejemplo la ricina está presente únicamente en las semillas de las plantas de ricino, mientras la saporina está presente en varias formas en todos los tejidos de la saponaria (Stirpe y Battelli, 2006; Ferreras y cols., 1993). A veces, ambos tipos de RIPs (I y II) han sido encontrados en la misma planta como en el caso del género *Sambucus*, y las especies *Cinnamomum camphora* e *Iris hollandica* (Girbés y cols., 2004b; Stirpe y Battelli, 2006). En plantas la expresión de las RIPs se ve modificada a través de diversos factores como la senescencia (Girbés y cols., 2004b; Stirpe y cols., 1996), desarrollo (Girbés y cols., 2004b; Reinbothe y cols., 1994), estrés (Girbés y cols., 2004b; Stirpe y Battelli, 2006), infección viral (Girbés y cols., 2004b; Girbés y cols., 1996), y

contaminación por microorganismos (Stirpe y Battelli, 2006). Las RIPs de tipo I son las más abundantes, se han encontrado en diferentes concentraciones en muchas plantas, incluso en algunas comestibles crudas como espinacas y tomates (Stirpe y Battelli, 2006).

Con el descubrimiento de las RIPs de tipo II en *Sambucus* (Girbés y cols., 2004b; Girbés y cols., 1993b; Girbés y cols., 1993c), se produjo una gran revolución, puesto que en este grupo sólo se conocían las proteínas ricina, abrina, viscumina, modicina y volkensina (Barbieri y cols., 1993; Girbés y cols., 2004b) altamente tóxicas, al contrario que las proteínas aisladas del *Sambucus*, denominadas nigrinas y ebulinas (Girbés y cols., 2004b; Girbés y cols., 1993b; Girbés y cols., 1993c) que poseen la característica de ser más activas a nivel molecular que la ricina y sin embargo carecen de su alta toxicidad. Después de conocer que las plantas poseían RIPs del tipo II no tóxicas, se identificaron y estudiaron un gran número de ellas, muchas de las cuales habían pasado desapercibidas probablemente debido a sus características intrínsecas. En Girbés y cols., 2004b, se presenta un listado completo de RIPs.

Otro descubrimiento importante fue el de la aralina, una RIP tipo II tóxica, proveniente de los brotes de *Aralia elata*, descrita como comestible, pues la RIP es destruida al cocinarla, además de encontrarse en unas concentraciones lo suficientemente bajas como para no ser dañina a través de la ingesta (Tomatsu y cols., 2004). Esto sugiere que otras RIPs tipo II tóxicas desconocidas pueden estar presentes en otras plantas que no han sido analizadas debido a que no son tóxicas.

1.4 Actividad Enzimática.

Muestran una actividad enzimática variada, muchas de las cuales pueden ser un reflejo de sus actividades sobre el ARN y otras pueden ser actividades completamente nuevas. A continuación se describen las más relevantes (revisado en Girbés y cols., 2004b).

1.4.1 Actividad Antirribosómica.

En el 1987 el grupo dirigido por Endo publicó el mecanismo molecular de acción de la ricina, involucrado en la inhibición de la síntesis de proteínas. La ricina y otras RIPs son N-glucosidasas que rompen el enlace N-glucosídico que une a la A₄₃₂₄ al esqueleto polifosfato del 28S ARNr de hígado de rata (Endo y cols., 1987; Girbés y cols., 2004b), figura I2.

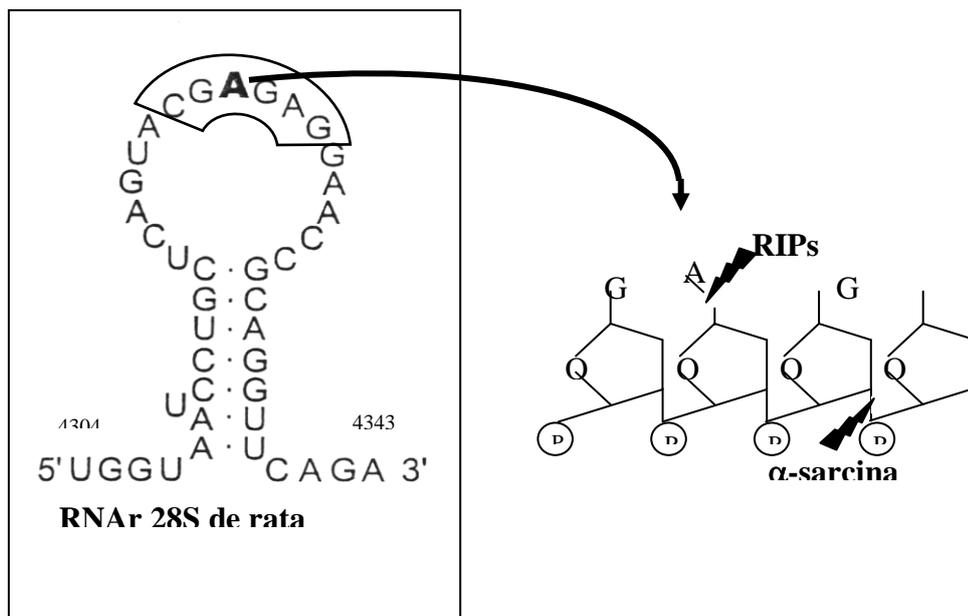


Figura I2. Secuencia de nucleótidos del bucle altamente conservado del ARNr sobre el que actúan las RIPs (Ferrerías y cols., 2000).

Esta adenina se encuentra en una horquilla altamente conservada en diferentes especies, llamada horquilla ricina/sarcina, siendo esencial para la interacción del factor de elongación 2 (FE-2) en eucariotas, o G (FE-G) en procariotas (Iglesias y cols., 1993b).

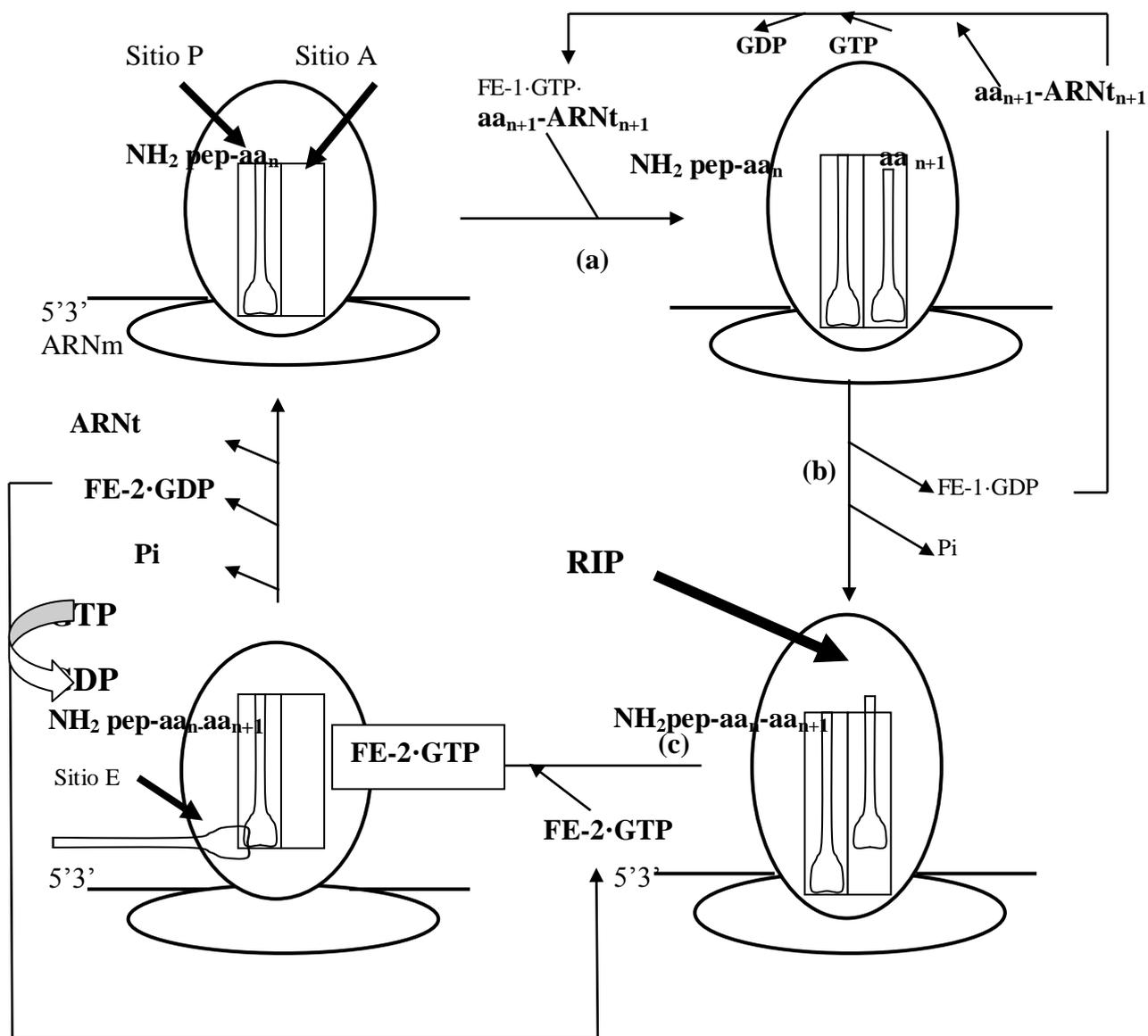


Figura I3. Alteración de la etapa de elongación en la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos por la acción catalítica de las RIPs. La acción de las RIPs impide la interacción del ribosoma con el factor de elongación G, en procariotas, o bien 2, en eucariotas, interrumpiendo la síntesis de proteínas ya que no es posible la traslocación del peptidil-ARNt del sitio ribosómico aceptor (A) al sitio donador (P). Las

letras entre paréntesis representan las distintas subetapas de la elongación: (a) fijación del peptidil-ARNt, (b) formación del enlace peptídico y (c) translocación.

La elongación de las cadenas polipeptídicas (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007; Youngman y Green, 2007; Wilson y Nierhaus, 2006; Spiegel y cols., 2007) se sucede en tres fases (figura I3):

1. Fijación de aminoacil-ARNt al sitio ribosómico aceptor (A).
2. Formación del enlace peptídico entre el peptidil-ARNt, en el sitio ribosómico donador (P), y el aminoacil-ARNt, en el sitio A.
3. Translocación del nuevo peptidil-ARNt desde A a P, con la salida del ARNt deacilado de P, y el avance del ribosoma respecto al ARNm en la longitud de un codon.

La unión del aminoacil-ARNt se lleva a cabo en forma de complejo, con el factor de elongación (FE) 1 (eucariotas) o Tu (procariotas) y GTP. La energía liberada por la hidrólisis de GTP se utiliza en la separación de los factores 1 o Tu (Girbés y cols., 1976).

Una vez ubicado el peptidil-ARNt en el sitio P y el nuevo aminoacil-ARNt en el sitio A, se forma el enlace peptídico entre el peptidilo y el aminoacilo, obteniéndose un peptidil-ARNt con un aminoácido más, localizado ahora en el sitio A.

Posteriormente se transloca, promovido por el factor de elongación 2 (eucariontes) o G (procariontes), en forma de complejo con GTP. Después

se produce la hidrólisis. La energía producida se usa en la liberación del ARNt deacilado, presente en el sitio de salida del ARNt, o sitio E (Spiegel y cols., 2007), y los factores de translocación 2 o G (Modolell y cols., 1975; Girbés y cols., 1976; Spiegel y cols., 2007). La depurinación del ARNr impide al ribosoma fijar estos factores, interrumpiendo la síntesis de proteica en la etapa de translocación de las cadenas polipeptídicas (figura I3).

Las RIPs también inactivan ribosomas de insectos (Girbés y cols., 2004b; Ferrari y cols., 1991), hongos (Girbés y cols., 2004b; Park y cols., 2002) y en algunos casos los ribosomas de plantas, bacterias y arqueobacterias, y por un mecanismo de acción similar también actúan en mamíferos (Girbés y cols., 2004b; Iglesias y cols., 1993a; Girbés y cols., 1993a).

La horquilla diana para las RIPs también es una diana para otros inhibidores de la síntesis de proteínas como las ARNasas de la familia α -sarcina, mitogillina, restrictocina y tricholina (Girbés y cols., 2004b; Endo y Wool, 1982; Fando y cols., 1985), que hidrolizan el enlace fosfodiéster en el extremo 3' de la G₄₃₂₅.

1.4.2 Glucosidasa de polinucleótidos.

Investigaciones posteriores revelaron que las RIPs podían eliminar adeninas de cualquier tipo de ácido nucleico: ARNr, ARNt, ARNm, ARN vírico, e incluso ADN (Girbés y cols., 2004b; Bolognesi y cols., 2002; Barbieri y cols., 1997; Barbieri y cols., 1994). Esta amplitud de sustrato para la actividad enzimática puede ser la responsable de algunas de las propiedades atribuidas a las RIPs como la actividad antivírica (Barbieri y cols., 1993; Girbés y cols., 2004b; Hartley y cols., 1996; Wang y Tumer, 2000), promoción de la senescencia (Girbés y cols., 2004b; Stirpe y Battelli, 1996) y apoptosis por modificación del ADN (Girbés y cols., 2004b). Con este nuevo descubrimiento se propuso el cambio de nombre de las RIPs a Glucosidasas de Polinucleótidos de Adenina (E.C.3.2.2.22).

1.4.3 Acción específica sobre ARNm.

PAP es capaz de unirse al “cap” del mensajero y luego promover la depurinación del ARNm en sentido 5’ a 3’, logrando la inactivación del ARNm. Lo que permite a PAP regular el nivel de expresión de su propio ARNm (Girbés y cols., 2004b).

1.4.4 Otras Actividades sobre ADN.

Una serie de estudios revelaron otras posibles actividades como la nucleasa (Girbés y cols., 2004b; Go y cols., 1992) y topoisomerasa (Girbés

y cols., 2004b; Nicolás y cols., 1998). Estudios posteriores mostraron que tras una purificación cuidadosa de las RIPs, la actividad ADNasa desaparecía, siendo probable que dicha actividad se debiera a alguna contaminación presente en la preparación (Girbés y cols., 2004b; Day y cols., 1998).

1.4.5 Actividad lipasa.

La cadena A de la ricina se une a las vesículas fosfolipídicas cargadas negativamente, desestabilizando la bicapa lipídica (Girbés y cols., 2004b; Day y cols., 2002) Estudios con cinnamomina (RIP tipo II) indican que la proteína forma canales catiónicos en la bicapa lipídica (Girbés y cols., 2004b). Según otros estudios la ricina presenta actividad lipasa, que podría estar relacionada con la translocación a través de membranas intracelulares (Girbés y cols., 2004b; Lombard y cols., 2001).

1.4.6 Apoptosis inducida por RIPs.

Inmunotoxinas que contenían saponina y bouganina inhibían la síntesis celular de proteínas, inducían apoptosis, y bloqueaban el crecimiento clonogénico de células diana (Stirpe y Battelli, 2006; Bolognesi y cols., 2000). Las RIPs activan varias vías de apoptosis por ejemplo: Viscumina produce la activación de la vía de las caspasas y disminuye la expresión del antiapoptótico Mcl-1; tricosantina activa la vía dependiente del óxido nítrico (NO) y también induce la producción de especies reactivas de

oxígeno; también cabe destacar la ricina, la abrina y las toxinas Shiga y SLT (Shiga-like toxins) (Stirpe y Battelli, 2006).

1.4.7 Actividades antivirales.

Algunas RIPs de tipo I y II estudiadas, tienen actividad antiviral contra plantas, hongos y virus animales (Stirpe y Battelli, 2006; Wang y Tumer, 2000; Parikh y Tumer, 2004).

La actividad antiviral frente virus animales, han permitido múltiples estudios, especialmente con PAP y Tricosantina (Stirpe y Battelli, 2006; Parikh y Tumer, 2004) en células infectadas con VIH. Estas RIPs inhiben la enzima integrasa VIH-1, siendo por ello, una herramienta potencial para la inhibición de la replicación viral (Girbés y cols., 2004b; Lee-Huang y cols., 1991).

Finalmente, las RIPs pueden inducir un aumento en la resistencia a virus mediante la estimulación de otros sistemas de defensa de la planta. También tienen actividad antifúngica, antibacteriana e insecticida (Stirpe y Battelli, 2006; Nielsen y Boston, 2001).

1.4.8 Actividad bifuncional.

Cultivos celulares de *Trichosanthes kirilowii* producen enzimas de defensa para la planta bifuncionales con actividad chitinasa y RIP (Girbés y cols., 2004b; Shih y cols., 1997).

1.4.9 Otras actividades enzimáticas.

Se ha descrito la inhibición de la poli (ADP-ribosa) polimerasa involucrada en la reparación del ADN (Girbés y cols., 2004b; Barbieri y cols., 2003). Posiblemente sea esta la base para otras actividades desempeñadas por las RIPs como la apoptosis o las antivíricas (Girbés y cols., 2004b).

1.5 Toxicidad.

Al principio de los años 70, la toxicidad era la única razón por la que la comunidad científica prestaba atención a las RIPs. La toxicidad de las RIPs tipo II es a menudo mayor que las de tipo I. Además la toxicidad hacia las células se correlaciona con la toxicidad hacia animales y humanos, aunque con algunas excepciones (Stirpe y Battelli, 2006; Lord y cols., 2003). Las diferencias en la toxicidad de diversas RIPs se asocian a la ausencia o presencia de cadena B, cuya actividad lectina específica para D-galactosa, N-acetil-galactosamina permite la unión de las RIPs a la membrana celular y facilita su proceso de endocitosis. La ausencia de la cadena B limita la

entrada de las RIP tipo I en las células, lo que justifica su baja toxicidad en células y animales (Stirpe y Battelli, 2006).

A su vez las RIPs tipo II han sido subdivididas en dos grupos en función de sus diferencias en la toxicidad: tóxicas y no tóxicas. La toxicidad entre un tipo y otro puede variar en tres órdenes de magnitud (Stirpe y Battelli, 2006; Battelli, 2004a). Entre las propias tóxicas hay diferencias como en el caso de la abrina, volkensina y la toxina de *Adenia stenodactyla* que son más potentes que la ricina (Stirpe y Battelli, 2006; Audi y cols., 2005; Pelosi y cols., 2005). La razón para esta diferencia de toxicidad podría radicar en diversos factores como la unión a determinados receptores, la entrada en las células y/o el destino intracelular, la degradación y la exocitosis de las proteínas (Stirpe y Battelli, 2006). Descartado queda el número de receptores ya que en las células HeLa hay más receptores para ricina que para volkensina (Stirpe y Battelli, 2006; Battelli y cols., 2004b) siendo esta última más tóxica.

Las lesiones que han mostrado algunos animales a los cuales se les ha suministrado RIPs de tipo II son diferentes de las lesiones causadas por otras proteínas inhibidoras de las síntesis de proteínas, que no dan lugar a lesiones necróticas o a apoptóticas, como se ha visto en el caso de la ricina, entre otras. Lo que sugiere una segunda actividad aparte de la inactivación de ribosomas. Un factor importante es la producción de citoquinas, que pueden ser liberadas por macrófagos dañados por las RIPs (Barbieri y cols., 1993; Stirpe y Battelli, 2006), pudiendo causar reacciones inflamatorias y apoptosis (Stirpe y Battelli, 2006).

Muchas, probablemente todas las RIPs, causan alergias. Los primeros síntomas alérgicos se observaron en mujeres a las que se les había suministrado para abortar la proteína tricosantina (RIP tipo I) (Stirpe y Battelli, 2006), en pacientes tratados con inmunotoxinas que contenían RIPs (Stirpe y Battelli, 2006), y entre personal de investigación en este campo (Stirpe y Battelli, 2006; Szalai y cols., 2005). Desde que se conoce la presencia de RIPs en vegetales comestibles crudos (Girbés y cols., 2004b; Stirpe y Battelli, 2006), las propiedades alérgicas de estas proteínas, juegan un importante papel en la respuesta alérgica de algunos vegetales.

1.6 Usos de las RIPs en aplicaciones médicas.

Las RIPs se han utilizado en numerosas aplicaciones (revisado ampliamente por Stirpe y Battelli, 2006):

1.6.1 Como abortivo.

La tricosantina era usada en la antigua China como una medicina abortiva. Actualmente las RIPs no causan el aborto en el sentido clásico de la palabra (inducción de contracciones o un desbalance hormonal) sino que causan la muerte del feto matando los sincitoblastos, que son muy sensibles a estas proteínas.

1.6.2 Como anticanceroso.

La conocida actividad anticáncer del extracto de muérdago se debe a la RIP tóxica de tipo II, viscumina, y el extracto de la *X. americana* que se usaba en África para tratar el cáncer contiene la RIP tipo II tóxica, riproximina. Estas y otras RIPs pueden ser beneficiosas para pacientes con cáncer, no sólo porque actúan directamente sobre las células cancerosas sino que también provocan una fuerte estimulación del sistema inmune e inducen la producción de citoquinas.

1.6.3 En Inmunotoxinas y otros conjugados.

Algunas RIPs han sido unidas a transportadores como hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos y lectinas, capaces de liberarlos de manera selectiva en una célula específica. Para ello, se han usado RIPs tipo I y RIPs tipo II pero sin la cadena B, ya que ésta es capaz de unirse a cualquier célula. En la mayoría de los casos el uso de inmunotoxinas se ha centrado en el uso para la terapia contra el cáncer, aportando resultados alentadores, sobre todo en animales con tumores transplantados y en pacientes con varios tipos de cáncer, especialmente de tipo hematológico (Stirpe y Battelli, 2006; Frankel y cols., 2003), pero menos efectivos en tumores sólidos por la débil penetración de las RIPs.

En comparación con otros tratamientos, las inmunotoxinas con RIPs son muy potentes, actúan de manera específica aunque las células estén en división y no inducen resistencia. Pero también presentan ciertas

dificultades, como la formación de anticuerpos frente al complejo anticuerpo-RIP, con la consecuente reacción alérgica e incluso shock anafiláctico, otras posibles reacciones adversas son la hepatotoxicidad, insuficiencia renal, fatiga, mialgia, fiebre, etc. Para contrarrestar, por ejemplo, la respuesta inmune frente al complejo anticuerpo-RIP se puede evitar usando anticuerpos humanizados y las consecuencias a la respuesta ante la RIP pueden ser superadas con ciclos de terapia con una rotación inmunológica de diferentes RIPs.

Otra posibilidad es el uso de las inmunotoxinas a través de una administración intravesicular, de esta forma, las inmunotoxinas son externas al organismo y probablemente no causen respuesta inmune y a la vez su toxicidad sea mínima, permitiendo una mayor concentración en células cancerosas (Stirpe y Battelli, 2006) y las inmunotoxinas antimusculares pueden ser un tratamiento potencial para los espasmos musculares (Stirpe y Battelli, 2006), miastenias (Stirpe y Battelli, 2006; Hossann y cols., 2006) y estrabismo por la destrucción de los músculos oculomotores (Stirpe y Battelli, 2006; Campos y cols., 2002).

1.7 Proteínas de la familia *Sambucaceae*.

Los estudios sobre las RIPs han conseguido cambiar nuestras perspectivas sobre estas proteínas, y han potenciado el interés hacia sus posibles aplicaciones médicas como en el caso del cáncer y el SIDA, entre otras enfermedades. Una de las familias de RIPs más importantes es la *Sambucaceae* que contiene el género *Sambucus*, en la que en los últimos

años se han encontrado unas 40 RIPs y lectinas relacionadas estructuralmente. La complejidad y el gran número de RIPs encontradas en *Sambucus* hacen a esta familia un modelo ideal para estudios de la expresión, distribución y variaciones estacionales de expresión con el objetivo de obtener más información para definir su papel biológico (Ferrerías y cols., 2010). El género *Sambucus* está compuesto por alrededor de 20 especies (Ferrerías y cols., 2010). Principalmente son arbustos pero pueden llegar a desarrollarse hasta árboles pequeños. Son originarios de Europa, Asia Occidental y África septentrional, y requieren de climas templados o subtropicales. En ocasiones pueden presentar un olor muy característico (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003). Principalmente se ha estudiado la presencia de RIPs y lectinas en *Sambucus ebulus* L., *Sambucus nigra* L., *Sambucus sieboldiana* y *Sambucus racemosa* L. (Ferrerías y cols., 2010).

Las proteínas que se han encontrado en el *Sambucus* se dividen en tres grupos: RIPs tipo I, RIPs tipo II y homolectinas puras. A su vez las RIPs tipo II 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 también por un puente disulfuro. El tercer grupo (homolectinas) presentan actividad lectina. Se subdividen en dos grupos bien homodiméricas, es decir, dos cadenas tipo B, unidas por un puente disulfuro, o bien monoméricas, una cadena tipo B. Estas cadenas B son estructuralmente y funcionalmente muy similares a las cadenas B de las RIPs tipo II (Ferrerías y cols., 2010).

1.7.1 RIPs tipo I.

Tabla I1. Revisado en Ferreras y cols., 2010.

ESPECIE	FUENTE	Nombre RIPs	Mr aparente
<i>S. ebulus</i>	Hojas	Ebulitina α	32.000
	Hojas	Ebulitina β	29.000
	Hojas	Ebulitina γ	29.000
<i>S. nigra</i>	Frutos	Nigritina f1	24.000
	Frutos	Nigritina f2	23.500

Nigritina f1 se encuentra en las mismas proporciones tanto en frutos verdes como maduros, sin embargo la nigritina f2 sólo se encuentra en frutos maduros. Lo que nos indica que la nigritina f1 es una proteína constitutiva, mientras la nigritina f2 es inducible durante la maduración del fruto (Ferreras y cols., 2010; de Benito y cols., 1998).

1.7.2 RIPs tipo II Heterodiméricas.

Tabla I2. Revisado en Ferreras y cols., 2010.

ESPECIE	FUENTE	Nombre RIPs	Mr aparente
<i>S. ebulus</i>	Hojas	Ebulina 1	56.000
	Rizoma	Ebulina r1	56.000
	Rizoma	Ebulina r2	56.000
	Frutos	Ebulina f	56.000

Tabla I2 continuación. Revisado en Ferreras y cols., 2010.

ESPECIE	FUENTE	Nombre RIPs	Mr aparente
<i>S. nigra</i>	Corteza	Nigrina b	58.000
	Corteza	SNA I'	134.000
	Corteza	SNLRP1	64.000
	Corteza	SNLRP2	64.000
	Corteza	Nigrina bb	64.000
	Hojas	Nigrina 11	60.000
	Hojas	Nigrina 12	60.000
	Frutos	Nigrina f	57.900
	Semillas	Nigrina s	57.300
<i>S. sieboldiana</i>	Corteza	Sieboldina b	60.000
<i>S. racemosa</i>	Corteza	Racemosina	58.000

Algunos estudios indican que la corteza de *S. racemosa* carece de RIPs tipo II con unión a D-galactosa pero exhibe actividades tipo RIP en la fracción de la proteína que no se une a la D-galactosa (resultados no publicados; Ferreras y cols., 2010).

1.7.3 RIPs tipo II Tetraméricas.

Tabla I3. Revisado en Ferreras y cols., 2010. * SNAflu-I puede que sea la homóloga a la SNA I pero en flores (Ferreras y cols., 2010; Karpova y cols., 2007).

ESPECIE	FUENTE	Nombre RIPs	Mr aparente
<i>S. ebulus</i>	Raíces	SEA	134.000
<i>S. nigra</i>	Corteza	SNA I	140.000

Tabla I3 continuación. Revisado en Ferreras y cols., 2010. * SNAflu-I puede que sea la homóloga a la SNA I pero en flores (Ferreras y cols., 2010; Karpova y cols., 2007).

ESPECIE	FUENTE	Nombre RIPs	Mr aparente
<i>S. nigra</i>	Frutos	SNA If	136.000
	Inflorescencia	SNAflu-I *	120.000
<i>S. seboldiana</i>	Corteza	SSA	132.000
<i>S. racemosa</i>	Corteza	SRA	120.000

La subunidad lectina asociada a las proteínas tetraméricas se une a la secuencia Neu5Ac(α -2,6)Gal/GalNAc. Lo que hace a las lectinas únicas y diferentes de cualquier otra RIP tipo II (Ferreras y cols., 2010).

1.7.4 Lectinas monoméricas.

Estas lectinas carecen de actividad N-glucosidasa.

Tabla I4. Revisado en Ferreras y cols., 2010.

ESPECIE	FUENTE	Nombre RIPs	Mr aparente
<i>S. ebulus</i>	Hojas	SELIm	34.000
	Rizomas	SEAI	33.500
<i>S. nigra</i>	Hojas	SNAIm	30.000
	Hojas	SNA IVI	30.000
	Corteza	SNA II	30.000
	Frutos	SNA IV	30.000
	Semillas	SNA III	33.000
<i>S. seboldiana</i>	Corteza	SSA-b-3	35.000
	Corteza	SSA-b-4	33.000
<i>S. racemosa</i>	Corteza	SRLbm	30.000

1.7.5 Lectinas homodiméricas.

Tabla I5. Revisado en Ferreras y cols., 2010. * Pequeñas lectinas que contienen una parte de la cadena B truncada.

ESPECIE	FUENTE	Nombre RIPs	Mr. aparente
<i>S. ebulus</i>	Hojas	SELld	68.000
	Frutos	SELfd	68.000
<i>S. nigra</i>	Hojas	SNAld (sin publicar)	60.000
	Corteza	*	--
	Frutos	*	--

La presencia de estas proteínas en los diferentes tejidos puede variar en función de la época estacional y/o el desarrollo de la planta. Por ejemplo, la concentración de la ebulina 1 en las hojas va disminuyendo a medida que el *S. ebulus* crece hasta llegar a desaparecer prácticamente en la senescencia, mientras que la proteína SELld actúa de manera inversa (Ferreras y cols., 2010; Rojo y cols., 2003). La ebulina f se acumula en los frutos verdes y desaparece completamente con la maduración, curiosamente, puede polimerizar con otras moléculas de ebulina f e incluso lectinas, y formar agregados de alto peso molecular que coexisten con las formas libres de ebulina f y lectinas (Ferreras y cols., 2010; Citores y cols., 1998). Otro ejemplo es el de la nigrina f, que se presenta tanto en frutos inmaduros como en maduros, aunque con una importante reducción de la concentración durante la maduración (Ferreras y cols., 2010; Citores y cols., 1996).

1.7.6 Similitudes entre las proteínas del género *Sambucus*.

La comparación entre varias secuencias de RIPs tipo II y lectinas han revelado un alto grado de conservación aunque muestren diferentes estructuras moleculares y especificidades de unión al azúcar (Ferrerías y cols., 2010). El análisis de las secuencias indica que las RIP tipo II heterodiméricas como la nigrina b, la ebulina y la sieboldina b derivan de un precursor común que comprende un péptido señal y dos dominios diferentes separados por una secuencia de unión (Ferrerías y cols., 2010; Citores y cols., 2008; Rojo y cols., 1997). La región N-terminal dará lugar tras el procesamiento a la cadena A con actividad N-glucosidasa, y la C-terminal se convierte en cadena B de unión a carbohidrato. Ambas cadenas unidas por un puente disulfuro.

Por otro lado, el análisis de las secuencias de varias RIPs tetraméricas (SNA I, SSA y SEA) han revelado que en el extremo N-terminal tienen el péptido señal seguido por una secuencia aminoacídica que contiene la cadena A, el péptido de unión y la cadena B. Después del procesamiento del polipéptido se produce un heterodímero que contiene una cadena A y una cadena B unidas por un puente disulfuro (Ferrerías y cols., 2010).

Las RIPs y las lectinas del *Sambucus* están estructuralmente relacionadas con la ricina y otras RIPs tóxicas del tipo II. Comparando la secuencia de aminoácidos de ebulina 1 con la de la ricina, muestra que comparten un 34 % de identidad en la cadena A y un 48 % en la B. La proteína tetramérica SNA I comparte aproximadamente una identidad aminoacídica del 53 %, 54 % y 51 % con la nigrina b, SNLlm y SNAld

respectivamente, mientras que la nigrina b comparte con SNAIm y SNAId una homología de secuencia del 86 % y 72 % respectivamente. SNAIm muestra un 70 % de homología con SNAId (Ferrerías y cols., 2010; Pascal y cols., 2001).

1.7.7 Estructura de la ebulina I.

Se han elucidado las estructuras de los genes que codifican a ebulina I y nigrina b. Además en el caso de la ebulina I se ha realizado un análisis por difracción de rayos X, que encaja perfectamente con la determinada a partir de la secuencia del gen complementada con el estudio de la interacción estructural comparada de los derivados de galactosa con los sitios de unión en la cadena B tanto de la ebulina como de la ricina. El análisis comparado de las estructuras de la ebulina y de la ricina obtenida por difracción de rayos X muestra que las distribuciones espaciales son equivalentes (Pascal y cols., 2001; Girbés, 2004a).

En la cadena A, la ebulina tiene aproximadamente la misma posición de los principales residuos del sitio activo que la ricina. Una excepción es el lado de la cadena de la Tyr 77 (Tyr 80 en la ricina) de la ebulina que está torsionada hacia fuera del sitio de unión (Ferrerías y cols., 2010; Pascal y cols., 2001). La cadena B de la ricina posee dos dominios estructurales cada uno con tres subdominios: α , β y γ , de los cuales, sólo los subdominios 1 α y 2 γ tienen capacidad contrastada por cristalografía para fijar galactósidos (Lord y cols., 2003; Girbés, 2004a). Los datos cristalográficos indican que la ebulina I cristaliza en los sistemas

ortorrómbico y trigonal. La ebulina 1 presenta un residuo de Phe en la posición 248 en el subdominio 2 γ mientras que la ricina presenta una Tyr. Esta sustitución puede ser la responsable de la menor afinidad de la ebulina 1 por la D-galactosa que la ricina (Pascal y cols., 2001). La nigrina b posee también Phe en la misma posición que la ebulina 1 y presentan similar toxicidad que la ebulina 1 (Girbés, 2004a; Battelli y cols., 1997).

La ausencia en el subdominio 2 γ de un grupo hidroxilo afecta al establecimiento de puente de hidrógeno entre la proteína y el azúcar, lo que determina la reducción de la afinidad por galactósidos, y por lo tanto, la capacidad de interactuar con los receptores celulares, y de ello se deriva la disminución de la toxicidad (Pascal y cols., 2001; Girbés, 2004a).

1.7.8 Actividad enzimática de nigrinas y ebulinas.

Las RIPs tanto del tipo I como del II del *Sambucus* son N-glucosidasas que depurinan el ARNr de la misma forma que la ricina. El efecto de las RIPs del *Sambucus* sobre los ribosomas de mamíferos ha sido evaluado ensayando su actividad inhibidora de la síntesis de proteínas por sistemas acelulares de cerebro e hígado de rata y un lisado de reticulocitos de conejo (Ferrerías y cols., 2010; Girbés y cols., 2004b; Stirpe y Battelli, 2006).

Aunque todos las RIPs inhiben la síntesis de proteínas en sistemas mamíferos, difieren en su actividad:

Tabla I6. Revisado en Ferreras y cols., 2010. Estos datos pertenecen a estudios realizados con lisados de reticulocitos de conejo.

RIP	IC₅₀
Nigrina b básica	0,0003 nM
Sieboldina b	0,015 nM
Ebulina f	0,03 nM
Nigrina b	0,03 nM
Nigrina f	0,03 nM
Nigrina 12	0,03 nM
Ebulina r2	0,04 nM
Racemosina b	0,04 nM
Nigrina f2	8,06 nM
SNLRP	5,74 nM
SSA	16,4 nM
SNA I'	2,24 nM

También presentan actividad adenosina glucosidasa, por ejemplo, SNA I y SNLRP que eliminan varias adeninas de ribosomas, ADN de espermatozoos de arenque, poly(A) y ARNr aislado (Ferreras y cols., 2010). La nigrina b y la nigrina b básica son capaces de multidepurinar el ARN genómico del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Ferreras y cols., 2010; de Benito y cols., 1998). Algunas RIPs tanto del tipo I como del II de *Sambucus* presentan otras actividades enzimáticas como las RIPs nigrinas f1, f2 y la nigrina b básica que tienen actividad topológica, pasando ADN superenrollado circular a las formas lineal y circular relajado (Ferreras y cols., 2010; Endo y cols., 1987; de Benito y cols., 1998). La nigrina b, ebulina 1 y SEA inducen la apoptosis a concentraciones de 10^{-7} M por la

fragmentación de las células de adenocarcinoma de colon humano (COLO 320) (Gayoso y cols., 2005).

1.7.9 Actividad en células y animales.

En contraste a la alta actividad enzimática en ribosomas de estas RIPs, el efecto que causan en los cultivos de células animales es mucho menor que en los sistemas libres de células. Todos los tipos de RIPs procedentes del *Sambucus* presentan menor citotoxicidad que la ricina y otras RIPs del tipo II tóxicas. Los primeros estudios se realizaron con nigrina b y ebulina 1, que al contrario que la ricina, muestran una baja toxicidad en células HeLa (IC₅₀: 0,00067, 27,6 y 64,3 nM, respectivamente) y en células epiteliales humanas NHC (Ferrerías y cols., 2010; Girbés y cols., 1993b; Battelli y cols., 1997). Dicho estudio se extendió a un amplio número de células cancerosas para determinar su posible potencial como inmunotoxinas para la terapia contra el cáncer. Los estudios mostraron que la nigrina b era aproximadamente 10⁴-10⁵ veces menos tóxica que la ricina en todos los casos en células cancerosas, con la excepción de las células de melanoma, que eran resistentes a la ricina (Ferrerías y cols., 2010; Muñoz y cols., 2001).

Las RIPs SNA I, SEA y SSA (tetraméricas) mostraron baja actividad antirribosómica en comparación con otras RIPs derivadas del *Sambucus*, y sólo inhiben la síntesis de proteínas en células intactas a altas concentraciones (Ferrerías y cols., 2010; Rojo y cols., 1997; Battelli y cols., 1997; Muñoz y cols., 2001). En ratones, el LD₅₀ de la nigrina b y la ebulina

1 administradas por inyección intraperitoneal es de 12 mg/kg y de 2 mg/kg del peso corporal respectivamente, mientras que la letalidad de la ricina intravenosa está en el rango de 2-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Ferrerias y cols., 2010; Battelli y cols., 1997).

1.7.10 Usos biomédicos de las RIPs de *Sambucus*.

La ricina ha sido la RIP más usada para la construcción de conjugados e inmunotoxinas dirigidos hacia células cancerosas (Ferrerias y cols., 2010; Girbés y cols., 2004b; Stirpe y Battelli, 2006). Quizás la característica más indeseable es su toxicidad inespecífica, aunque desde que se bloqueó el sitio de unión al azúcar, la ricina es menos tóxica que la intacta (Ferrerias y cols., 2010). La nigrina y la ebulina son 10^3 - 10^5 menos tóxicas que la ricina en cultivos celulares y en ratón. La falta de toxicidad de las RIPs de tipo II del *Sambucus*, junto con la ricina bloqueada, hace que sean unos excelentes candidatos como partes tóxicas en la construcción de inmunotoxinas y conjugados (Ferrerias y cols., 2010).

El interés en las lectinas ha incrementado porque son reactivos altamente valiosos para la investigación de los azúcares presentes en la superficie celular (Ferrerias y cols., 2010). Basados en su especificidad Neu5Ac(α -2,6)Gal/GalNAc, las RIPs SNA I y SSA han sido usadas para la detección de diferentes transportadores de glucoproteínas de sitios de unión α -(2,6)Galactosa (Ferrerias y cols., 2010; Murayama y cols., 1997). Debido a las propiedades ya descritas, las RIPs procedentes del *Sambucus* son unas herramientas potenciales para su uso en terapias humanas. Recalcando la

relevancia de la nigrina b, pues presenta una gran actividad antirribosómica y una mínima toxicidad (Ferrerías y cols., 2010).

1.8 Nigrina b.

Como ya hemos visto, la nigrina b se encuentra en la corteza del *Sambucus nigra* junto con otras dos proteínas (SNA I y SNA II) que también tienen capacidad para fijar D-galactosa e interaccionar con galactósidos y matrices polisacáridas con restos de D-galactosa terminal. Para el aislamiento de estas proteínas por cromatografía de afinidad se usa Sepharose 6B tratada con ácido, que retiene las tres proteínas, y mediante lactosa o D-galactosa se liberan de la resina. En cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75, las proteínas migran en tres picos bien definidos y separados (Girbés y cols., 1993b; Girbés, 2004a).

Tras estudios de la ubicación de la nigrina b en diversas partes de la planta como el peciolo, corteza con desarrollo primario y corteza de desarrollo secundario, se ha determinado que es en esta última en la que la nigrina b se acumula preferentemente, lo que podría tener una relación directa con la toxicidad y el carácter purgante de este tipo de corteza (Ferrerías y cols., 2011). También, se detectó cierto carácter purgante en las hojas, así que se procedió a su evaluación, detectando la presencia de una isoforma de la nigrina denominada nigrina I y dos lectinas: SNLIm y SNLId (Girbés, 2004a). En los frutos se encontró otra isoforma muy activa, la nigrina f, que está ausente en frutos maduros (Citores y cols., 1996).

1.8.1 Hemoaglutinación.

La nigrina b promueve la hemoaglutinación de los eritrocitos humanos a una concentración de 12,5 µg/ml. La D-galactosa y la lactosa inhiben eficazmente la hemoaglutinación. Además, la nigrina b interacciona con la mucina de manera altamente específica. Por otro lado, la nigrina b reconoce mejor a la fetuina deprivada de ácido siálico, luego, además de interaccionar con algún motivo específico de las mucinas, reconoce restos terminales de D-galactosa en la fetuina (Girbés, 2004a).

1.8.2 Toxicidad *in vivo*.

Las nigrinas b, f y 1 son poco activas en relación con la ricina sobre células humanas cultivadas, así como, sobre ratones vivos hasta concentraciones muy elevadas, siendo su toxicidad de 10^4 - 10^5 veces inferior a la de la ricina, aunque desde el punto de vista de la actividad enzimática son muy similares (Girbés, 2004a). Los valores de IC_{50} de lisados de reticulocitos de conejo son de 0,03 nM para la nigrina y 0,1 nM para ricina (Girbés y cols., 1993b; Girbés, 2004a).

Para comparar la toxicidad *in vivo* en ratones de la nigrina b con la ricina se inyectó por la vena de la cola concentraciones variables de nigrina b o ricina. Se observó que la inyección de 3 µg/kg de ricina provoca la muerte de todos los animales en un período máximo de 5 días. En contraste, la nigrina b no ofrece efecto letal a 5 mg/kg. Para matar a los

animales en tres días se necesitan de 10-16 mg/kg (Gayoso y cols., 2005; Girbés, 2004a).

Para explicar la falta de toxicidad de la nigrina b comparada con la ricina, se formuló la hipótesis de que la internalización de la ricina y la nigrina b podían involucrar diferentes receptores y por lo tanto seguir diferentes rutas intracelulares (Ferrerías y cols., 2010).

La nigrina b se internaliza inicialmente, al igual que la ricina, a través de endosomas sensibles a NH_4Cl y se degrada, también, en su mayor parte (94 %) en los lisosomas. Sin embargo, a partir de los endosomas, la ruta seguida por la nigrina b difiere de la ruta de la ricina, ya que los efectos antirribosómicos obtenidos a altas concentraciones son independientes de temperatura e insensibles a brefeldina A (droga que desorganiza el aparato de Golgi). Prácticamente, todas las moléculas de nigrina b son transportadas desde los endosomas hacia los lisosomas donde se degradan (Girbés, 2004a; Battelli y cols., 1997; Battelli y cols., 2004b). Sólo a concentraciones de 4 ó 5 órdenes de magnitud superiores a la ricina, se acumulan suficientes moléculas de nigrina b en los endosomas como para que se de la translocación espontánea de nigrina b al citosol sin pasar por el aparato de Golgi y el RER (Girbés, 2004a).

1.8.3 Efectos celulares de la toxicidad a nivel intestinal.

El análisis histológico de los ratones tratados con diversas dosis de nigrina b no reveló signos aparentes de daños en los diversos tejidos, exceptuando en los intestinos.

La capa interna del intestino está compuesta por una única capa epitelial, la cual, difiere entre el intestino delgado y el grueso. El epitelio del intestino delgado está formado por unas pequeñas depresiones llamadas criptas de Lieberkühn, localizadas entre unas protuberancias situadas en el lumen del intestino delgado, denominadas *villi*. El intestino grueso presenta unas criptas similares a las del intestino delgado, pero el epitelio diferenciado forma una superficie plana epitelial.

El epitelio intestinal es el tejido de nuestro cuerpo que presenta una regeneración celular más rápida (Heath, 1996). Esta renovación celular está producida por unas células madres situadas en las criptas, las cuales, producen una progenie proliferativa llamada células del TAC (*Transient-Amplifying Compartment*). Las células del TAC migran de las criptas hasta los *villi*, donde experimentan una diferenciación terminal para formar los diferentes tipos de células epiteliales: enterocitos, células de goblet, y células endocrinas. Estas células continúan migrando a lo largo del *villi* hasta que alcanzan el extremo superior, donde sufren apoptosis y finalmente son liberadas al lumen del intestino. Un cuarto tipo celular, llamado células de Paneth, evade esta migración y se diferencia mientras migra hacia la base de la cripta (Vries, 2010).

Una de las rutas moleculares más importantes que regulan la regeneración celular intestinal es la ruta Wnt (Clevers, 2006) y la pérdida de su señal conlleva el bloqueo de la proliferación celular en las criptas intestinales (Korinek y cols., 1998). Existe un gradiente en la señalización de la ruta Wnt a lo largo del eje cripta-*villi*. Cuando las células migran fuera de la fuente de Wnt en la base de la cripta, van perdiendo progresivamente su capacidad proliferativa y se van diferenciando, (Battle y cols., 2002).

Entre las células de Paneth y las células del TAC, se asume la presencia de una célula madre en la llamada posición +4 (Sangiorgi y Capecchi, 2008). Alternativamente, Leblond identificó unas células pequeñas denominadas CBC (*Crypt Base Columnar*), intercaladas con las células de Paneth en la base de las criptas (Bjerkenes y Cheng, 1981; Cheng y Leblond, 1974). Estas células (CBC) retienen su capacidad de generar todos los tipos celulares de intestino durante toda la vida del ratón, mientras se divide una vez al día aproximadamente (Barker y cols., 2007) y en 2009 Zhu y cols. corroboraron que las células CBC eran células madre.

En el caso de dosis letales de nigrina por vía intravenosa (IV) se observaron importantes lesiones como la destrucción del epitelio, las criptas y la desaparición de los *villi* dejando paso a abundantes hemorragias y a la muerte del animal (Gayoso y cols., 2005). Para una dosis subletal IV de 5 mg/kg se observa que tras 5 horas de la administración, algunas de las células de las criptas del intestino delgado se encuentran en apoptosis. Un día después de la administración, las criptas están atrofiadas y tras tres días de la inyección de nigrina b, los *villi* están edematosos con eritrocitos en diferentes grados de necrosis y presentan también desmoronamiento del

epitelio. En el intestino delgado comienzan a recuperarse las criptas, por división activa de las células y regenerándose el epitelio. A los 9 días aproximadamente la recuperación del animal es total, no observándose signos de alteraciones funcionales. El resultado del tratamiento con nigrina b es la apoptosis celular presente en la mitad de la tercera parte de las criptas intestinales de ambos intestinos (Ferrerías y cols., 2010; Gayoso y cols., 2005).

1.8.4 Aplicaciones biomédicas de la nigrina b en la construcción de conjugados e inmunotoxinas.

Las patologías que pueden tratarse con inmunotoxinas son, en principio, aquellas basadas en la presencia de células enfermas con peculiaridades o determinantes antigénicos específicos en su superficie celular, en particular las células cancerosas (Girbés, 2004a).

La nigrina b tiene la ventaja de que a la vez que preserva su carácter inhibidor de ribosomas, no puede translocarse al citosol por la vía de transporte retrógrado como la ricina y alcanzar los ribosomas de la célula (Girbés, 2004a; Battelli y cols., 1997; Battelli y cols., 2005). Por lo tanto, su utilización a grandes concentraciones no ofrece el peligro que ofrecen los conjugados e inmunotoxinas con ricina u otras RIPs tóxicas (Girbés, 2004a). Además, se ha determinado que tanto la ebulina 1 como la nigrina b poseen muy poca actividad inmunogénica y adyuvante (Girbés, 2004a), lo que contrasta con el fuerte carácter inmunogénico y adyuvante de la ricina (Lavelle y cols., 2000). El hecho de que la ricina no muestre reacción

inmunológica cruzada frente a la nigrina b (medido por ELISA) (Girbés, 2004a; Muñoz y cols., 2001) convierte a esta proteína en una candidata importante para sustituir a la ricina y a sus derivados cuando la resistencia inmunológica frente a éstos se hace patente durante la terapia experimental del cáncer (Girbés, 2004a; Kreitman y cols., 1999).

Conjugados transferrina-nigrina b/ebulina 1.

Muchas células malignas expresan el receptor de la transferrina, por ello, este receptor es objeto de ataque con conjugados. Tanto la nigrina b como la ebulina 1 forman conjugados con transferrina que retiene la actividad antirribosómica con valores de IC_{50} de 5 y 20 ng/ml respectivamente. Esta actividad inhibidora se mantiene sobre células cancerosas cultivadas, tales como las células HeLa con valores de 0,3 nM para ambos conjugados. Por lo tanto, estos conjugados son capaces de identificar y matar las células cancerosas que sobreexpresan el receptor de la transferrina y con una eficacia similar e incluso superior a los conjugados publicados con ricina y toxina diftérica (Girbés, 2004a; Citores y cols., 2002).

Inmunotoxina frente a la neovascularización tumoral.

Uno de los principales problemas en el tratamiento de tumores sólidos con inmunotoxinas y otros agentes químicos es la accesibilidad reducida de los fármacos antitumorales al interior de los tumores (Jain, 1994). Una de las estrategias existentes para la eliminación del tumor, es eliminar el suministro de los nutrientes y el oxígeno que llegan al tumor a través de una fina red de vasos capilares (Girbés, 2004a). Provocando la muerte del tumor, sin necesidad de atacar directamente a las células tumorales.

Diversos trabajos indican que la endoglina (CD105) se sobreexpresa en la neovasculatura tumoral (Girbés, 2004a; Fonsatti y cols., 2000; Duff y cols., 2003). Como ejemplo de inmunotoxina, se ha construido el conjugado formado por el anticuerpo monoclonal antiendoglina humana (44G4) y la nigrina b, resultando muy activo en células CD105+ (Muñoz y cols., 2012; Ferreras y cols., 2010; Muñoz y cols., 2007; Benítez y cols., 2005). Además los conjugados de nigrina b y de la lectina dimérica SELld, poseían una fuerte citotoxicidad en células COLO y HeLa (Ferreras y cols., 2010; Benitez y cols., 2004)

1.9 Implicaciones inmunológicas de las proteínas de *Sambucus nigra*.

Se han descrito alergias al polen de *Sambucus nigra* (Förster-Waldl y cols., 2003). Se pudo aislar el alérgeno del polen que se denominó Sam n1, y que presenta una masa molecular relativa de 33,2 y secuencias aminoacídicas de péptidos trípticos, que mediante análisis en las bases de datos permitieron la identificación de secuencias similares de lectinas de *Sambucus* (Förster-Waldl y cols., 2003). Habida cuenta de que los frutos de saúco se consumen en la alimentación humana y en la preparación de jarabes, se plantea la cuestión de que las lectinas de saúco puedan provocar alergias del tipo alimentario, en gran parte dependiente del grado de degradación gastrointestinal de las lectinas y de ahí su importancia en la nutrición y la alimentación.

1.10 Polifenoles del té verde.

Una de las bebidas más consumidas en el mundo es el té, que presenta importantes efectos beneficiosos sobre la salud debido a su contenido en catequinas, un subgrupo de polifenoles, conocidos por sus propiedades altamente antioxidantes.

El té contiene elevadas cantidades de diversos flavonoides, entre los que destacan las catequinas. Éstas incluyen epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG), y epigalocatequina-3-galato (EGCG) (Balentine y cols., 1997; Graham, 1992). EGCG es la catequina más abundante y comprende el 50-75 % de la cantidad total de catequinas. Otras catequina como la epigalocatequina digalato, metilepicatequina, etc. están presentes en pequeñas cantidades. Flavonoles incluyendo quercitina, kaempferol, miricetina y otros glicósidos también se encuentran presentes en el té (Kanwar y cols., 2012). La proporción de compuestos varía de acuerdo al clima, la altitud, la variación clonal, y el grado de desarrollo de las hojas. Así pues, la hojas jóvenes contienen altas cantidades de cafeína mientras que las hojas viejas contienen grandes cantidades de catequinas (Lin y cols., 2003).

Las catequinas están presentes en mayores cantidades en el té verde que en el té negro y el té *oolong*, debido a los diferentes procesados de las hojas tras su recolección. Del té producido a nivel mundial, el 78 % es té negro, un 20 % té verde y un 2 % correspondiente al té *oolong*. El té verde procede de la planta *Camellia sinensis*, su preparación requiere el escaldado de hojas frescas para la inactivación de enzimas que impidan la

fermentación del producto, obteniendo, por lo tanto, un producto seco estable (Kanwar y cols., 2012).

Entre los beneficios asociados al consumo de té verde se encuentran su capacidad de inducir termogénesis y estimular la oxidación de las grasas, lo que puede conducir a una reducción en el índice de la masa corporal y en el peso (Phung y cols., 2010; Wolfram y cols., 2006; Hursel y cols., 2006). Esto ha conllevado un aumento notable del consumo de té en varios formatos como puede ser en infusión o en extractos concentrados de té verde (GTE). Otros efectos como su protección cardiovascular o su efecto anticanceroso, también han contribuido a su consumo en altas dosis (Moore y cols., 2009; Sturgeon y cols., 2009). Sin embargo, aunque hay evidencia de los efectos positivos del consumo de té verde y GTE, también hay datos indicativos de que el uso abusivo tanto de las infusiones como de los extractos concentrados, pueden ocasionar efectos adversos, que en casos extremos pueden ocasionar serios daños a la salud (Schöntal, 2011).

Además de las hojas convencionales de té para infusión, hay un gran número de GTE comerciales disponibles en líquido o en cápsulas ofreciendo altas concentraciones de té verde enriquecidas con catequinas. Una de estas formas es el Polyphenon[®], marca aplicada a una serie de GTE de alta calidad, altamente estandarizado, manufacturado por Mitsui Norin, de Japon. Uno de los más usados de estos GTE es el Polyphenon E[®] (Poly E) manufacturado por Pholyphenon Pharma subsidiario de Mitsui. El Polyphenon E es un GTE descafeinado, compuesto por una fracción total de catequinas del 89 % siendo un 65 % EGCG, 9 % EC, 6,6 % ECG, 3,8 % EGC, 3,5 % GCG, 1 % C, 0,2 % GC y 0,2 % CG (Zhang, 2010).

2. OBJETIVOS.



Los datos expuestos anteriormente indican que la reversibilidad de los efectos tóxicos de nigrina b administrada intravenosamente sobre ratones pueden utilizarse para el estudio de los efectos de fármacos, nutrientes, fitoquímicos, etc. y en general, de sustancias que de alguna manera tengan algún efecto sobre la fisiología del tubo digestivo. Nuestra hipótesis es que los efectos tóxicos de la nigrina b administrada intraperitonealmente pueden interactuar con los efectos de otras sustancias, y por ello, constituir un modelo de daño/regeneración intestinal de utilidad en nutrición. Para este tipo de estudios que requieren la utilización de animales se exige la disposición de gran cantidad de nigrina b. Además de poder desarrollar este modelo animal es esencial disponer de nigrina b de la máxima actividad biológica, determinada en parte por el procedimiento de extracción. Con este fin, se plantearon en el presente trabajo los siguientes objetivos:

- 1) Mejora en la obtención de nigrina b mediante el procedimiento clásico de cromatografía de afinidad. Para ello, se estudiará el estado de la corteza húmeda (procedimiento tradicional) o seca (nuevo procedimiento) como material biológico de partida, determinante de la calidad de la lectina purificada. En la asunción de que la deshidratación de la corteza del saúco no afecte a la actividad hemoaglutinante y tóxica.
- 2) Estudiar los efectos de la administración intraperitoneal de nigrina b a ratones en sus aspectos toxicológicos e histológicos.

- 3) Estudiar los efectos de la administración conjunta de nigrina b por vía intraperitoneal con otros compuestos de importancia nutricional y terapéutica, como son los polifenoles del té verde.

3. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.



3.1 Materiales.

3.1.1 Equipos.

Agitador de tubos: Raypa

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

Balancín: Labnet

Balanza de precisión: KERN ABS

Balanza: KERN 572

Baño de agua: Velp Scientifica (multistirrer 6)

Célula con agitación (concentrador): Amicon

Centrifuga: Digen-R ORTO ALRESA

Columnas cromatográficas:

Superdex 75: GE Healthcare

A-Sepharose: HiTrap Protein A HP

XK-50 GE Healthcare

Concentrador de 50 y 10 ml: Amicon

Congelador -24°C: Fagor

Cubetas electroforéticas mini-VE Amersham Biosciences

Disgregador MICCRA D-9 /RT

Equipo de electrotransferencia (Western-Blot): Pharmacia Biotech

Escáner CanonScan Lide 200 acoplado a un ordenador SAMSUNG NC10

Espectrofotómetro: HELIOS α Thermo

Estufa: P.SELECTA 150 litros

pHmetro: pH-meter basic 20 + CRISON

Pipetas automáticas: Proline Plus de Biohit

Pipeteador automático: Isolab

Sonicador: P-Selecta

Equipamiento necesario del departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología para llevar a cabo el análisis histológico

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.

Cubreobjetos de 12 mm Ø.

Espátulas.

Frascos Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes.

Gradillas para tubos Falcon y para microtubos.

Guantes de látex.

Imanes agitadores.

Membrana Amicon.

Membrana Inmobilon P de polivinilfluoruro (PVDF) 0,45 µm.

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 redondas y cuadradas.

Portaobjetos.

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.

Vasos de precipitados de vidrio y plástico de diferentes volúmenes.

3.1.3 Reactivos químicos.

A continuación se muestra una lista de los productos químicos utilizados, así como la casa comercial de la que provienen. Todos los productos son aptos para el uso en experimentos analíticos, siendo de una alta pureza.

Reactivo

Acetona

Ácido acético

Ácido clorhídrico

Acrilamida/bisacrilamida

Adyuvante de Freund completo

Adyuvante de Freund incompleto

Albumina sérica bovina

Ázida sódica

Azul de bromofenol

Azul Coomassie R-250

Azul de Evans

Casa Comercial

Panreac

Panreac/Baker

Panreac

Amresco

BD DIFCO

BD DIFCO

Roche

Panreac

Sigma-Aldrich

Panreac

Sigma-Aldrich

Bicarbonato de sodio	Aibasa
2-mercaptoetanol	Merk
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	Fluka analytical
Butanol-1	Merk
Cloruro de magnesio	Merk
Cloruro sódico	Merk
Cloruro potásico	Sigma-Aldrich
Dimetilformamida	Merk
Dodecil sulfato sódico	Sigma-Aldrich
EDTA	Panreac
Etanol 96 %	Merk / Baker
Fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich
Fosfato monopotásico	Sigma-Aldrich
Fosfato sódico	Merk
Glicerol	Thermo
Glicina	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	Panreac
Isofluorano	ABBOTT
Lactosa	Sigma-Aldrich
Metanol	Panreac / Merk
NBT	Sigma-Aldrich
O-dianisidina dihidrocloruro	Sigma-Aldrich
Ovoalbúmina	Sigma-Aldrich
Pancreatina	Sigma-Aldrich
Pepsina	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrógeno	Sigma-Aldrich
Persulfato amónico	Sigma-Aldrich

Polyphenon E	Sigma-Aldrich
Sepharose 6B (71-7098-00AD)	GE Healthcare
TEMED	Sigma-Aldrich
Tripsina	Merk
Tris	Sigma-Aldrich
Tween	Sigma-Aldrich
X-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolyfosfato)	Sigma-Aldrich

También se utilizaron aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo los análisis histológicos, suministrados por el departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología.

3.1.4 Materiales biológicos.

En la realización de la presente tesis se han utilizado los siguientes materiales biológicos:

3.1.4.1 Vegetales.

Se recogieron ramas y frutos 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 la RIP nigrina b y de las lectinas SNA I y SNA II.

3.1.4.2 Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados para llevar a cabo la valoración de la farmacocinética de la nigrina b en sangre fueron:

- Anticuerpos policlonales de suero de conejo antinigrina b, usados como anticuerpos primarios, preparados en nuestro laboratorio y el animalario de la Facultad de Medicina, bajo la supervisión del Veterinario Jefe.
- Anticuerpos de cabra frente a anticuerpos de conejo marcados con fosfatasa alcalina de Sigma-Aldrich, utilizados como anticuerpos secundarios.

3.1.4.3 Sangre.

Para determinar la actividad de las proteínas extraídas y purificadas se realizó un experimento de hemoaglutinación, para lo cual se necesitaron unos viales de sangre, cedidos por el Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, gracias a la doctora Rosario del Villar.

3.1.4.4 Animales de experimentación.

Los animales empleados para la realización de este trabajo se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Para la obtención de anticuerpos policlonales antinigrina b de ratón se utilizaron conejos albinos tipo *New Zealand*, con un peso corporal entorno a los 4-5 kg, suministrados por el animalario.

Para el resto de los experimentos con animales se utilizaron ratones hembra de linaje *Swiss* con un peso medio de entre 25-30 gramos, que se estabulan en jaulas de suelo sólido con un lecho absorbente y atóxico, generalmente se usaron virutas de madera. Se utilizó una dieta equilibrada en forma de pellets de pienso, con un consumo variable en función del peso y de la edad del animal, de la casa comercial Ssniff, producto V1535-000, cuya composición se detalla a continuación:

Proteína	19,00 %
Aceites y grasas	3,30 %
Fibra	4,90 %
Ceniza	6,40 %
Calcio	1,00 %
Fósforo	0,70 %
Sodio	0,24 %
Lisina	1,00 %
Metionina + Cisteína	0,65 %

Además de otros aditivos adicionales como vitaminas (A, D, E), y minerales (hierro, cobre, zinc, ...), se les proporcionó agua corriente de uso humano *ad libitum* suministrada mediante biberones. La estabulación se realizó en torno a los 20-24 °C, con ciclos de luz de 12 h/día (8.00 a.m. - 8.00 p.m.).

3.2 Métodos experimentales.

3.2.1 Preparación de disoluciones y filtración.

Todas las soluciones se prepararon con agua purificada por el sistema de purificación Elix 3 de Millipore, con una resistividad alrededor de 0,067 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se filtraron todas las soluciones para evitar posibles contaminaciones de materiales inertes como pequeñas fibras textiles. El equipo de filtración consta de un matraz de filtración, un cuerpo con placa de vidrio poroso, un embudo, una pinza de aluminio, un tubo de silicona y una bomba de vacío. Antes de filtrar se coloca una membrana de la casa comercial Millipore de 4,5 cm de diámetro, que permite el paso de sustancias de hasta 0,45 μm HA. La membrana se maneja con unas pinzas de punta redonda para evitar dañarla y se humedece por ambas caras con agua Elix, colocándola posteriormente entre el cuerpo con placa de vidrio poroso y el embudo, fijando ambas partes con la pinza de aluminio. Finalmente, a través de un tubo de silicona se conecta el matraz con la bomba de vacío. Una vez montado el sistema de filtración se conecta la bomba de vacío y se vierte la solución. En el caso de que la solución lo requiera, se esteriliza a continuación siguiendo las indicaciones del apartado 3.2.2.

Para todos los procesos, tanto de preparación de soluciones como para la ejecución de los experimentos de esta tesis, se utilizaron guantes de látex, con cambios frecuentes, para evitar la contaminación de los diversos agentes presentes en la piel.

3.2.2 Esterilización.

La esterilización se realiza en un autoclave a una temperatura de 120 °C y a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

Para la esterilización de materiales se reparten en lotes en función de su naturaleza, los de plástico (vasos de precipitados, imanes, embudos, ...) se mantienen toda la noche en una estufa a 50 °C, y los de vidrio (probetas, vasos de precipitados, botellas, ...), metal (espátulas, tijeras, ...) y porcelana (morteros) se mantienen en estufa a 100 °C durante toda la noche.

El resto del material de laboratorio (puntas de micropipetas, microtubos, tubos cónicos, filtros, jeringas, etc.) se adquirió en forma estéril o se esterilizó utilizando el autoclave, como se ha indicado.

3.2.3 Purificación de proteínas de corteza de *Sambucus nigra* L.

3.2.3.1 Preparación de la resina Sepharose 6B tratada con ácido.

Para el tratamiento de la Sepharose 6B se prosigue de la siguiente forma: se retiran 400 ml de la resina (71-7098-00AD) y se depositan en un vaso de precipitados, se remueve bien y después de que sedimente, se extrae el etanol mediante vacío. Se añade agua Elix y se remueve para diluir el etanol en el agua y favorecer su extracción nuevamente por vacío. Se repite el proceso hasta conseguir extraer la mayor cantidad posible de

etanol de la mezcla, comprobándose por la pérdida de olor a etanol del preparado.

Las proteínas que queremos aislar (nigrina b, SNA I y SNA II) se unen covalentemente a los galactósidos, motivo por el cual tratamos la resina con HCl. Éste causa la rotura de los estromas dejando expuestos restos de D-galactosa, a los que se unirán las proteínas anteriormente citadas.

Para el tratamiento de la Sepharose 6B se añade tanto volumen de HCl 0,2 M como de resina, y así obtener una concentración final del conjunto de 0,1 M. La mezcla se coloca en un baño a 50 °C durante 3 horas, removiendo regularmente. Transcurrido el tiempo se retira el HCl mediante lavados con agua Elix hasta normalizar el pH entorno a 7. Durante estos lavados hay que ir eliminando las partículas más finas para evitar que se obstruya la columna durante la extracción, lo que provocaría una disminución del flujo de salida y una pérdida de la resolución.

3.2.3.2 Preparación de las membranas de diálisis.

Se cortaron 3 tiras de las membranas de diálisis, de alrededor de 1 metro, de los diámetros convenientes (31,7 mm, 23,8 mm, 19,0 mm y 14,3 mm). Se hirvieron las membranas de diálisis durante 10 minutos en bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1 μ M, removiéndolas frecuentemente. A continuación, se enjuagaron bien las bolsas con agua Elix y se volvieron a hervir nuevamente en bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1 μ M durante 15 minutos. Se repitió la operación.

A continuación, se lavaron y se enjuagaron las membranas de diálisis (aproximadamente tres veces) con agua Elix. Después se hirvieron 10 minutos en agua Elix. Se repitió este último paso, y para finalizar, se almacenaron en 1 litro de agua Elix y ázida sódica 0,1 g a 4 °C, hasta su uso.

3.2.3.3 Material biológico de partida.

Tanto la RIP nigrina b como las lectinas SNA I y SNA II presentan diferentes patrones de expresión en función de la época estacional. En el caso de la nigrina b presenta su mayor expresión durante la temporada estival. Debido a los constantes cambios climáticos, no se dispone de una fecha exacta para la recogida de las ramas de saúco, por lo tanto, ya en primavera se controlaron las ramas de Fuente la Mora, y se recogieron pequeñas cantidades de éstas, de unos 2 cm de diámetro, que posteriormente se procesaron para determinar la concentración de proteínas presentes. Cuando la cantidad de nigrina b fue mayor a la de las otras dos lectinas (SNA I y SNA II), se procedió a una recolección a gran escala de la ramas de saúco.

Una etapa fundamental previa a la extracción de las proteínas de la corteza del saúco es lograr un almacenamiento adecuado, sin que el paso del tiempo ocasione una pérdida de las características de las proteínas de interés. Para la consecución de este objetivo se llevó a cabo una limpieza inicial de las ramas, eliminando hojas y brotes. A continuación se procedió a separar la corteza, tanto primaria como secundaria, de la médula. En la figura MM1 se observan las diferentes capas de una rama de saúco, de la

utilizadas en este trabajo. Para obtener la corteza en tiras finas se empleó un cúter.



Fig. MM1. Fragmento de rama de *Sambucus nigra* L. Puede apreciarse la corteza primaria (color marrón), la corteza secundaria (color verde) y finalmente la médula.

Para los estudios realizados en este trabajo se utilizó corteza húmeda y corteza secada a temperatura ambiente. La corteza húmeda se congeló a -24°C inmediatamente después de su obtención. La corteza seca se deshidrató a temperatura ambiente con buena circulación de aire y volteo frecuente hasta peso constante. Este material desecado se guardó en bolsas herméticas a 20°C hasta su uso.

3.2.3.4 Proceso de extracción de nigrina b.

Se partió de aproximadamente 100 gramos de corteza húmeda o corteza seca. En el caso de la húmeda, el material se cortó lo más pequeño posible y se trituroó en un mortero de porcelana para disgregar el tejido y a continuación se homogeneizó en una batidora Philips de cuchillas en presencia de 8 volúmenes de tampón. A partir de aquí, el procedimiento que se siguió fue idéntico al de la corteza seca.

La corteza seca en trozos de 1 cm de longitud se trituró con un molinillo. Cuanto mayor sea la superficie de contacto de la corteza con el tampón de extracción, mayor rendimiento de proteínas se obtendrán, por lo tanto, para incrementar el área de contacto se trituraron las estacas, para convertirlas en un polvo lo más fino posible.

En el caso de la corteza seca, la extracción de las proteínas se realizó en presencia de 12 volúmenes del tampón de extracción (fosfato monosódico 5 mM pH 7,5 y cloruro sódico 0,28 M) y se mantuvo con agitación continúa durante toda la noche a 4 °C.

Después de unas 16 horas en agitación se obtuvo el extracto, que se filtró a través dos gasas de nailon, eliminando así los fragmentos no disgregados. Para eliminar los restos de la corteza particulada y del mucílago del extracto vegetal se centrifugó a 3.500 rpm a 3-4 °C durante 45 minutos en un rotor basculante RT 142 (Digiten-R Orto Alresa). Se pasó el sobrenadante a otro tubo Falcon y se volvió a centrifugar a 3.500 rpm a 3-4 °C durante 30 minutos. Si tras la primera centrifugación se observa el sobrenadante muy turbio, antes de realizar la segunda centrifugación se filtra el extracto con 2 pliegues de papel de filtro convencional. Finalmente se recuperó el extracto y se filtró de la misma manera. Éste es el extracto crudo a partir del cual se realiza la purificación de las proteínas (nigrina b, SNA I y SNA II).

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

Para realizar la cromatografía de afinidad, se montó la columna XK-50 con camisa de refrigeración de GE Healthcare. Como lecho cromatográfico

se utilizó la Sepharose 6B tratada previamente con HCl, según se indica en el apartado 3.2.3.1. y se procedió según sigue: se añade la Sepharose 6B-HCl. Para evitar una sedimentación por estratos se vierte desde un primer momento todo el volumen en función de la altura del lecho que se desee tener, aproximadamente 9 cm. Formado el lecho, se pasan 2 volúmenes del tampón de extracción para equilibrar la columna. A través del pH se verifica que la columna se ha equilibrado, presentando la fase móvil el mismo pH a la entrada y a la salida de la columna. El flujo de la columna se ve determinado, además de otras variables, por la acción de la gravedad siendo aproximadamente de 8 ml/min.

Para la adición de la muestra, se detiene la entrada del tampón de extracción dejando una fina capa. A continuación, se cierra la salida del eluyente y con ayuda de una pipeta Pasteur se va añadiendo suavemente parte de la muestra por las paredes hasta formar otra vez una capa amortiguadora evitando así dañar el lecho. Conseguidos 2 o 3 cm de muestra por encima del lecho se abre el paso del resto de la muestra (entorno a unos 800 ml) y la salida del eluyente, dejando que la muestra vaya penetrando a través del lecho. Dado que esta columna se basa en el principio de afinidad, nuestras proteínas se quedarán unidas a la matriz de la columna, y el resto del material del extracto crudo se desecha con el eluyente.

Después, la columna se lava con el mismo tampón de extracción hasta que la absorbancia a 280 nm sea prácticamente cero. Hasta este momento, todo el proceso se realiza a una temperatura cercana a los 0 °C gracias a la recircularización de agua previamente enfriada a través de la camisa

térmica que presenta la columna. Para la elución de las proteínas retenidas, se sube la temperatura de la columna hasta alcanzar una temperatura ambiente y se procede a la elución de las proteínas con un tampón de lactosa 0,2 M, NaCl 0,28 M y PNa 0,005 M a un pH de 7,5. Las proteínas que presentan mayor afinidad por la lactosa que por la resina, se desprenden de la columna. A partir de la adición de la lactosa, vamos a recoger de manera manual fracciones de 10 ml. Estas fracciones se miden con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm, usando una cubeta de cuarzo con un paso de luz de 10 mm. Los datos resultantes, se representan en una gráfica frente al número de la fracción correspondiente. A la fracción proteica eluída se la denomina pico de afinidad.

Las fracciones correspondientes al pico de afinidad se concentran, según el apartado 3.2.3.8, hasta 5 ml aproximadamente en una célula de filtración Amicon con agitación, empleando una membrana YM-10.

3.2.3.6 Cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75.

La muestra obtenida en el apartado anterior se cargó en una columna de exclusión molecular Superdex 75. Esta columna nos permite la resolución eficaz de proteínas entre los 3.000 y 70.000 Mr. Esto la hace idónea para la separación de las proteínas en estudio, que rondan entre los 30.000 y los 140.000 Mr. Dada la longitud que presenta la columna, se hace necesario el uso de una bomba peristáltica, que disminuye la resistencia ofrecida por el lecho ante el paso del eluyente, logrando un flujo de 4 ml/min.

Al ser una columna preempaquetada comercialmente, se siguen las instrucciones correspondientes aportadas por GE Healthcare. Según se

indica, el primer paso es eliminar todas las posibles burbujas de aire que pueda tener la columna. Después se procede a equilibrar la columna pasando un volumen de un tampón de baja fuerza iónica (0,025 M PNa y 0,075 M NaCl pH 7,2), y seguidamente dos volúmenes de otro tampón constituido por 0,05 M PNa y 0,15 M NaCl a un pH de 7,2 y finalmente, antes de cargar las proteínas concentradas, se pasa otro volumen del mismo tampón con el que posteriormente serán eluidas las proteínas. A este tampón le denominamos tampón de proteína (0,005 M PNa y 0,4 M NaCl con un pH de 7,5). Cargamos los 5 ml de las proteínas concentradas en el apartado anterior y eluimos la muestra con el mismo tampón de proteína. Los primeros 60 ml se recogen con una probeta y a continuación se recolectan fracciones de 5 ml. Se miden las absorbancias a 280 nm lo que permite indentificar tres picos bien diferenciados. El primer pico corresponde a SNA I, el segundo a nigrina b y el tercero a SNA II.

3.2.3.7 Diálisis de las proteínas.

Según se indicó en el apartado 3.2.3.2, se disponen las membranas de diálisis preparadas en tiras de 1 metro en agua Elix con ázida sódica. En función del volumen de cada una de las proteínas aisladas se escogieron las membranas de diálisis del diámetro conveniente (31,7 mm, 23,8 mm, 19 mm y 14,3 mm) y se cortaron a la longitud deseada. Antes de utilizar las membranas, se lavaron con agua Elix. Terminado el lavado, se rellenaron con las proteínas aisladas y se anudaron dejando una pequeña cámara de aire.

La diálisis se realizó a 4 frente a 4 cambios de agua con un espacio de tiempo mínimo de 4 horas. Después de los 4 cambios, se sacan las bolsas

de diálisis y se secan cuidadosamente con papel absorbente. Se cortan por uno de los extremos y se vierten las proteínas en tubos Falcons. Se guardan a 4 °C hasta su concentración.

3.2.3.8 Concentración de proteínas.

Las proteínas dializadas se concentraron en una célula con agitación de Amicon utilizando membranas Millipore YM-10. El sistema consiste en la aplicación de N₂ que ejerce presión sobre la muestra a concentrar. Esta presión fuerza el paso de aquellos solutos que presenten un tamaño inferior al del poro de la membrana (10 KDa), mientras que los solutos mayores quedan retenidos en el interior de la célula. Estas células presentan una agitación que impide que se deposite material particulado sobre la membrana taponando los poros e impidiendo la salida de los solutos más pequeños.

Para la concentración de cada una de las proteínas (SNA I, nigrina b y SNA II) se dispone de una membrana reservada específicamente para este fin. Las operaciones se realizan siguiendo las indicaciones del fabricante. Se añade primeramente agua Elix y se pone en funcionamiento una agitación suave-moderada, a continuación se abre la presión del gas hasta que alcance 2,5 kg/cm² (la presión no debe superar los 5,3 kg/cm²). Comprobando que no hay ningún problema y que la célula funciona correctamente, se repite el proceso, pero esta vez colocando la proteína a concentrar (SNA I, nigrina b o SNA II). Por lo general, la concentración deseada de nuestras proteínas está entre 2 y 3 mg/ml. Finalmente, se guardan las proteínas concentradas y el filtrado a 4 °C. Éste último se

utiliza como blanco para la determinación de la concentración de las proteínas.

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

Para establecer la concentración de la RIP nigrina b como de las lectinas SNA I y SNA II nos basamos en la fórmula descrita en 1977 por Kalb y Bernlohr.

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

Esta fórmula se basa en la realización de varias medidas espectrofotométricas a diferentes longitudes de onda. Donde A_{230} , A_{260} y A_{320} corresponden con las medidas de la absorbancia de la muestra a las longitudes de onda 230, 260 y 320 nm respectivamente.

Para la medida de las absorbancias se utiliza un espectrofotómetro HELIOS α Termo y una cubeta de cuarzo Hellma con un paso de luz de 10 mm. Como blanco se usa el filtrado resultante de la concentración de dicha proteína con la célula Amicon. El espectrofotómetro se ajusta a absorbancia cero para las longitudes de onda 230, 260 y 320 nm con la solución tomada como blanco. Una vez realizado, se diluye la muestra de la proteína correspondiente 10/1.000 con el propio blanco. Determinada la concentración de cada proteína se dividen las muestras proteicas en alícuotas y se almacenan a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.2.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La técnica empleada para determinar la pureza y la identidad de las proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Siguiendo el método de Laemmli de 1970. Para lo cual, se necesita una fuente de alimentación, una cubeta, el gel de poliacrilamida (soporte electroforético) y el tampón tanto de electroforesis como el de la muestra. Se utilizó un sistema de Amersham Biosciences.

Es importante eliminar cualquier resto de poliacrilamida anterior que pudiera interferir en el avance de las proteínas a lo largo del gel, para ello se limpian los cristales necesarios para la formación del gel con un papel impregnado en acetona. Se procede al montaje de los cristales y los separadores en su soporte específico. Una vez realizado, se prepara el gel de poliacrilamida, que está formado por dos fases. Una primera fase, inferior, se denomina gel de resolución o separador cuya composición variará en función del tamaño de las proteínas que queremos identificar, siendo de nuestro interés aquellos geles con un porcentaje de poliacrilamida del 10 y 15 %. La segunda fase, superior, se denomina gel compactador formado con un 4 % de poliacrilamida.

Se realizó la mezcla para el gel de resolución, que contenía una mezcla de un 10 ó 15 % (p/v), de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), según el gel a realizar, Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,07 % (v/v), y se vierte la solución entre los dos

cristales dejando una distancia de 2 cm del borde. Para que el frente nos quede recto y sin alteraciones se añaden 200 μ l de butanol. Una vez gelificado, se retira el butanol y se elimina cualquier resto que pudiera quedar, realizando varios lavados con agua Elix. Se prepara el gel compactador de la misma manera que el de resolución, cuya composición es 4 % (p/v) de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,08 % (p/v) y TEMED 0,08 % (v/v). Finalmente se coloca el peine, cuyo tamaño varía en función del número de muestras que deseamos analizar. Una vez polimerizado el gel, se retira el peine y se procede a lavar los pocillos de cualquier resto de poliacrilamida que pudiera haber quedado con agua Elix.

Después, las muestras se incuban durante 3 minutos a 100 °C en Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), SDS al 2 % (p/v), glicerol 10 % (v/v) y 0,025 % (p/v) de azul de bromofenol en una proporción 3:1 y en función de si se quiere reducir o no las proteínas se añade 2-mercaptoetanol, se concentran las muestras por centrifugación y se cargan las muestras en los pocillos. La electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente con una diferencia de potencial entre electrodos de 120 V y una intensidad de corriente de 25 mA por gel en tampón de electroforesis compuesto por Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v). El proceso finaliza cuando el frente formado por el azul de bromofenol se acerca al final del gel.

A continuación, se tiñe el gel con solución de tinte, que se compone de 0,125 % de azul de Commassie, 50 % metanol y 10 % de ácido acético, durante 3-4 horas con movimientos basculantes a temperatura ambiente. Y finalmente se procede al desteñido con una solución de metanol 7 % y

ácido acético al 5 %, también acompañado de movimientos basculantes. Esta solución se cambia aproximadamente cada 4 horas hasta lograr la visualización de las bandas correspondientes. Para almacenar las imágenes se procedió a escanear los geles utilizando un escáner convencional, modelo CanonScan Lide 200, acoplado a un ordenador SAMSUNG NC10.

3.2.6 Detección de la actividad hemoaglutinante de eritrocitos.

Tras determinar la concentración y corroborar la pureza de las proteínas, se comprobó su actividad mediante la técnica de hemoaglutinación. Para ello, se utilizó sangre humana, cedida por el Hospital Universitario Río Hortega, y placas de microtitulación de 96 pocillos con el fondo en forma de U, procediendo como se indica a continuación:

Una vez determinado el hematocrito, se homogeneiza la sangre y se diluye en PBS (0,14 M NaCl y 0,005 M PNa pH 7,5), logrando una suspensión del 1 % (v/v) de eritrocitos. Se colocan 30 µg de la proteína (SNA I, nigrina b o SNA II) en el primer pocillo de cada fila y se completa hasta los 100 µl con PBS (0.14 M NaCl y 0.005 M PNa pH 7,5). Al resto de los pocillos de la fila se les añade 50 µl de PBS. A continuación se procede a realizar diluciones seriadas, transfiriendo 50 µl de un pocillo a otro. Los últimos 50 µl se desechan, quedando el último pocillo como control negativo. Finalmente, se obtiene una dilución del 50 % de un pocillo respecto al siguiente (factor dilución ½). Realizadas las diluciones se añaden 50 µl de la suspensión de eritrocitos humanos al 1 % (v/v) preparada anteriormente. Se mezcla bien y se deja reposar durante 30-60

minutos. Se realizan a la par dos placas bajo las mismas condiciones, dejando una a temperatura ambiente y otra a 4 °C. La hemoaglutinación se detecta visualmente. La actividad se mide en mg/ml de proteína mínima necesaria para hemoaglutinar.

3.2.7 Purificación de proteínas de frutos de *Sambucus nigra* L.

Se partió de 100 gramos de frutos verdes de *Sambucus nigra* L. recogidos en la zona deportiva de Fuente la Mora durante agosto. Y para obtener las proteínas se operó de la siguiente manera: se machacan los frutos en un mortero de cerámica y se terminan de triturar con una batidora para conseguir un mayor rendimiento. La extracción de las proteínas se realiza en presencia de 5 volúmenes del tampón de extracción (apartado 3.2.3.4), manteniéndose con agitación a 4 °C durante toda la noche.

El extracto se filtra a través de dos gasas de nailon, eliminando así los fragmentos de los frutos verdes y las semillas. El resto del procedimiento continúa de la misma forma que en la extracción de nigrina b (apartado 3.2.3.4 y 3.2.3.5).

3.2.8 Operaciones con ratones.

3.2.8.1 Administración de sustancias.

El método empleado para la administración, tanto de la nigrina b como de otras sustancias, varía en función de las necesidades del experimento. Éstas pueden ser la velocidad de absorción, la facilidad de administración, o la tolerancia a determinadas sustancias. Los métodos utilizados en la realización de este trabajo fueron vía oral y vía intraperitoneal. Ambos métodos se realizaron con el animal consciente.

3.2.8.1.1 Vía oral.

Este método permite la administración de sustancias a través del tracto digestivo, bien de manera voluntaria (mezclando la sustancias con otros compuestos que incrementen su palatabilidad) o bien involuntaria. Se empleó esta técnica para el suministro del Poliphenon E (Pol E) a 120 mg/kg, 30 mg/kg y 16 mg/kg. Se realizó a través de una administración forzada del Pol E mediante una aguja metálica curva cuyo extremo se encuentra redondeado para evitar dañar accidentalmente el esófago. Dicha aguja presenta un diámetro de 0,8 mm. La administración forzada por vía oral requiere la inmovilización del ratón, de tal forma que queden alineados la cabeza, el cuello y el tórax. Se introduce la aguja por la boca del animal, avanzando suavemente por la faringe hasta llegar al estómago. Una vez allí, se empuja el émbolo de la jeringuilla suavemente y se procede a extraer la aguja cuidadosamente.

3.2.8.1.2 Vía intraperitoneal.

Este método permite la administración de sustancias en la cavidad peritoneal. Esta técnica se utilizó para administrar nigrina b a la concentración de 10 mg/kg. Se realizó de la siguiente forma: se prepara una jeringuilla de insulina (25 G) con la muestra a inyectar (10 mg/kg de nigrina b). Se inmoviliza al ratón cogiéndolo de la cola y se sitúa en la tapa de una jaula, así el ratón se puede agarrar a los barrotes. Se pinza con el pulgar y el índice la piel del cuello. Se levanta al ratón y sujetamos la cola entre el dedo anular y la palma de la mano. Finalmente se inclina al animal hacia la cabeza favoreciendo que los órganos abdominales se desplacen, evitando que al inyectar se produzca alguna lesión. Una vez inmovilizado el animal, se extiende una de las extremidades inferiores al tiempo que se procede a realizar la inyección.

3.2.8.2 Control de peso, anestesia y eutanasia de los ratones.

En aquellos experimentos en los que se empleó ratones durante un periodo de tiempo mayor a un día se procedió al control diario del peso corporal.

Para anestésias de corta duración se usó como anestésico el Isoflurano (ABBOTT), un potente anestésico inhalatorio, no irritante. Se administró utilizando un algodón empapado en éste, que se colocó en una caja de plástico con tapa donde se introduce al animal. Trascurrido unos 60-120 segundos el ratón queda anestesiado. Si nos excedemos del tiempo podemos producir la muerte. El uso de isoflurano se realiza siempre en una campana de extracción de gases.

Para la obtención de anticuerpos y en la perfusión para histología, se suministró una mezcla de ketamina/xilacina mediante inyección intraperitoneal, variando su proporción en función del animal y del peso. Así pues, en el caso de los ratones se emplea una dosis de 100/10 mg/kg y en el caso de los conejos una de 35/5 mg/kg. (Zúñiga y cols., 2008).

Se realizó la eutanasia mediante la combinación de dos métodos: método farmacológico y método físico. Inicialmente se sometió al ratón a un anestésico inhalatorio (método farmacológico), en nuestro caso el isoflurano, procediendo tal y como se indica en el apartado 3.2.8.2, con la diferencia de que se dejó actuar durante 3-4 minutos, ocasionando la muerte del animal por sobredosis. Por seguridad, se realiza también una dislocación cervical.

3.2.8.3 Obtención de muestras.

Durante la realización del presente trabajo se han obtenido diferentes muestras, entre ellas sangre y diferentes órganos (principalmente intestino delgado y grueso). En función del tipo de muestra se realizó una técnica u otra.

3.2.8.3.1 Sangre.

Debido a las características de nuestro experimento, se requirió obtener la máxima cantidad de sangre posible, siendo elegida la punción cardiaca como método más indicado. Esta técnica requiere anestesiarse previamente al ratón, siguiendo las indicaciones del apartado 3.2.8.2. Acto seguido se

coloca al ratón en posición *decubito supino* y se determina por palpación la zona cardiaca. Una vez localizada ésta, se procede a la inyección y a la extracción de la sangre. Es frecuente obtener un volumen sanguíneo de entre 600-900 μ l. Se finaliza el proceso con el sacrificio del animal según el apartado 3.2.8.2.

3.2.8.3.2 Órganos.

Principalmente se obtuvieron muestras de intestino delgado y grueso. Para ello, tras sacrificar al ratón (3.2.8.2), y con ayuda de unas pinzas y tijeras de disección, se realizaron tres cortes en la zona abdominal, dos longitudinales y otro transversal, dejando al descubierto la parte inferior del aparato digestivo. Para extraer el intestino en su totalidad se realizaron dos cortes, uno justo antes del estómago y otro al final del recto. Se eliminaron los restos de grasa que impedían la extracción del mismo.

3.2.8.4 Limpieza de intestinos.

Se colocaron los intestinos en una placa Petri cuadrada y se procedió a su desenmarañamiento y limpieza. Se comenzó eliminando el sistema vascular y toda la grasa que quedaba unida a la pared del intestino, con cuidado de no cortar el mismo y así obtenerlo en una pieza. Se aisló el intestino delgado y el grueso mediante un corte transversal en el píloro para eliminar el estómago, y otro en la válvula ileocecal, separando ambos intestinos.

Finalmente se limpió el quimo con PBS (0,28 M de cloruro sódico en 5 mM fosfato monosódico pH 7,5) mediante una jeringuilla de 10 ml

encajada en una punta de 20-200 μ l. Se inyectó el PBS desde uno de los extremos del intestino delgado. Si se observa alguna rotura del intestino, se corta en ese punto y se continua el procedimiento de limpieza. Se pasó tanto PBS como fue necesario para la eliminación de todos los posibles restos. Para la limpieza del intestino grueso se realizó un corte longitudinal lo que favorece la eliminación de los restos de heces y la limpieza suave de la superficie mucosa con PBS.

3.2.8.5 Determinación de la longitud de los intestinos.

Mediante unas pinzas se sujetó el intestino delgado desde uno de sus extremos y se dejó caer lentamente por peso sobre una superficie lisa en línea recta, sin llegar a estirarlo. En último lugar, se midió con una regla milimetrada. Se realizó el mismo procedimiento con el intestino grueso.

3.2.9 Actividad mieloperoxidasa por el procedimiento de la O-dianisidina.

Se realizó la medida de actividad mieloperoxidasa por el procedimiento de la O-dianisidina para determinar la infiltración de neutrófilos en los tejidos, en este caso en el intestino delgado y grueso (Bauer y cols., 2000; Xia y Zweier, 1997), según se indica a continuación:

Tras la separación del intestino delgado y del grueso, se procede a la limpieza del intestino con PBS, como se ha indicado en el apartado 3.2.8.4. Se divide el intestino delgado en tres fragmentos del mismo tamaño, aproximadamente. Se pesan todos los tramos de intestino (3 del delgado y 1

del grueso) y se trocean al máximo con tijeras de punta fina sobre una placa Petri colocada en hielo picado, de manera que la muestra este lo más próxima posible a 0-2 °C. Cada parte de intestino triturado se transfiere a un tubo Falcon, al que se añade el 10 % (peso/volumen) de tampón 50 mM fosfato potásico pH 6,0 conteniendo 0,5 % de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, y se procede a homogenizar los tejidos con el disgregador MICCRA /RT hasta conseguir un fluido lo más líquido posible. Entre muestra y muestra se desmonta la varilla y se lava bien con agua Elix para evitar contaminaciones cruzadas que puedan falsear los resultados finales. Se centrifuga el máximo volumen del homogeneizado durante 60 minutos a 3.500 rpm a 4 °C con un rotor de ángulo fijo RT 102 (Digiten-R Orto Alresa). Después se toma una alícuota de 1 ml del sobrenadante y se congela a -20 °C. Se pipetearon otras dos alícuotas de 100 µl (muestra y duplicado) del sobrenadante, que se procesaron por el método de la O-dianisidina según sigue:

Se incuban las alícuotas de 100 µl en tubos de ensayo durante 10 minutos a 20-25 °C. Después se añaden los siguientes componentes: 2.900 µl KPi + 60 µl de 20 mg/ml O-dianisidina dihidrocloruro. Se agregan 60 µl de 20 mM H₂O₂ para iniciar la reacción, se agita la mezcla de reacción y se incuba 20 minutos a una temperatura de entre 20-25 °C. Se detiene la reacción mediante la adición de 100 µl de 2 % de ázida sódica, se vuelve a agitar y se incuba 10 minutos a una temperatura entre 20-25 °C. Finalmente se centrifuga a 2.500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 23 °C para sedimentar los posibles precipitados que se formen. Se mide la absorbancia a 460 nm. La actividad enzimática se expresa como A₄₆₀ en las condiciones de reacción.

3.2.10 Estudio de la mortalidad en ratones promovida por Polyphenon E en combinación con nigrina b

Los efectos causados tras la aplicación de Polyphenon E (Pol E) a diferentes dosis en presencia/ausencia de distintas dosis de nigrina b son determinados mediante el análisis de supervivencia. Este análisis consiste en medir el tiempo que transcurre desde que se suministra el Pol E y la nigrina b a los ratones hasta que se produce la muerte del animal.

Para cada experimento se utilizó un grupo de 7 ratones *Swiss* hembras, con un peso corporal medio alrededor de 25 g. Los diferentes tratamientos se administraron por vías intraperitoneal (IP) y vía oral (O), siguiendo las indicaciones dadas en el apartado 3.2.8.1. A continuación se muestra un listado con las diferentes dosis suministradas y su vía de administración:

- 16 mg/kg Ng b IP
- 16 mg/kg Ng b IP + 120 mg/kg Pol E IP
- 16 mg/kg Ng b O + 120 mg/kg Pol E O.
- 16 mg/kg Ng b IP + 120 mg/kg Pol E O.
- 16 mg/kg Ng b IP + 30 mg/kg Pol E O.
- 16 mg/kg Ng b IP + 16 mg/kg Pol E O.
- 10 mg/kg Ng b IP
- 10 mg/kg Ng b IP + 120 mg/kg Pol E O.
- 10 mg/kg Ng b IP + 30 mg/kg Pol E O.
- 10 mg/kg Ng b IP + 16 mg/kg Pol E O.
- 120 mg/kg Pol E IP
- 120 mg/kg Pol E O.

- 30 mg/kg Pol E O.

Una vez realizado el experimento se representaron los datos obtenidos mediante una curva de supervivencia Kaplan-Meier.

3.2.11 Determinación histológica de los efectos del Polyphenon E.

Para poder determinar los cambios histológicos producidos por la combinación de nigrina b y Polyphenon E se realizaron, con ayuda del personal técnico del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología, cortes histológicos de varios tejidos: intestino delgado, intestino grueso, hígado, riñón y pulmón. Posteriormente se tiñeron las muestras con hematoxilina/eosina.

El proceso que se detalla a continuación se realizó con ratones *Swiss* hembra de unos 25 gramos tratados bajo las siguientes condiciones:

- Control negativo: inyección IP con 100 µl PBS
- Nigrina b 10 mg/kg IP 24h
- Nigrina b 10 mg/kg IP 48h
- Nigrina b 10 mg/kg IP 72h
- Nigrina b 10 mg/kg IP + Pol E 30 mg/kg O 24h
- Nigrina b 10 mg/kg IP + Pol E 30 mg/kg O 48h
- Nigrina b 10 mg/kg IP + Pol E 30 mg/kg O 72h
- Nigrina b 16 mg/kg IP + Pol E 30 mg/kg O 48h
- Pol E 30 mg/kg O

3.2.11.1 Perfusión de los animales.

Para la perfusión de los ratones se anestesian con una mezcla de ketamina/xilacina, según se indica en el apartado 3.2.8.2. Por vía IP se inyecta nitrito sódico al 1 % y heparina al 1 % a partes iguales. Después se conecta el sistema de perfusión al ventrículo izquierdo y se abre un pequeño agujero en la aurícula derecha, permitiendo la salida de la sangre y posteriormente del resto de soluciones, lavadora y fijadora.

Primero se lava la sangre del ratón pasando una solución salina tamponada (0,154 M cloruro sódico en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4) durante 3 minutos, a la vez que se vierte, agua tibia por encima del abdomen, favoreciendo la vasodilatación y la eliminación de los restos de sangre. A continuación se cierra la vía de la solución salina y se abre la de la fijadora, que en este caso es paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, y se deja pasar durante aproximadamente 10 minutos. Para asegurarnos de que está bien perfundido se deja sumergido al ratón en la solución fijadora toda la noche a 4 °C.

3.2.11.2 Toma de muestras de los tejidos.

Se extrae al ratón de la solución fijadora y se lava con PBS. Posteriormente se procede a cortar, con ayuda de unas tijeras y unas pinzas, fragmentos de los tejidos que se desean analizar, que en este caso son: intestino delgado, intestino grueso, hígado, riñón y pulmón. Finalmente se coloca cada fragmento en un *cassette*.

3.2.11.3 Inclusión de los tejidos en parafina.

Se introducen los *cassettes* con las muestras en el procesador automático de parafina (Leica TP 1020) programado previamente para que transcurrido el tiempo idóneo cambien de solución. Programa a seguir: 1 hora en EtOH a 50 %, 1 hora en EtOH a 70 %, 1 hora en EtOH a 80 %, 1 hora en EtOH a 96 %, 1 hora en EtOH I a 100 %, 1 hora en EtOH II a 100 %, 1 hora en EtOH III a 100 %, 1 hora en Xileno I, 1 hora en Xileno II, 2 horas en Parafina I y para finalizar otras 2 horas en Parafina II.

Terminado el ciclo, se cogen los *cassettes* y se realizan los bloques de parafina correspondientes. Para ello se utiliza el dispensador de parafina (Oxford Trade), con el cual se rellena un molde y se coloca una de las piezas tratadas en la orientación deseada. Seguidamente se deposita en la zona fría para que solidifique, situando la base del *cassette* como futuro soporte del bloque, donde inicialmente se procedió a deshidratar e incluir la muestra en parafina. El bloque se desmolda y se guarda hasta la realización de los cortes para su posterior tinción.

3.2.11.4 Realización de cortes de tejido.

Los cortes se obtuvieron como se indica a continuación: se talla el bloque parafina con una cuchilla, se le da forma de trapecio, quedando nuestra muestra en el centro y se procede a realizar los cortes con el microtomo. Una vez puesta una cuchilla y colocada en su soporte la pieza, se alinean una respecto a la otra y se comienza a devastar el bloque, hasta que salen las primeras piezas. Obtenida la zona que se quiere analizar, se disminuye el grosor de corte (5-10 μm). Con un pincel y unas pinzas se

sujeta la tira de cortes consecutivos de interés, realizada con el microtomo (aproximadamente se consigue que cada tira presente 4 cortes). Se dejan los cortes durante 1 minuto en EtOH al 30 %. A continuación se pasan a un baño de agua con gelatina al 0,1 %. En este punto se tendrán los cortes flotando estirados en el agua con gelatina, por lo que pueden recogerse con el portaobjetos directamente. Para concluir se dejan secar en los portaobjetos, y se sitúan en los soportes respectivos para realizar la tinción.

3.2.11.5 Tinción con hematoxilina/eosina.

A la hora de la tinción se dispone de múltiples recipientes con las diferentes soluciones por las que pasamos los portaobjetos para la tinción final de los cortes. A continuación se procede como sigue:

Se desparafina durante 3 minutos en Xileno I, 3 minutos en Xileno II y 3 minutos en Xileno III. Después se prosigue hidratando los cortes durante 2 minutos en EtOH a 100 % I, 2 minutos en EtOH a 100 % II, 2 minutos en EtOH a 96 %, 2 minutos en EtOH a 80 %, 2 minutos en EtOH a 70 %, 2 minutos en EtOH a 50 %, 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 vuelve a deshidratar durante 3 minutos con 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, con Xileno II otros 5 minutos y por último con Xileno III otros 5 minutos. Finalmente, se montan con Entellán (medio de montaje rápido para microscopía, de MERK). Se aplican unas gotitas de este

producto sobre los mismos y se colocan encima el cubreobjetos. Una vez seco, está listo para observarse al microscopio.

3.2.11.6 Visualización al microscopio óptico.

Con la ayuda del Dr. Gayoso (Dpto. Biología Celular, Histología y Farmacología, Universidad de Valladolid) se observaron las diferentes muestras ya cortadas y teñidas mediante un microscopio óptico Axiophot Cam HRc Zeiss, conectado a un ordenador Acer Aspire AMD 64. Se realizaron fotos de los cortes a 10, 20 y 40 aumentos.

3.2.12 Digestibilidad de la nigrina b.

El estudio de la degradación *in vitro* de la nigrina b requiere una comparativa entre la nigrina b, obtenida de la corteza, y la nigrina f, obtenida de frutos. Frente a estos dos estudios comparativos incluimos un tercero que implica la degradación de un producto de venta para el consumo humano, como es un jarabe comercial de saúco.

3.2.12.1 Digestibilidad *in vitro* de la nigrina b.

Para llevar a cabo la digestión *in vitro* de la nigrina b se realizaron dos digestiones enzimáticas diferentes, una con pepsina y otra con pancreatina. Los protocolos seguidos para este fin, aunque con ligeras modificaciones, fueron los descritos por Koppelman y cols. (2010) y Fu y cols.(2002), respectivamente. Las proteasas se disolvieron justo antes de su uso para evitar una pérdida de actividad por autodigestión.

Primero se realizó una digestión enzimática con pepsina simulando el contenido gástrico. Para ello, se incubó durante 1 hora a 37 °C 60 µg de nigrina b en SGF (Simulated Gastric Fluid) compuesto por: 0,063 N HCl, 30 mM NaCl ajustado a un pH de 1,2 y 300 µg de pepsina, disuelta inmediatamente antes de la incubación. La reacción se detuvo añadiendo 27 µl de NaHCO₃ 200 mM.

La segunda digestión que se realizó con pancreatina simula el contenido intestinal. Para ello, se incubó durante 1 hora a 37 °C 60 µg de nigrina b en SIF (Simulated Intestinal Fluid) compuesto por: 0,05 M KH₂PO₄ ajustado a un pH de 7,5. Al igual que en el caso anterior, se disuelven 780 µg de pancreatina justo antes de su utilización. Se detuvo la reacción hirviendo la mezcla durante 10 minutos.

La tercera digestión se asemeja a la primera (digestión con pepsina), pero sufriendo un tratamiento anterior a la digestión, es decir, la desnaturalización previa de la nigrina b. A través de un tratamiento térmico (10 minutos en ebullición) se desnaturalizó la nigrina b y a continuación se procedió a la digestión de la proteína con pepsina siguiendo las indicaciones de la primera digestión efectuada.

Todas estas digestiones se analizaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (apartado 3.2.5), pudiendo observarse, tras el tñido y destñido correspondiente del gel electroforético, la degradación de la proteína. Siempre como control positivo de la degradación se incluyó 50 µg de BSA.

3.2.12.2 Digestibilidad *in vitro* de la nigrina f.

Se partió de una mezcla de nigrina f y SNA IV. Se realizaron dos digestiones con 60 µg cada una. Una primera sin desnaturalizar las proteínas y la segunda desnaturalizando mediante tratamiento térmico (10 minutos en ebullición). Para su digestión se incubó la nigrina f y la SNA IV durante una hora a 37 °C en SGF y se detuvo la reacción con 27 µl de NaHCO₃ 200 mM. Finalmente se determinó la degradación de las proteínas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida siguiendo las indicaciones del apartado 3.2.5.

3.2.12.3 Digestibilidad de las proteínas de un jarabe comercial de saúco.

Antes de realizar la digestión enzimática *in vitro*, se analizó una muestra de jarabe mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (apartado 3.2.5), para ver la concentración de proteína que presentaba. Al no apreciarse una gran cantidad de proteína se decidió precipitarla. Para ello se partió de una alícuota de 1 ml del jarabe, y se precipitó la proteína con TCA al 5 %, se hirvió durante 10 min. y se centrifugó 1 min. a 10.000 rpm. Se finalizó la preparación de la muestra resuspendiendo el pellet en 100 µl de tampón de electroforesis, compuesto por Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v). Se compararon los resultados de la muestra digerida mediante un análisis con electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, previa a la digestión, en condiciones tanto reductoras como no reductoras.

La digestión enzimática de 20 μl del jarabe precipitado con TCA se realizó con 300 μg de pepsina disuelta en SGF. Se incubó 1 hora a 37 °C y se detuvo la digestión con 10 μl de 200 mM NaHCO_3 , según se indica en el apartado 3.2.12.1. A continuación se analizó la muestra por electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS (apartado 3.2.5). Por otro lado, se desnaturizó durante 10 minutos en ebullición otra alícuota de 20 μl del jarabe precipitado y seguidamente se procedió a su digestión siguiendo las indicaciones del párrafo anterior. Se analizó la muestra nuevamente con una electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS (apartado 3.2.5).

3.2.13 Obtención de anticuerpos policlonales.

3.2.13.1 Por inyección del antígeno en el ganglio poplíteo.

Este procedimiento se llevó a cabo con la inestimable ayuda del veterinario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Se procedió según se indica a continuación:

Para la inmunización del conejo, el primer día se inyectan 200 μl de azul de Evans al 1 %, disuelto en tampón PBS (fosfato monosódico 5 mM y cloruro sódico 0,14 M) entre los dedos meñique y anular de una de las patas traseras. A las 24 horas se anestesia el conejo según las indicaciones del apartado 3.2.8.2. A través de la palpación se localiza el ganglio poplíteo y se realiza un pequeño corte dejándolo a la vista (color azulado, debido a la inyección de azul de Evans del día anterior). Dentro del ganglio se inyectan 100 μl de una solución de 100 μg de nigrina b en fosfato monosódico 5 mM (pH 7,5), cloruro sódico 0,14 M y 50 % de adyuvante

de Freund Completo. A continuación se cose la herida y transcurridas cuatro semanas se le inyecta subcutáneamente en el lomo una solución de 100 µg de nigrina b en fosfato monosódico 5 mM (pH 7,5), cloruro sódico 0,14 M, pero con adyuvante de Freund Incompleto. A los quince días se extrae la sangre por la vena de la oreja, recogiénose en un vaso de precipitados aproximadamente 200 ml. En el caso de que se dificulte la extracción de la sangre se procede a la punción cardíaca.

Se incuba la sangre obtenida durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se deja a 4 °C durante 20 horas para que el coagulo se contraiga. Se decanta el suero resultante y se centrifuga a 4.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C con un rotor basculante RT 142 (Digiten-R Orto Alresa). Se recoge el sobrenadante filtrándolo a través de una gasa, desechando el coágulo contraído. Seguidamente se reparte en alícuotas y se almacena a -20 °C hasta la purificación de los anticuerpos.

3.2.13.2 Purificación de anticuerpos policlonales de suero de conejo.

La purificación se llevó a cabo según describieron Harlow y Lane (1988), mediante cromatografía de afinidad a través de una columna de 5 ml de proteína A-Sepharose (HiTrap Protein A HP, GE Healthcare), que liga específicamente la fracción constante de las Ig G. Una alícuota (1 ml) obtenida anteriormente (apartado 3.2.13.1) se ajustó a pH 8, con 1/10 del volumen de Tris-HCl 1 M (pH 8). Se aplicó a la columna de proteína A-Sepharose previamente equilibrada con 10 volúmenes de Tris-HCl 100 mM (pH 8). La fracción no retenida se desechó y la columna se lavó con aproximadamente 10 volúmenes de Tris-HCl 100 mM (pH 8) y otros 10 volúmenes de Tris-HCl 10 mM (pH 8).

La elución de anticuerpos retenidos se llevó a cabo con glicina 100 mM (pH 3). Se recogieron fracciones de 500 μ l sobre 50 μ l de 1 M de Tris-HCl (pH 8) con objeto de neutralizar el pH. Se juntaron las fracciones que contenían los anticuerpos midiendo la absorbancia a 280 nm y se calculó la concentración de proteínas considerando que una unidad de absorbancia a 280 nm equivale a 0,8 mg/ml. El anticuerpo se almacenó a una concentración final de 1 mg/ml en glicerol al 50 % (v/v) y ázida sódica al 1 % a -20 °C.

3.2.14 Electrotransferencia de proteínas a membranas “Western blot”.

Para evaluar el rendimiento de nuestro anticuerpo primario se llevó a cabo un “Western blot”. Para ello se fijó la nigrina b (control positivo) a una membrana. A continuación se incubó con diferentes diluciones de nuestro anticuerpo primario, después se incubó con el anticuerpo secundario, se reveló y se eligió la dilución de anticuerpo con la señal más apropiada.

Para llevar a cabo el procedimiento es necesario realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de la nigrina b, siguiendo las indicaciones del apartado 3.2.5, pero esta vez sin llegar a teñir el gel, para posteriormente transferir la proteína a una membrana PVDF de 0,45 μ m de poro (Inmobilon-P de Millipore). Previamente se trató la membrana cortada a medida del gel con metanol al 100 % durante 15 segundos y con agua Elix durante 2 minutos. Finalmente se equilibró la membrana con el tampón de transferencia (125 mM Tris, 192 mM Glicina y SDS al 0,1 %).

A la vez se prepararon 6 papeles Whatman n° 3 del tamaño del gel (9,5 cm x 8 cm) humedeciéndolos en el mismo tampón de transferencia.

El módulo en el que se realizó la transferencia se preparó colocando sobre el cátodo, y en el siguiente orden, una esponja, 3 papeles Whatman, el gel, la membrana, otros 3 papeles Whatman y por último dos esponjas, según el protocolo descrito por la casa comercial Amersham Biosciences. Una vez montado, se rellenó con el tampón de transferencia y se colocó en la cubeta, que contenía agua Elix a 4 °C. Se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se programó durante 1 hora a 25 V con una intensidad de 300 mA.

3.2.15 Inmunodetección de proteínas.

La detección de la proteína en la membrana se realizó mediante inmunodetección, como sigue: se bloquea la membrana en TBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,9 % (p/v)), con BSA al 2 % a 4 °C durante toda la noche y se lava 3 veces con TBS durante 5 minutos con agitación. A continuación se incuban porciones regulares de la membrana, cada una de ellas con una de las diferentes diluciones del anticuerpo primario antinigrina b (1/500, 1/1.000, 1/2.000), diluido en TBS con BSA al 0,1 % (p/v), durante 2 horas a temperatura ambiente sin agitación. Se vuelve a lavar la membrana siguiendo las pautas anteriores y se incuba durante 1 hora con el anticuerpo secundario comercial (anticuerpo de cabra frente a anticuerpo de conejo marcado con fosfatasa alcalina de Sigma-Aldrich) diluido 1/7.000 en TBS con BSA 1 % (p/v). Se vuelve a lavar la membrana

otras tres veces durante 5 minutos y se revela la señal de los anticuerpos mediante la incubación de unos minutos con NBT 0,375 % (v/v) (disuelto a 77 mg/ml en dimetilformamida) y 0,5 % (v/v) de X-fosfato (disuelto 50 mg/ml en dimetilformamida) en Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, conteniendo cloruro magnésico 0,05 M y cloruro sódico 0,1 M. Ambos sustratos se preparan inmediatamente antes de su uso. Tras 5 minutos aproximadamente, se desarrolla totalmente el color. Se detiene la reacción lavando con agua, se deja secar la membrana y se observan los resultados.

3.2.16 Farmacocinética de la nigrina en suero.

Se inyectaron 10 mg/kg de nigrina b a tres ratones. Transcurridas 1, 3 y 7 horas, se sacrifica el animal correspondiente para la mayor cantidad de sangre posible, por punción cardiaca, según se indica en el apartado 3.2.8.3.1. La sangre se procesa mediante una centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos. El suero resultante se divide en alícuotas y se congela a -20 °C hasta su posterior análisis.

La detección de la presencia de nigrina b en la sangre se llevó a cabo a través de un “Western blot” de los sueros procesados, siguiendo las indicaciones del apartado 3.2.14, utilizando una dilución de anticuerpo primario de 1/1.000.

3.2.17 Análisis estadístico.

Los datos se expresan como medias \pm SEM (error estándar de la media) de ratones/experimento. Los valores fueron analizados mediante el test ANOVA para comparar diferencias entre grupos, y la prueba t-student para comparar las medias entre dos muestras. P-valor por debajo de 0,05, indica una diferencia estadísticamente significativa entre las dos muestras con una confianza del 95%. Ambos análisis se realizaron con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

4. RESULTADOS.



4.1 Aislamiento de nigrina b de corteza de *S. nigra*.

4.1.1 Obtención de nigrina b.

El procedimiento clásico de preparación de nigrina b a partir de corteza de *Sambucus nigra* L. (Girbés y cols., 1993b) consiste en la obtención de la corteza secundaria de las ramas en fresco y obtención de los extractos proteicos que, previa clarificación por centrifugación, se someten a la cromatografía de afinidad descrita en el apartado 3.2.3.5. Este procedimiento aunque rinde proteína con gran actividad biológica, presenta un rendimiento relativamente bajo: 86 µg/ml por gramo de corteza húmeda. Por ello, uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar si la utilización de corteza desecada a temperatura ambiente no superior a los 25 °C, y con buena aireación, podría utilizarse como fuente de partida de nigrina b. Esto es, si el proceso de deshidratación pudiera afectar a la actividad biológica de las proteínas fijadoras de D-galactosa, nigrina b, SNA I y SNA II. El secado a temperatura ambiente con aireación permite reducir el 68 % del peso de la corteza secundaria húmeda.

En la preparación de nigrina b a partir de corteza húmeda se trocea y se tritura con mortero. Dada la dureza de la corteza y su carácter celulósico rígido permite una extracción menor que en el procedimiento de obtención a partir de corteza seca, que se tritura en molinillo y por ello, ofrece una superficie mucho mayor al tampón acuoso. Los resultados se presentan en la figura R1, y como puede observarse, el procedimiento a partir de corteza seca rinde 2-2,5 veces más proteínas fijadoras de D-galactosa que a partir de corteza húmeda. Esto supone un rendimiento mayor a partir de corteza

seca, porque la cantidad final es superior a la que correspondería por la simple reducción de agua. Por lo tanto, se utilizó la corteza seca para la obtención de nigrina b mediante el procedimiento de afinidad.

Estudios recientes (Ferrerías y cols., 2011) indican que la expresión de las lectinas de la corteza de *Sambucus nigra* está sometida a un fino control estacional esencialmente ligado a la temperatura media y que determina no sólo la cantidad total de lectina, sino también la proporción relativa de las tres lectinas SNA I, nigrina y SNA II. Por ello, se procedió al aislamiento y comparación de la nigrina b obtenida a partir de corteza de primavera y verano.

Como se indica en la figura R2, la corteza de primavera aislada a mediados de marzo rindió una colección de lectinas que se parece más al patrón obtenido en invierno que al obtenido en primavera (Ferrerías y cols., 2011). Ello no es de extrañar, teniendo en cuenta las bajas temperaturas experimentadas en esa época.

En la figura R3 se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes al aislamiento de las lectinas a partir de corteza de mediados del mes de julio. En este caso, el perfil de las lectinas es el que corresponde con el perfil de verano. En consecuencia, para la obtención de nigrina b se utilizó corteza seca obtenida en julio, a pesar de que la cantidad total de lectina fue ligeramente inferior a la obtenida en abril.

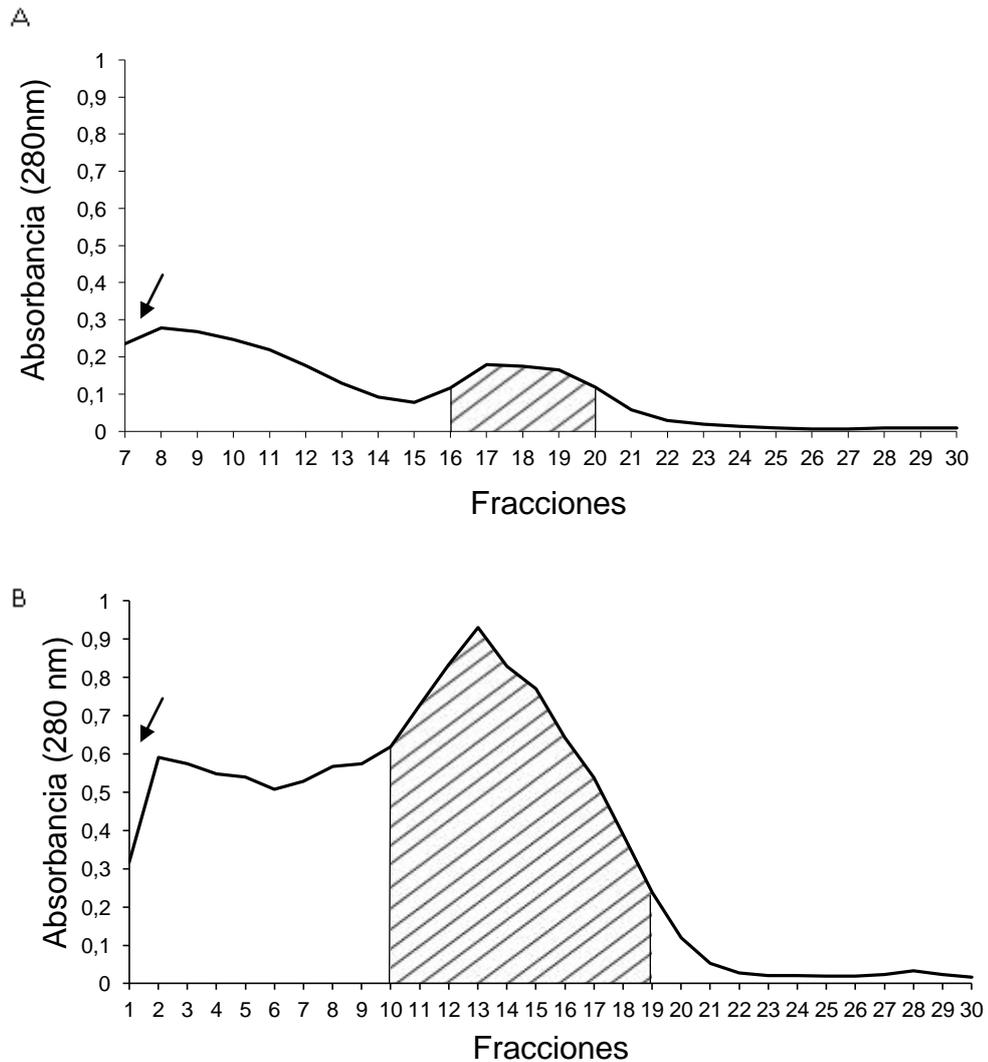


Fig. R1. Cromatografía de afinidad en AT-Sepharose 6B. Para ambos experimentos se utiliza la misma corteza recogida en abril. **A:** Se procesaron 107 gr de corteza secundaria fresca y se obtuvieron 0,902 mg/ml de proteínas (9,17 mg en total); **B:** Se procesaron 106, 93 gr de corteza secundaria verde secada a temperatura ambiente, resultando 34,76 gr de corteza seca. Se recogieron 7,97 mg/ml de proteínas (59,76 mg totales). La flecha indica la adición de lactosa.

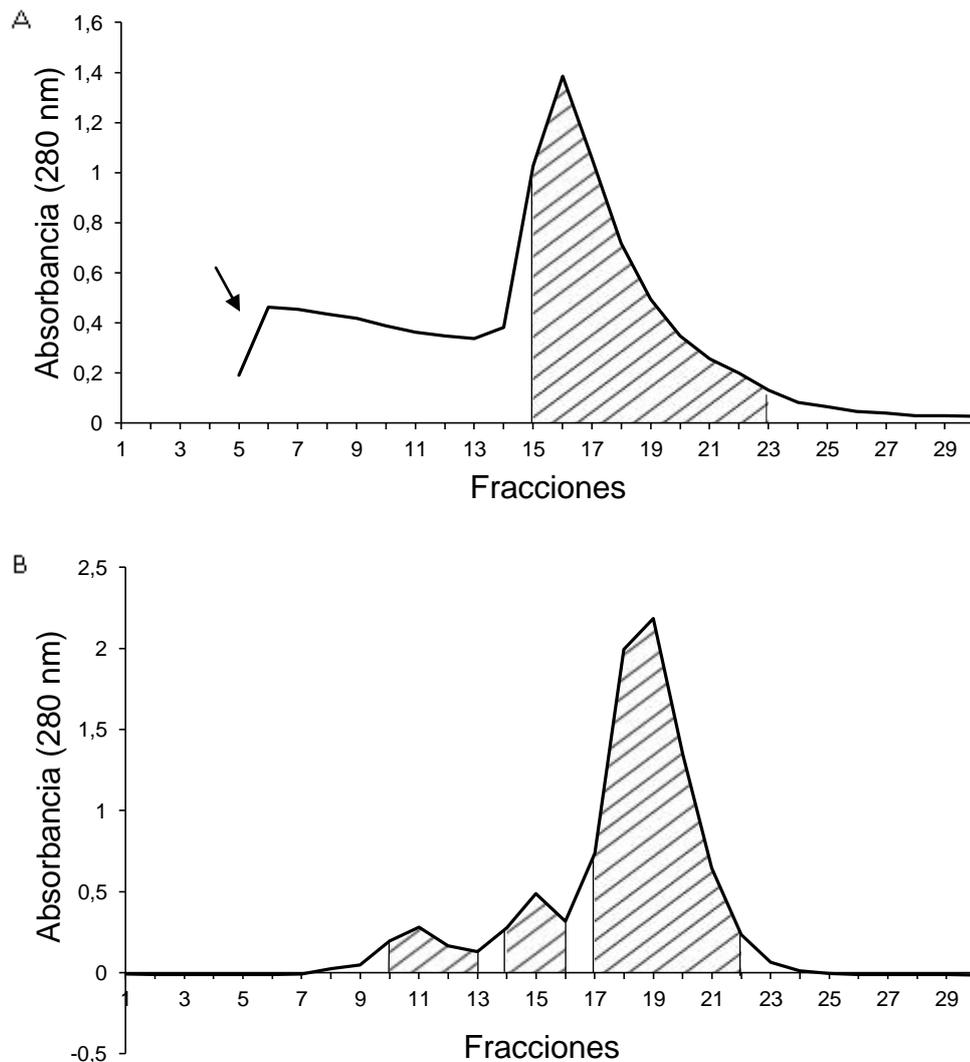


Fig. R2. A: Cromatografía de afinidad en AT-Sepharose 6B. El extracto correspondiente a la corteza recogida a mediados de marzo se sometió a cromatografía de afinidad en AT-Sepharose 6B como se indica en el apartado 3.2.3.5. Se recogió el volumen indicado por el área rallada. La flecha indica la adición de lactosa; **B: Cromatografía de intercambio iónico en Superdex 75.** Las proteínas procedentes de la cromatografía de afinidad se concentraron y se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75, como se indica en el apartado 3.2.3.6. Se recogieron los picos correspondientes a cada proteína: SNA I (10 a 12), nigrina b (14 y 15) y SNA II (17 a 22) como indica el área rallada, obteniendo 0,73 mg/ml de SNA I (2,293 mg totales), 2,62 mg/ml de nigrina b (6,03 mg en total) y 5,06 mg/ml de SNA II (30,37 mg totales).

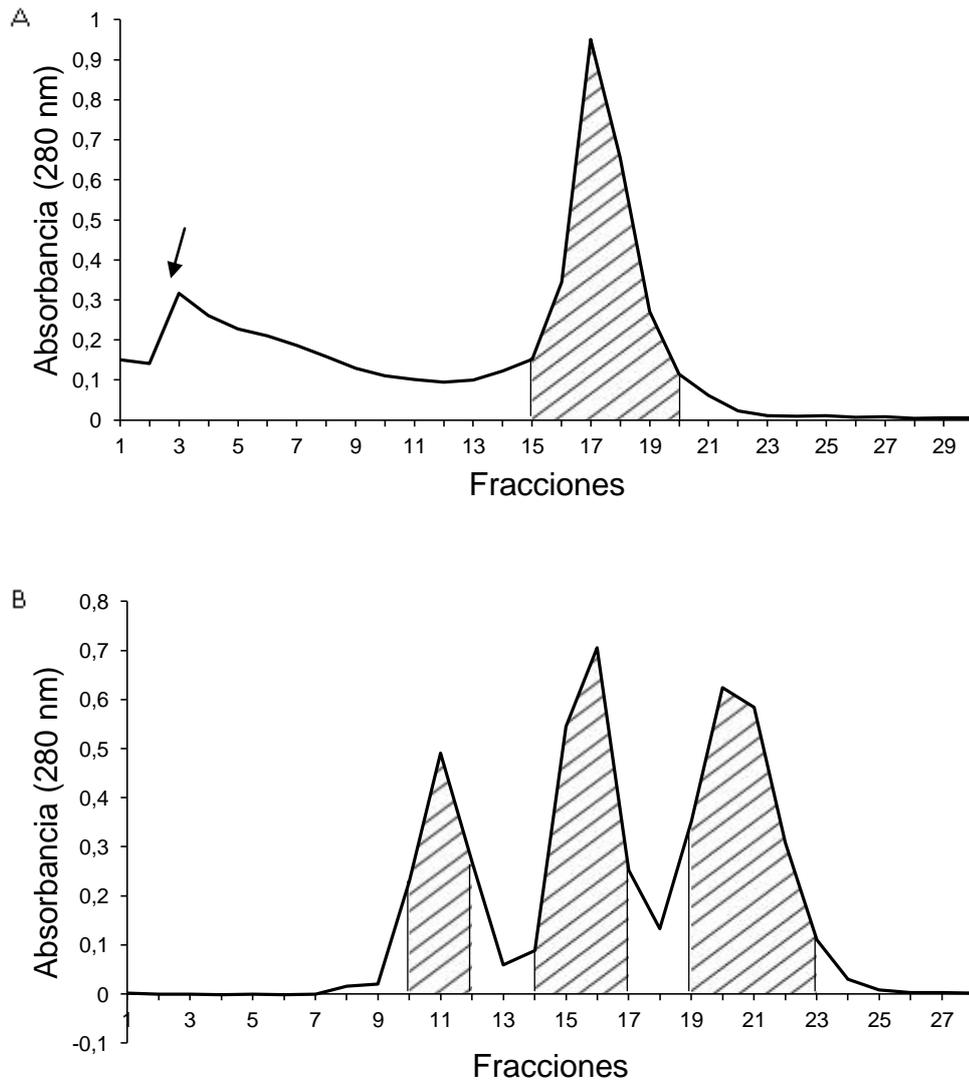


Fig. R3. A: Cromatografía de afinidad en AT-Sepharose 6B. El extracto proteico correspondiente a la corteza recogida a mediados de julio se sometió a cromatografía de afinidad en AT-Sepharose 6B como se indica en el apartado 3.2.3.5. Se recogieron las fracciones correspondientes al pico de afinidad (fracciones de la 15 a la 20). La flecha indica la adición de lactosa; **B: Cromatografía de intercambio iónico en Superdex 75.** Las proteínas procedentes de la cromatografía de afinidad se concentraron y se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular Superdex 75, como se indica en el apartado 3.2.3.6. Se recogieron los picos correspondientes a cada proteína; SNA I (10 a 12), nigrina b (14 a 17) y SNA II (19 a 23), que corresponde con el área rallada. Se obtuvo 1,84 mg/ml de SNA I (3,31 mg de proteína total), 2,73 mg/ml de nigrina b (5,46 mg en total) y 3,26 mg/ml de SNA II (6,53 mg totales).

4.1.2 Caracterización químico-física y funcional de las lectinas de corteza de *S. nigra*.

En la figura R4 se presentan las electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las preparaciones de lectinas de las dos figuras anteriores. En el panel A se presentan los resultados obtenidos en ausencia y presencia de 2-mercaptoetanol; mientras que SNA I y nigrina b aparecen como proteínas homogéneas (nigrina b con una pequeña contaminación de SNA II). La SNA II presenta heterogeneidad, debida, muy probablemente, a distintos niveles de glucosilación de la cadena polipeptídica y posiblemente el plegamiento dependiente de puentes disulfuro intracatenarios, condicionamiento que desaparece en presencia de 2-mercaptoetanol. Este efecto de los puentes disulfuro intracatenarios se aprecia mejor en un gel de mayor porosidad que permite una mayor penetración de la proteína plegada. De hecho, en la figura R4B en ausencia de reductor, el plegamiento permite la separación de al menos 4 especies de lectina, mientras que en presencia del mismo, es decir, con los puentes disulfuros reducidos, se reduce solamente a una, que además al estar más desplegada corre menos que las formas más compactas en ausencia de reductor.

Para caracterizar funcionalmente las tres lectinas, SNA I, nigrina b y SNA II, se procedió al análisis de la capacidad hemoaglutinante. Como se muestra en la figura R5 la hemoaglutinación total se obtuvo a las concentraciones de 18,9, de 0,4 y de 76 $\mu\text{g/ml}$ de nigrina b, SNA I y SNA II. Para determinar con mayor precisión los valores de SNA I se realizó otro experimento a mayor dilución, dando un resultado similar. Resultados recientes (Citores y cols., 2008) indican que la interacción de las lectinas de

hojas de *Sambucus ebulus* con una matriz densa de D-galactosa (Sepharose 6B tratada con ácido) es mayor entre 2-4 °C que a temperatura ambiente. Por ello, se probó si esta dependencia era efectiva también en la hemoaglutinación. Y como se observa en la figura R6 la hemoaglutinación era ligeramente superior en los tres casos. La hemoaglutinación de las lectinas obtenidas a partir de la corteza de julio, figuras R7 y R8, dieron resultados muy similares a los obtenidos con las lectinas obtenidas en abril.

A

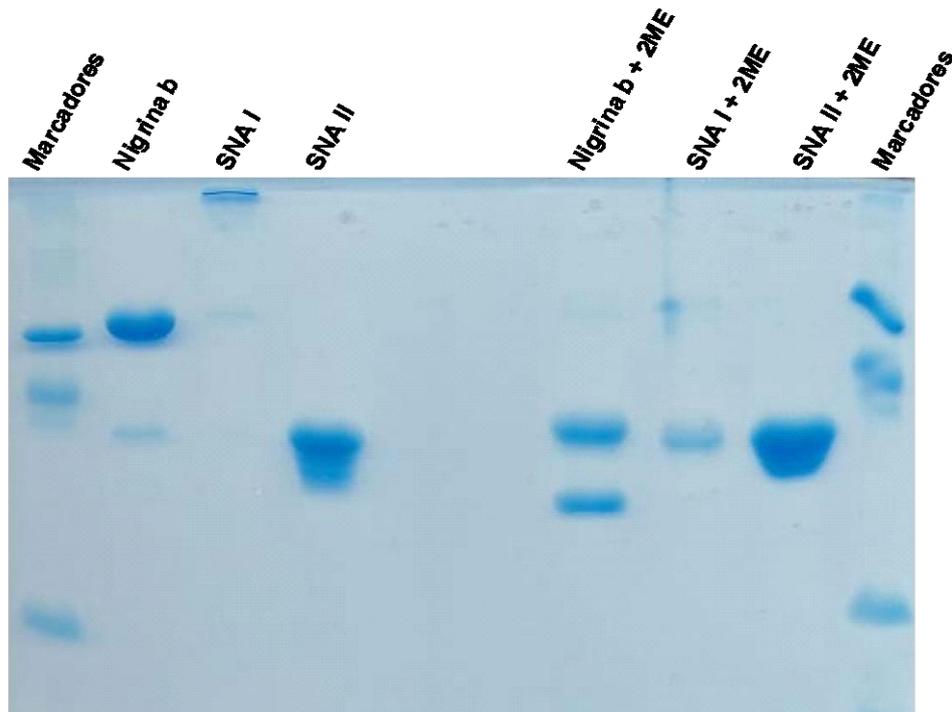


Fig. R4. A: Análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS de SNA I, Ng b y SNA II. La electroforesis de las proteínas presentes en la corteza de *Sambucus nigra* L. que se muestra en la figura se llevo a cabo en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol con 60 µg de proteína por calle. La visualización de proteínas se realizó por tñido con una solución de Azul de Coomassie, detallado en el apartado 3.2.5. Como marcador molecular se utilizó BSA (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa) e inhibidor de tripsina de soja (20 KDa);

B

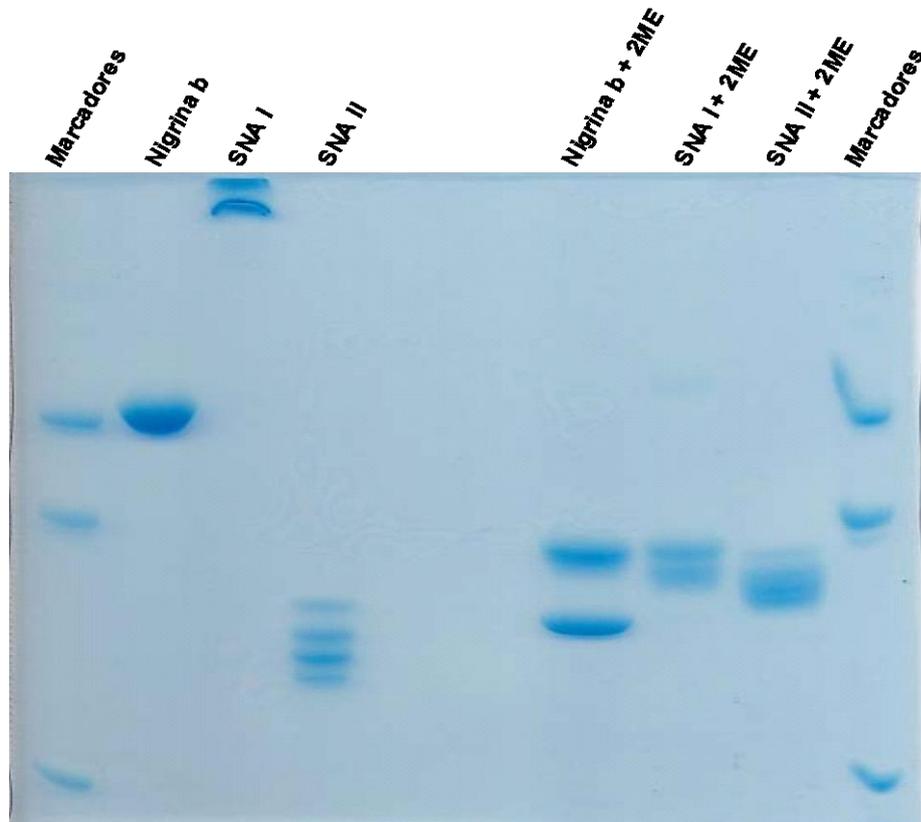


Fig. R4. B: Análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS de SNA I, Ng b y SNA II. Realizado en las mismas condiciones que la figura R4A, con la diferencia de que se utilizó un gel del 10 %.

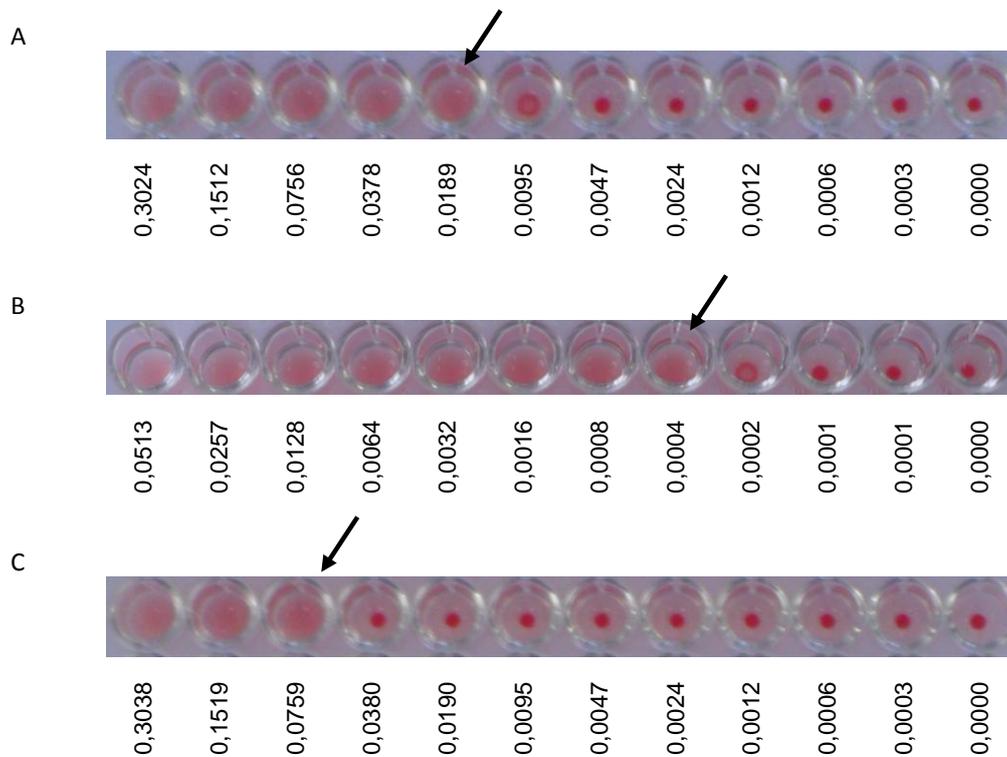


Fig. R5. Detección de la actividad hemoaglutinante en eritrocitos humanos O⁺ a temperatura ambiente. La hemoaglutinación se realizó según se describe en el apartado 3.2.6 de una extracción realizada con corteza de abril. Las cifras indicadas representan la concentración de proteínas en mg/ml. El control sin proteína se indica con 0,000. Las flechas indican hemoaglutinación total. **A:** nigrina b; **B:** SNA I; **C:** SNA II

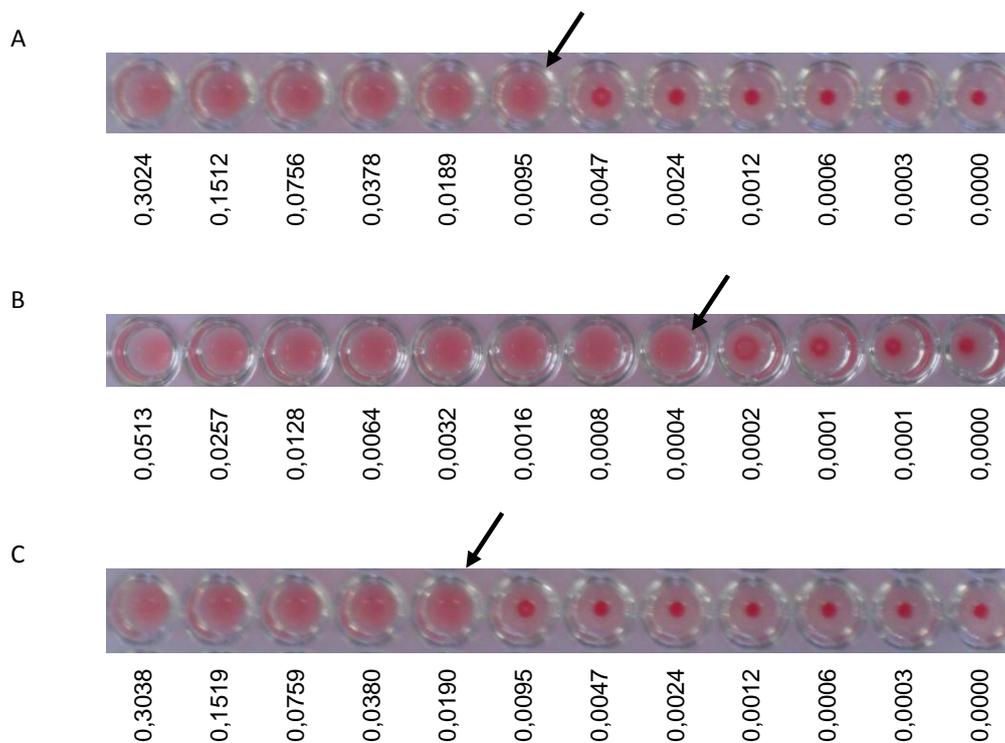


Fig. R6. Detección de la actividad hemoaglutinante en eritrocitos humanos O⁺ a 4 °C. La hemoaglutinación se realizó según se describe en el apartado 3.2.6 de una extracción realizada con corteza de abril. Las cifras indicadas representan la concentración de proteínas en mg/ml. El control sin proteína se indica con 0,000. Las flechas indican hemoaglutinación total. **A:** nigrina b; **B:** SNA I; **C:** SNA II

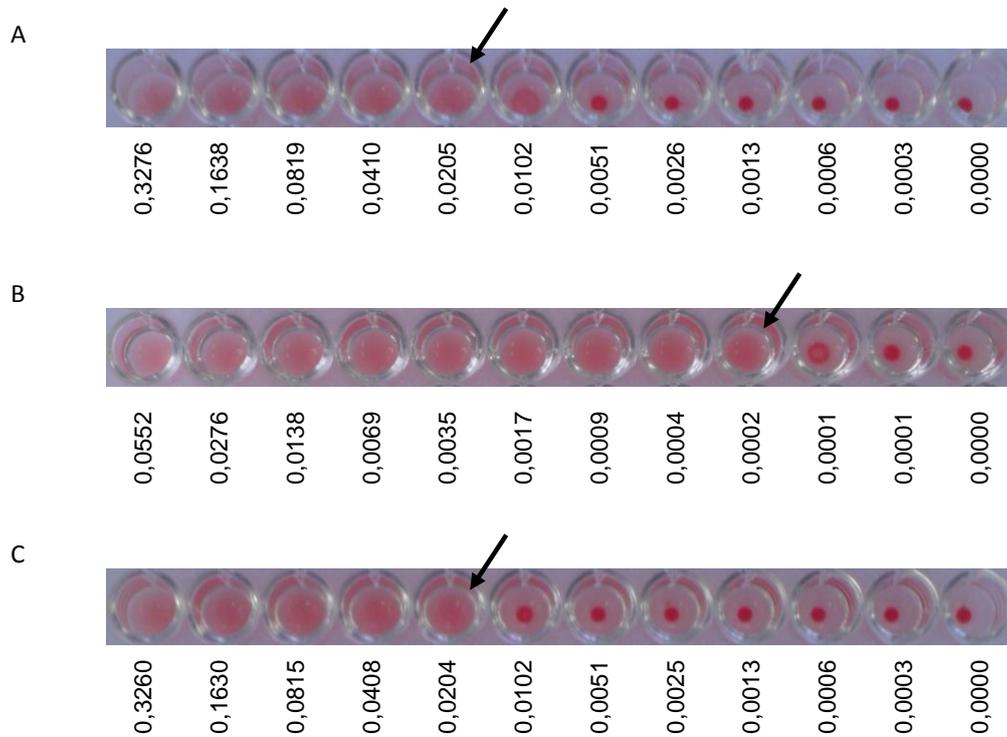


Fig. R7. Detección de la actividad hemoaglutinante en eritrocitos humanos O⁺ a temperatura ambiente. La hemoaglutinación se realizó según se describe en el apartado 3.2.6 de una realizada con corteza de julio. Las cifras indicadas representan la concentración de proteínas en mg/ml. El control sin proteína se indica con 0,000. Las flechas indican hemoaglutinación total. **A:** nigrina b; **B:** SNA I; **C:** SNA II

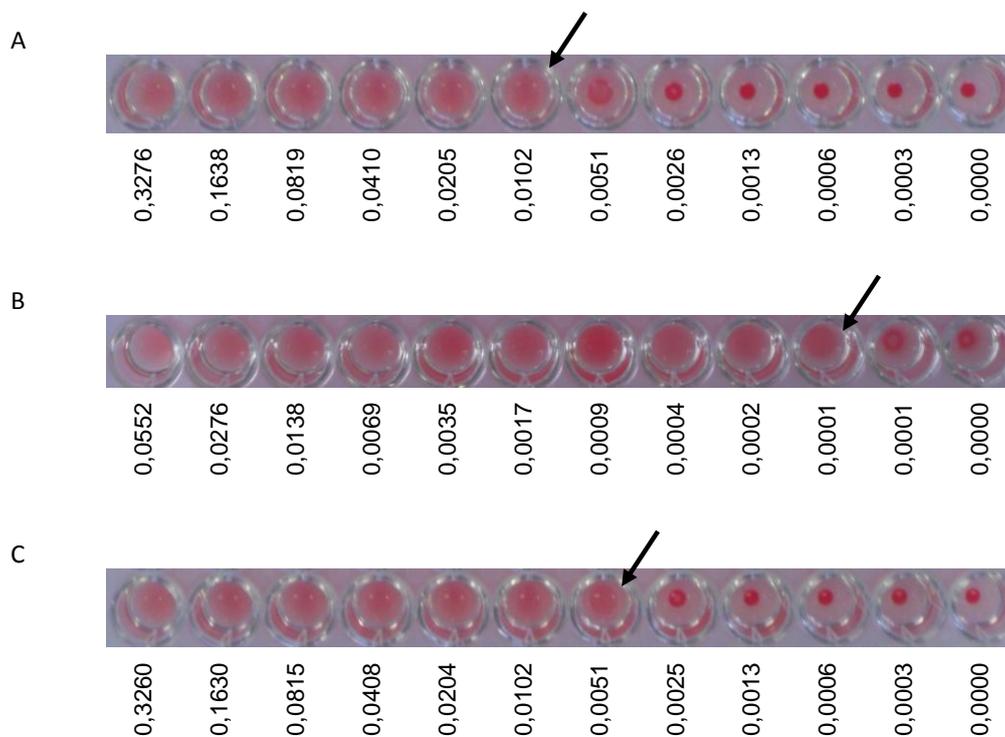
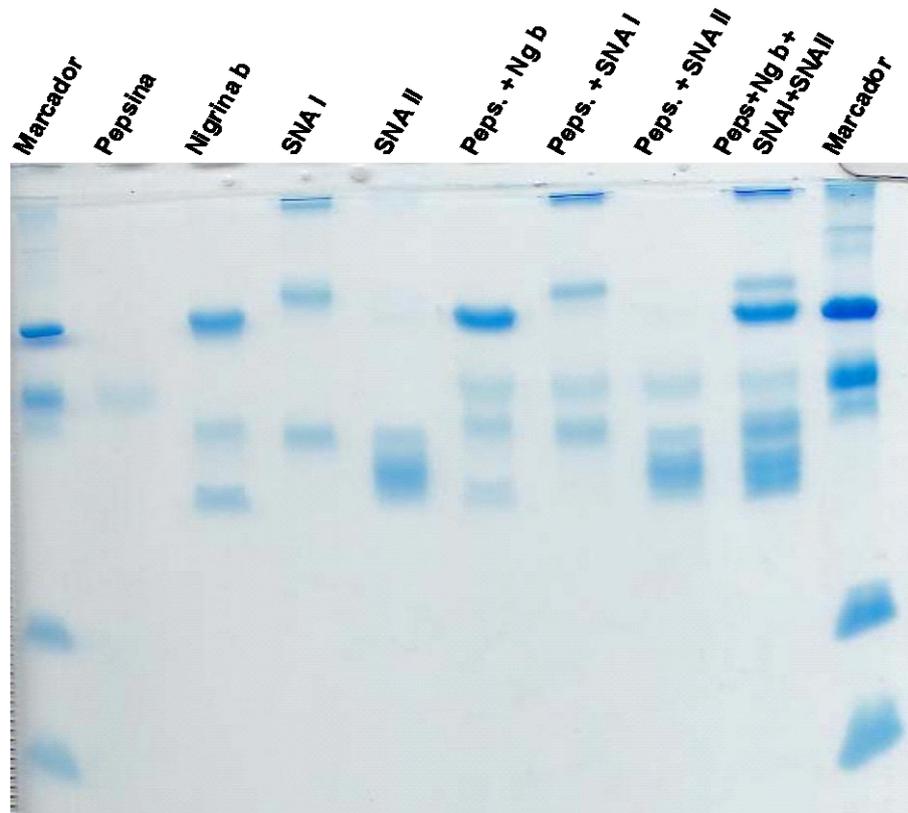


Fig. R8. Detección de la actividad hemoaglutinante en eritrocitos humanos O⁺ a 4 °C. La hemoaglutinación se realizó según se describe en el apartado 3.2.6 de una realizada con corteza de julio. Las cifras indicadas representan la concentración de proteínas en mg/ml. El control sin proteína se indica con 0,000. Las flechas indican hemoaglutinación total. **A:** nigrina b; **B:** SNA I; **C:** SNA II

4.1.3 Sensibilidad de las lectinas de corteza de *S. nigra* a pepsina ácida.

Como se ha indicado en la introducción, el alérgeno Sam n1 comparte secuencias parciales con nigrina b y otras lectinas de *Sambucus nigra* (Förster-Waldl y cols., 2003). Dado que estas proteínas pudieran presentar alergenicidad y por tanto, pudieran ser alérgenos alimentarios presentes en las distintas preparaciones de *Sambucus nigra*, se estudió su estabilidad en un fluido gástrico simulado, constituido por pepsina en medio clorhídrico y cloruro sódico. Como se indica en la figura R9A, las tres lectinas, nigrina b, SNA I y SNA II, son resistentes a la degradación enzimática en tiempo equivalente a la digestión biológica. Algunos procedimientos empleados en las preparaciones de saúco requieren tratamientos térmicos prolongados, a efectos de reducir su actividad tóxica o potencial (Font-Quer, 1988), por ello, procedimos a investigar el efecto del tratamiento térmico de estas lectinas sobre su estabilidad frente a pepsina en medio ácido. Como indica la figura R9B, la ebullición durante 10 minutos de las muestras de las tres lectinas, las convierte completamente en susceptibles a la degradación por pepsina ácida. Estos resultados están de acuerdo con hipótesis formuladas previamente para otras proteínas potencialmente tóxicas presentes en los vegetales utilizados como alimentos (Wu y Sun, 2012).

A



B

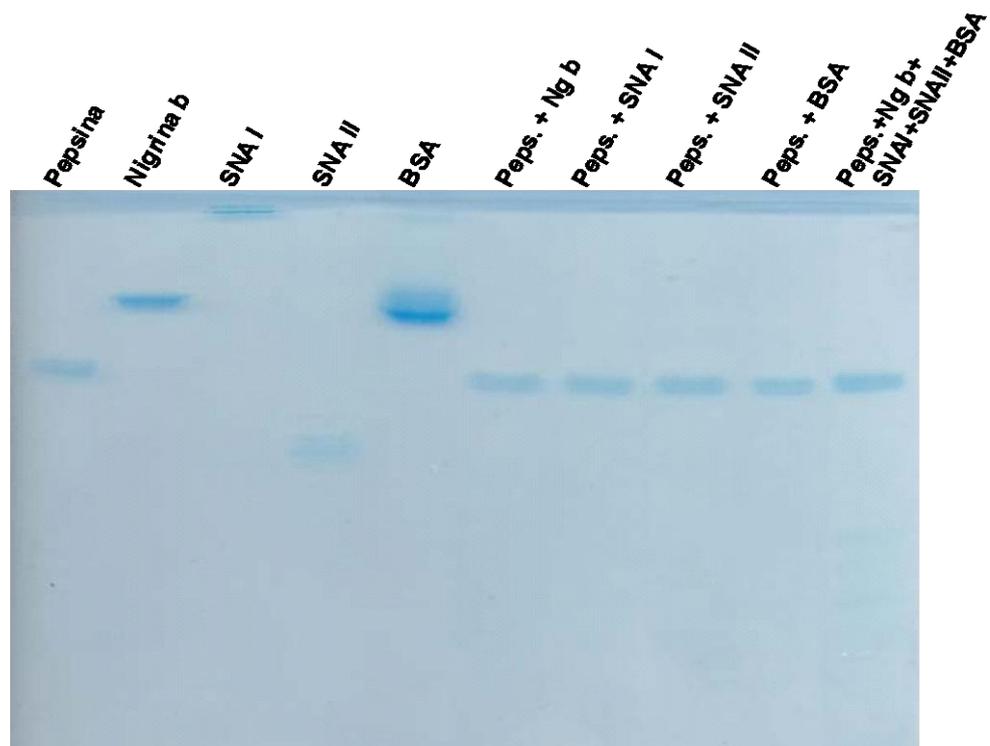


Fig. R9. Sensibilidad de las lectinas de corteza de *S. nigra* a pepsina. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones no reductoras

de las proteínas (nigrina b, SNA I y SNA II, todas a 60 µg por pocillo) sin tratar (panel A) o tratadas previamente con calor (panel B). **A:** Electroforesis de muestras incubadas durante 1 hora a 37 °C con pepsina. En las calles 1 y 10 se encuentran los marcadores moleculares: BSA (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), inhibidor de tripsina (20 KDa) y α-lactoalbúmina (14,2 KDa). Las calles 2-5 corresponden a proteínas no tratadas con pepsina, y las 3 siguientes a las proteínas tratadas con pepsina ácida. En la calle 9 incluimos una mezcla de todas las proteínas; **B:** Electroforesis de muestras desnaturalizadas por tratamiento térmico (10 min en ebullición) y a continuación incubadas durante 1 hora a 37°C con pepsina. Las calles 1-5 corresponden a proteínas no tratadas con pepsina, y las 3 siguientes a las proteínas tratadas con pepsina ácida. Como control positivo de esta digestión tenemos, en la calle 9, BSA y pepsina, y en la calle 10 contamos con una mezcla de todas las proteínas.

4.1.4 Sensibilidad de las lectinas de corteza de *S. nigra* a pancreatina.

Se estudió también la estabilidad de las tres lectinas del *Sambucus nigra* frente a pancreatina. Ésta contiene una mezcla de numerosas enzimas, en las que se incluyen amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasa. La N.F. (National Formulary) y la U.S.P. (United States Pharmacopeia) de los Estados Unidos especifican, únicamente, amilasa, proteasa y lipasa. El preparado simula la acción de las enzimas pancreáticas en el duodeno. Como puede observarse en la figura R10, la pancreatina degrada parcialmente la nigrina b y prácticamente de forma total la SNA II. La degradación con pancreatina es posible que genere fragmentos de proteína que den lugar a precipitados difíciles de resuspender.

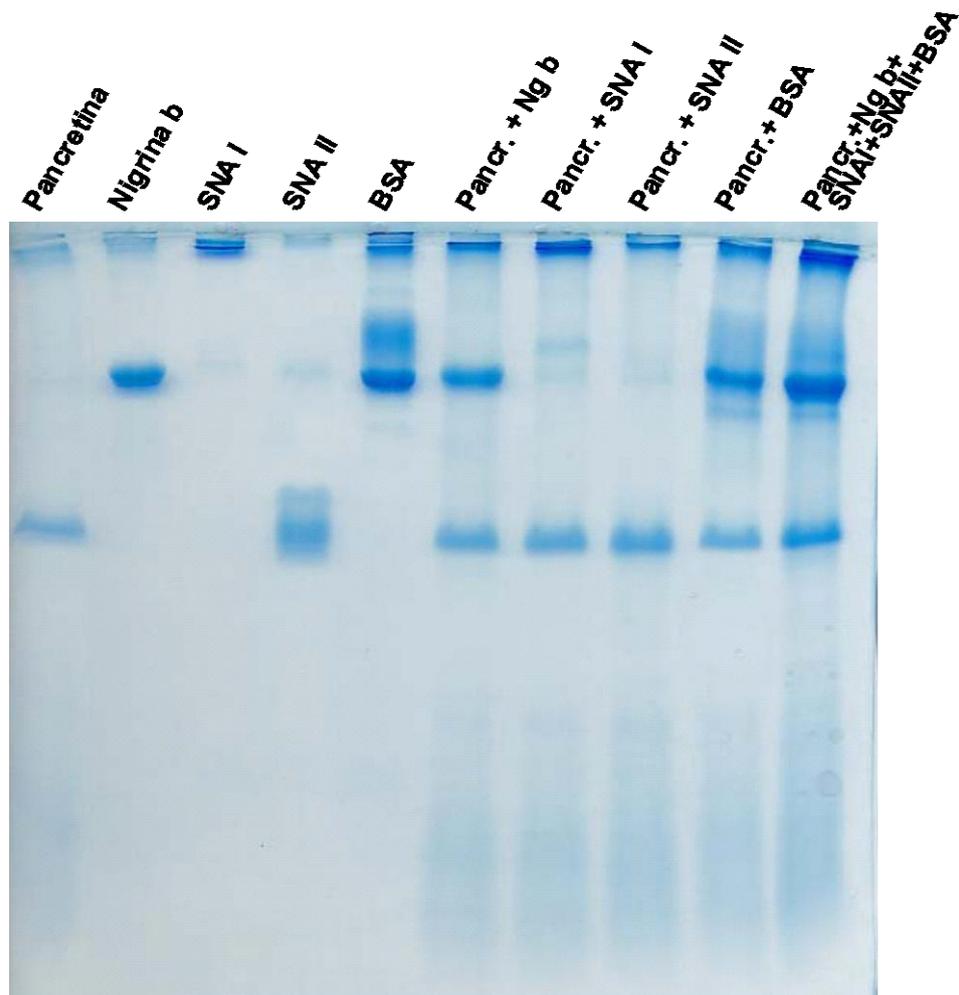


Fig. R10. Sensibilidad de las lectinas de corteza de *Sambucus nigra* a pancreatina.

Análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS en condiciones no reductoras de las proteínas nigrina b, SNA I y SNA II (60 μ g por pocillo) tras su tratamiento con pancreatina. Incubación durante 1 hora con pancreatina. Como marcador positivo de la digestión se incluyen 50 μ g por pocillo BSA.

4.1.5 Extracción de las lectinas de los frutos de *S. nigra*.

Se utilizaron frutos verdes con la finalidad de poder obtener también nigrina f junto con la lectina SNA IV. La mayor parte de lectina obtenida por el proceso de cromatografía de afinidad corresponde a SNA IV (figura R11A). Como el objetivo era estudiar la sensibilidad de estas lectinas a la pepsina se obtuvo sólo la fracción proteica retenida por afinidad, que se sometió a electroforesis de gel de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones reductoras y no reductoras, cuyo resultado se indica en la figura R11B. Dada la gran concentración de proteína que se manejó, apareció un precipitado cuyo análisis reveló la presencia de nigrina f y SNA IV. La proteína no precipitada, en cambio, no poseía nigrina f. Este material precipitado se utilizó para estudiar la sensibilidad de ambas lectinas a pepsina ácida.

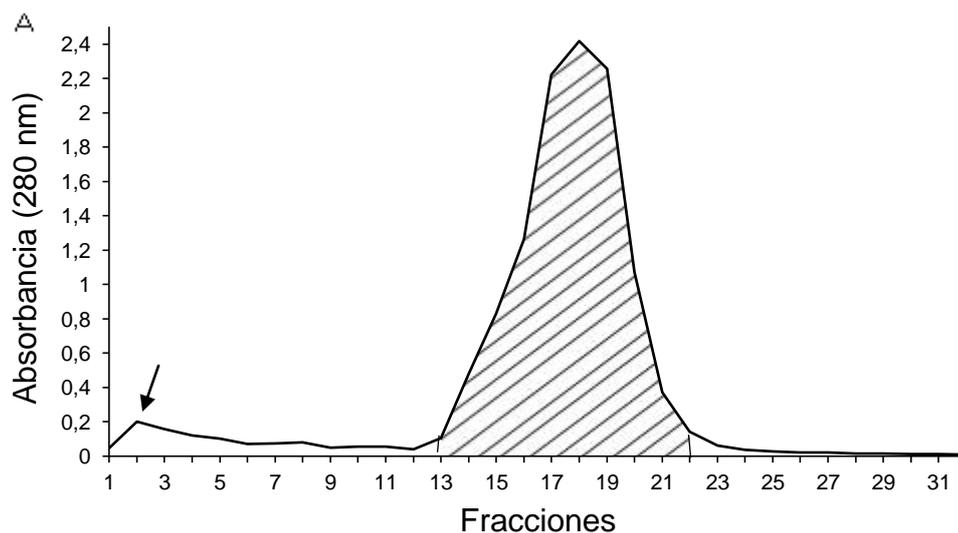


Fig. R11. Aislamiento de nigrina f de frutos verdes de *Sambucus nigra* L. A: Cromatografía de afinidad en AT-Sepharose 6B. El extracto proteico de frutos (recogidos a mediados de agosto) se eluyó con lactosa 0,2 M según se indica en el apartado 3.2.3.5. Se recogió la fracción proteica correspondiente al área rallada que va desde la fracción 13 hasta la 22. Se obtuvieron 37,92 mg de proteína total, con una concentración de 4,01 mg/ml. La flecha indica la adición de lactosa.

B

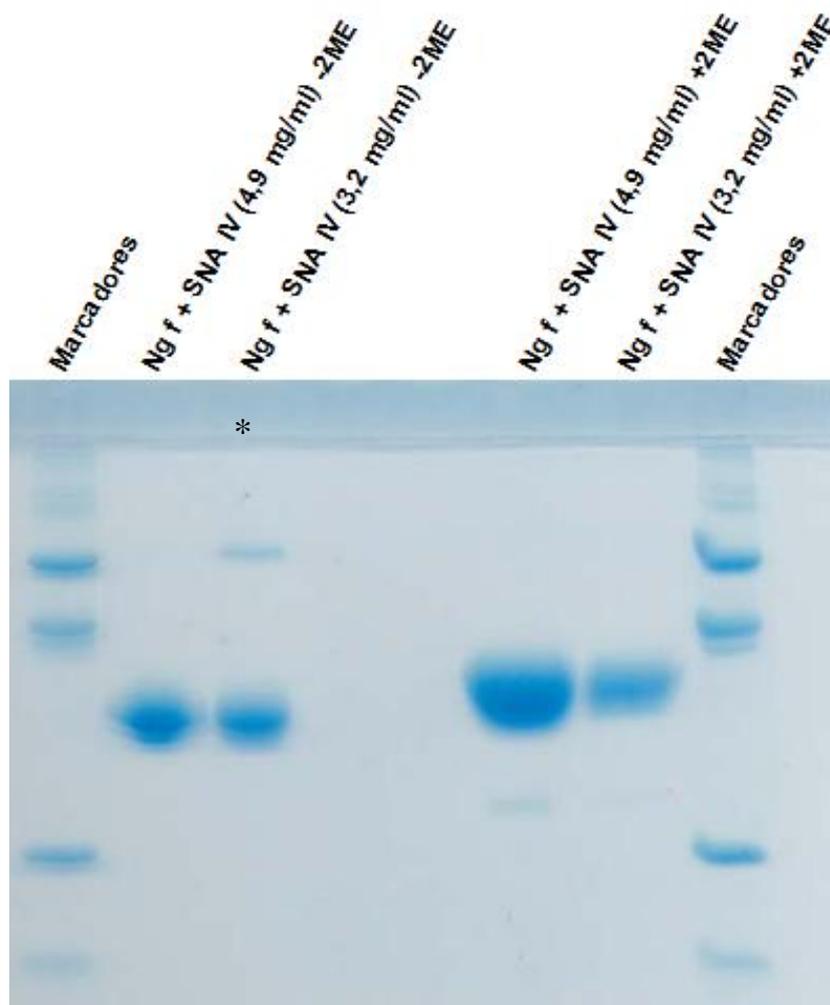


Fig. R11. Aislamiento de nigrina f de frutos verdes de *Sambucus nigra* L. B: Análisis electroforético de las fracciones anteriores (nigrina f y SNAIV) en gel de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS en condiciones tanto no reductoras (calles 2 y 3) como reductoras (calles 5 y 6). En las calles 1 y 6 se utilizó un marcador molecular con BSA (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), inhibidor de tripsina (20 KDa) y α -lactoalbúmina (14,2 KDa). La calle marcada con * corresponde a una muestra precipitada del extracto proteico.

4.1.6 Sensibilidad de las lectinas de frutos de *S. nigra* a pepsina ácida.

Se estudió también la sensibilidad de las lectinas de frutos de *Sambucus nigra* a la pepsina en medio ácido, y como se observa en la figura R12A, ambas proteínas son resistentes a la pepsina. Como muestra la figura R12B, la ebullición de estas lectinas las convierte completamente susceptibles a la pepsina, al igual que ocurre con las proteínas de corteza.

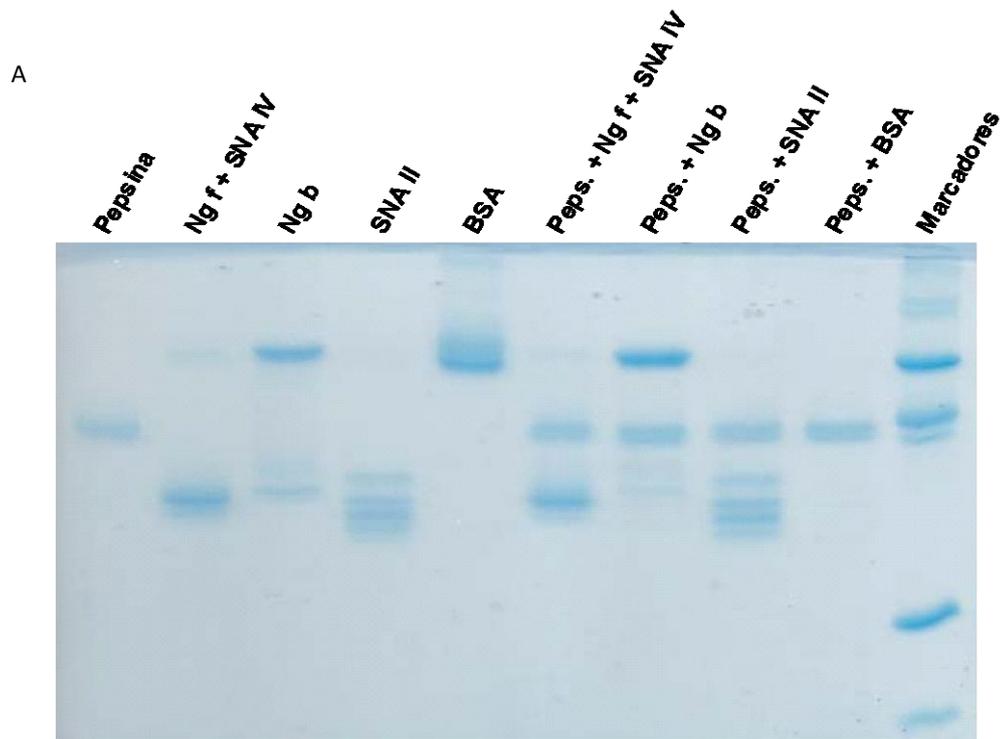


Fig. R12. Análisis de la sensibilidad de las lectinas de frutos de *Sambucus nigra* a pepsina ácida. Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones no reductoras de las proteínas (nigrina f y SNA IV, nigrina b y SNA II, a 60 μ g por pocillo) previamente tratadas. Las primeras 5 calles corresponden a proteínas utilizadas como control negativo del tratamiento y las 3 siguientes a las proteínas del estudio tratadas con pepsina ácida. Como control positivo de esta digestión tenemos, en la calle 9, BSA y pepsina, y en la calle 10 contamos con un control de peso molecular: BSA (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), inhibidor de tripsina (20 KDa) y α -lactoalbúmina (14,2 KDa). **A:** electroforesis de muestras incubadas durante 1 hora a 37 °C.

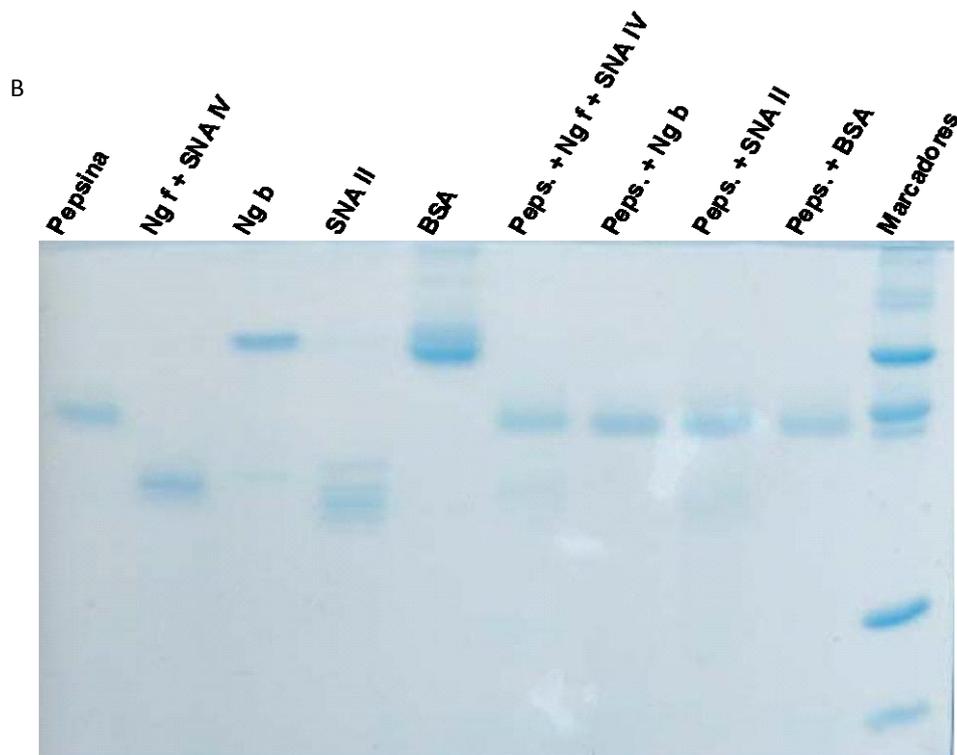


Fig. R12. Análisis de la sensibilidad de las lectinas de frutos de *Sambucus nigra* a pepsina ácida. Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones no reductoras de las proteínas (nigrina f y SNA IV, nigrina b y SNA II, a 60 μ g por pocillo) previamente tratadas. Las primeras 5 calles corresponden a proteínas utilizadas como control negativo del tratamiento y las 3 siguientes a las proteínas del estudio tratadas con pepsina ácida. Como control positivo de esta digestión tenemos, en la calle 9, BSA y pepsina, y en la calle 10 contamos con un control de peso molecular: BSA (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), inhibidor de tripsina (20 KDa) y α -lactoalbúmina (14,2 KDa). **B:** electroforesis de muestras desnaturalizadas (10 min en ebullición) y a continuación incubadas durante 1 hora a 37°C.

4.1.7 Sensibilidad de las lectinas de jarabe de saúco a pepsina ácida.

Existen en el mercado distintas preparaciones de saúco, en forma de jarabes, comprimidos y en material para infusiones. En la mayoría de los casos se desconoce el procedimiento de preparación y la manipulación a las que han estado sometidas. Se estudió la presencia de proteínas de saúco en un jarabe comercial para determinar la posible presencia de lectinas y el posible tratamiento térmico al que pudiera haber estado sometido. Para ello, el jarabe se sometió a precipitado con ácido tricloroacético al 5 % en ebullición, con la finalidad de concentrar y precipitar las proteínas. Como se indica en la figura R13, el material precipitado a partir del jarabe se quedó en el pocillo del gel. El tratamiento con pepsina en las condiciones en las que se degrada el BSA no afectó sensiblemente a dicho material. Los resultados obtenidos indican claramente que dado que el jarabe posee dextrinas como excipiente, el tratamiento al que haya estado sometido muy probablemente provoca una reacción de polimerización, que rinde especies de alto peso molecular que además son resistentes a la acción de la pepsina, indicando que probablemente no tiene proteína y la tinción del gel se debe a tinción de las dextrinas. Queda por ver si este material puede presentar propiedades alergénicas similares a las presentadas por el alérgeno Sam n1 presente en *Sambucus nigra*.

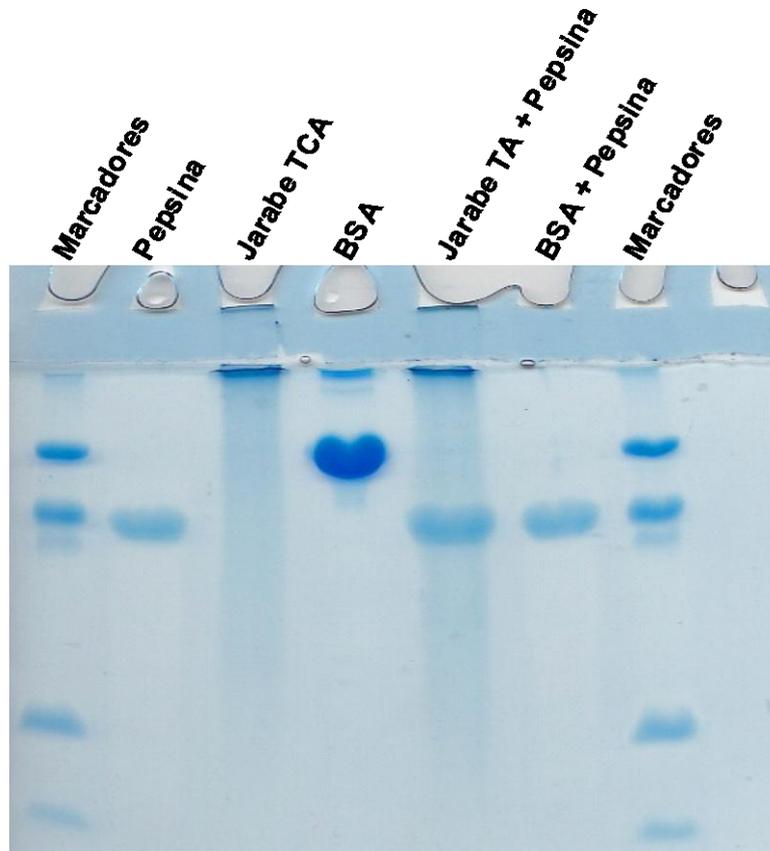


Fig. R13. Análisis de la sensibilidad de las lectinas de jarabe de saúco a pepsina ácida. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y en condiciones reductoras del jarabe de saúco previamente precipitado con TCA 5 % en caliente, incubado durante 1 hora a 37 °C. Las calles 2-4 corresponden a proteínas utilizadas como control negativo de la digestión y la 5 al jarabe tratado con pepsina ácida. Como control positivo de esta digestión tenemos, en la calle 6, BSA y pepsina. En las calles 1 y 7 contamos con controles de peso molecular: BSA (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), inhibidor de tripsina (20 KDa) y α -lactoalbúmina (14,2 KDa).

4.1.8 Farmacocinética de nigrina b en sangre de ratones.

Los experimentos con nigrina b realizados en este trabajo se han basado en la administración intraperitoneal de la lectina. Para que ésta tenga efecto debe difundirse, atravesar tejidos y alcanzar órganos o modificar procesos vitales. Se estudió la presencia de nigrina b en plasma después de 1, 3 y 7 horas de la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal, utilizando para ello el procedimiento de Western-blot e inmunodetección con anticuerpos policlonales de conejo antinigrina b. Los resultados, que no se incluyen en el presente trabajo, indican que a la concentración de nigrina b administrada por vía intraperitoneal la lectina es indetectable en plasma. No obstante, la nigrina b ejerce efectos específicos sobre el tubo digestivo como se verá más adelante, que a pesar de no ser letales, son importantes y conllevan una fuerte reducción del peso corporal, lo cual implica que de hecho la nigrina b por vía intraperitoneal alcanza las células del intestino.

4.2 Estudios del modelo de nigrina b.

4.2.1 Efectos de la nigrina b sobre la longitud de los intestinos.

Los efectos subletales de la nigrina b son apreciables claramente en los intestinos, en particular en el intestino delgado. Como se indica en la figura R14A, 24 horas después de la administración de nigrina b hay una reducción en la longitud del intestino delgado del 25 % que se mantiene hasta las 72 horas y se recupera lentamente e incluso aumenta su longitud a

los 22 días. Una reducción ligeramente menor se observó también en el intestino grueso, con una recuperación similar (figura R14B).

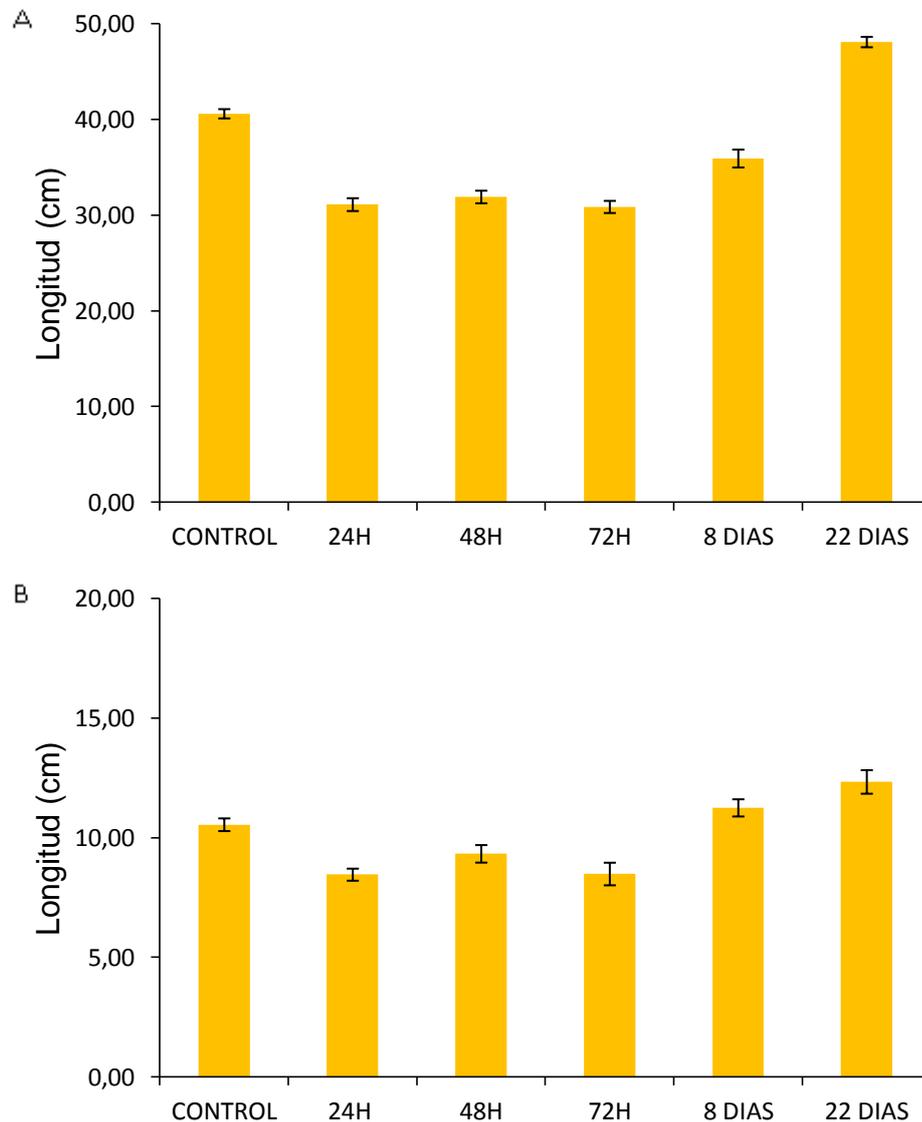


Fig. R14. Efectos de la nigrina b sobre la longitud de los intestinos a diferentes tiempos. Representación de la longitud del intestino de los diferentes grupos de ratones sacrificados a las 24, 48 y 72 horas, 8 y 22 días tras la inyección de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal. La población de cada grupo a estudiar fue de 7 ratones, salvo en el caso de los controles que fueron 11 y en el de 22 días que fueron 6 ratones. **A:** Intestino delgado (desde el píloro hasta la válvula ileocecal); **B:** Intestino grueso (desde la válvula ileocecal hasta el ano)

4.2.2 Efecto de la nigrina b sobre la actividad mieloperoxidasa en ratones.

El incremento de la actividad mieloperoxidasa se asocia con la infiltración de neutrófilos y los procesos inflamatorios (Gonzalez-Rey y cols., 2006). Por ello, dado los efectos de nigrina b en el tubo digestivo, estudiamos dicha actividad enzimática tanto en intestino delgado como en el grueso. El intestino delgado se dividió en tres segmentos aproximadamente iguales y se estudió la actividad a los mismos periodos de tiempo que en el apartado anterior. Como se observa en la figura R15, se produce un notable aumento de la actividad enzimática a las 24 horas en los tres segmentos. A las 48 horas se produce mayor incremento en los segmentos 2 y 3, y a partir de entonces se produce una disminución general de la actividad sin llegar a alcanzarse el valor del control. Los efectos de nigrina b sobre el intestino grueso son también notables, pero en contraste, se produce una variación no constante, esto es, una disminución a las 24 horas y a los 8 días y la recuperación a los 22 días.

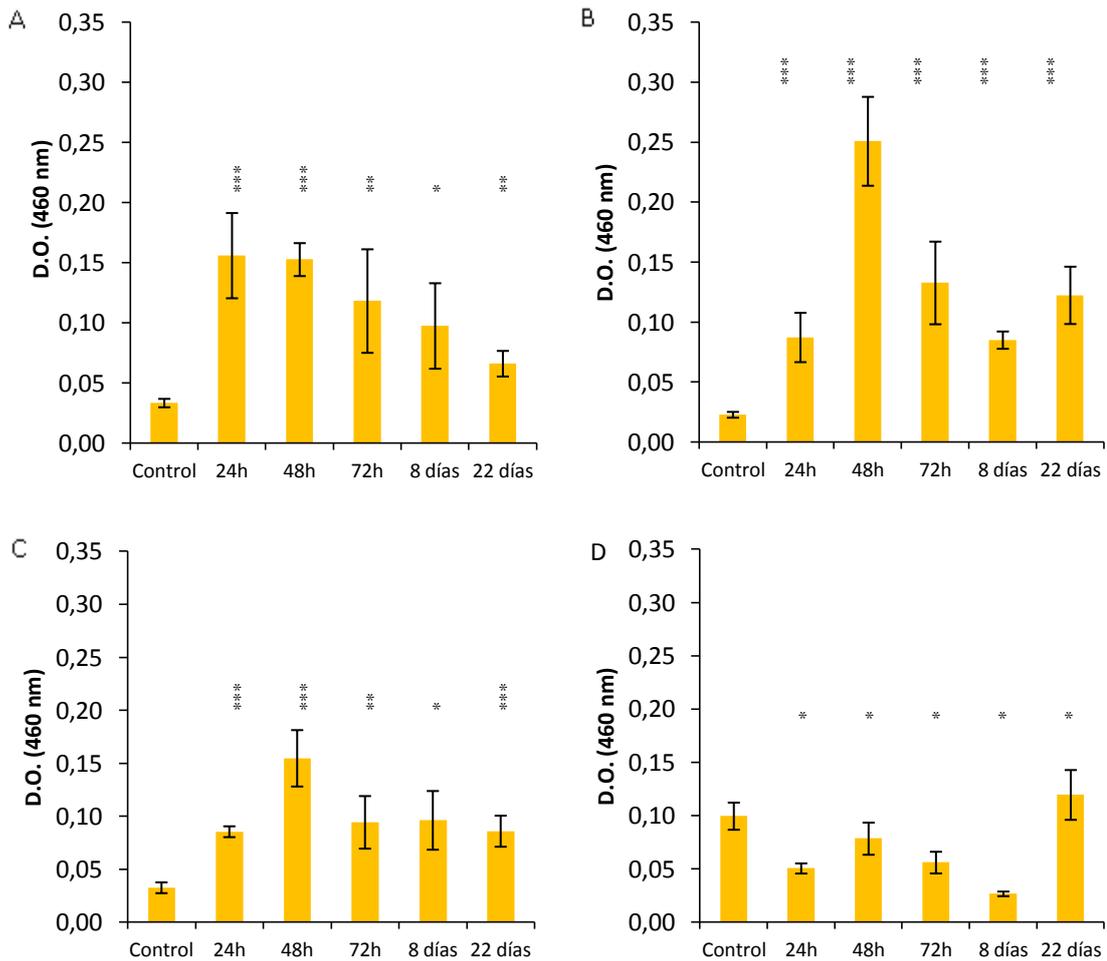


Fig. R15. Efecto de la nigrina b sobre la actividad mieloperoxidasa en ratones. Representación de la actividad mieloperoxidasa, determinada por la absorbancia a 460 nm, frente a cada grupo de ratones que fueron sacrificados a las 24, 48 y 72 horas, 8 y 22 días tras la inyección de nigrina b 10 mg/kg. Para su estudio, el intestino delgado, se dividió en tres partes de tamaño similar **A:** Primer tramo del intestino delgado; **B:** Segundo tramo del intestino delgado; **C:** Tercer tramo del intestino delgado; **D:** Intestino grueso.

Valores-p según estudio de la t-student: control vs. muestra.

*** < 0,01; ** > 0,05; * 0,05 < 0,1.

4.3 Estudio de toxicidad.

4.3.1 Toxicidad de nigrina b en ratones.

Estudios anteriores indicaron que la administración intravenosa de 5 mg/kg de nigrina b no mata a ningún ratón (Gayoso y cols., 2005). En este trabajo hemos encontrado que la dosis intraperitoneal equivalente es de 10 mg/kg y, como se indica en la figura R16, ni provoca mortalidad ni variación significativa de peso a los 22 días de estudio. En contraste, y como muestra la figura R17, la administración por vía intraperitoneal de 16 mg/kg mata todos los ratones entre los 4 y 10 días, con una reducción muy significativa y continua del peso corporal hasta su muerte, llegándose a alcanzar reducciones de peso de entre el 25 y 40 %.

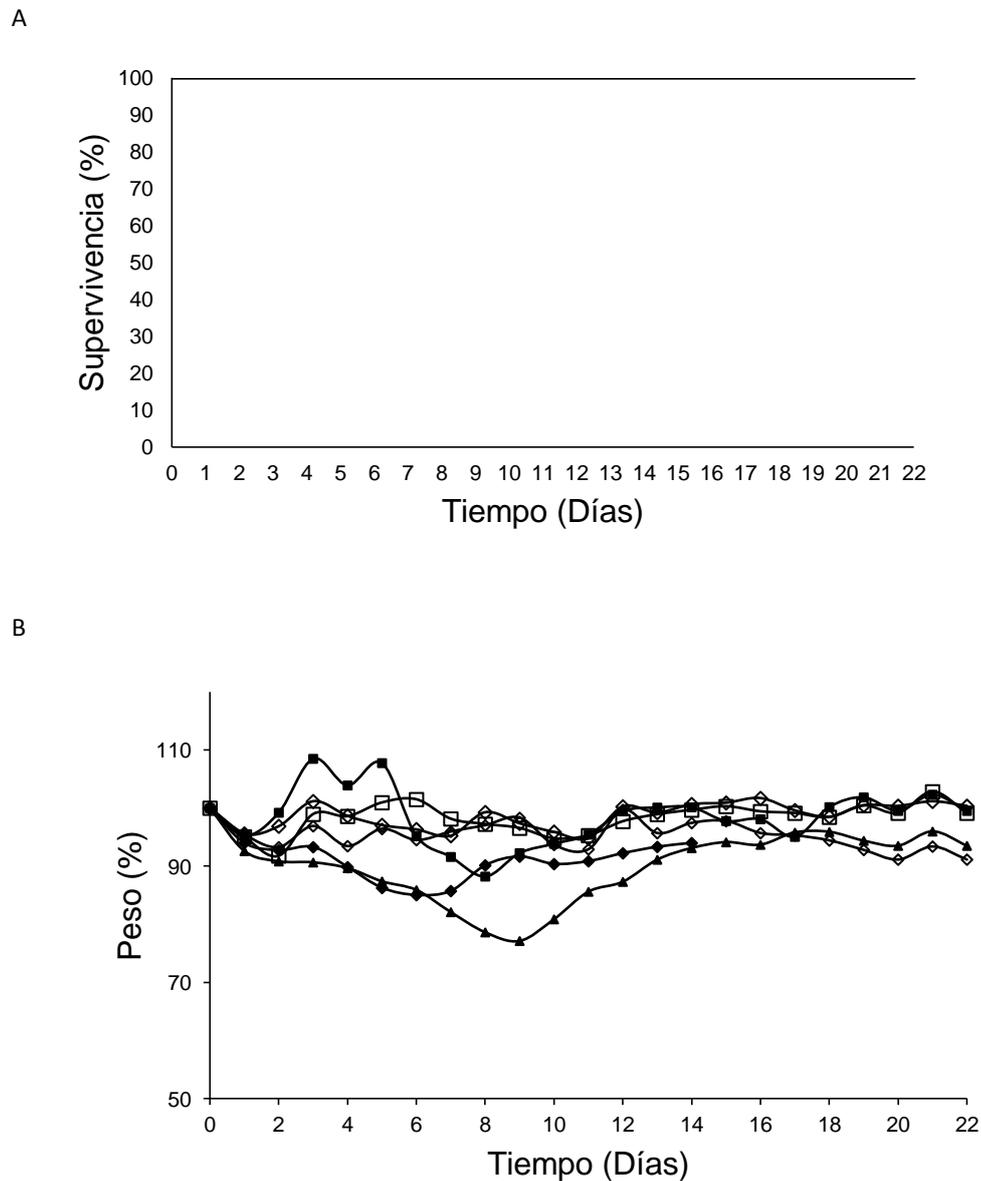
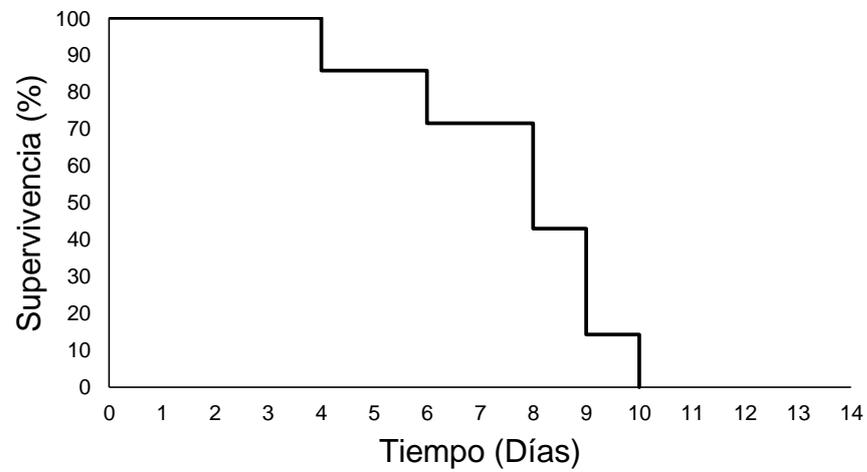


Fig. R16. Estudio del efecto de 10 mg/kg IP de nigrina b en ratones (n = 6). A: Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

A



B

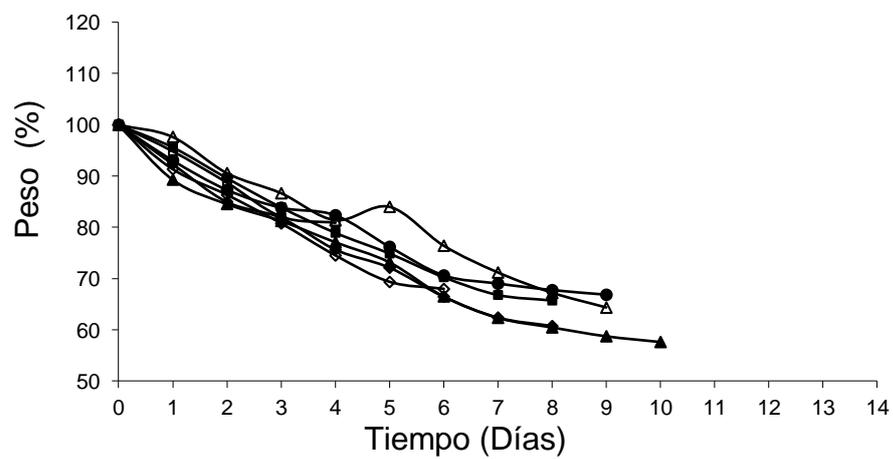


Fig. R17. Estudio del efecto de 16 mg/kg IP de nigrina b en ratones (n = 7). A: Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

4.3.2 Toxicidad de Polyphenon E en ratones.

Como ya hemos descrito en la introducción, el Polyphenon E es un concentrado de catequinas del té verde, que se utiliza en la terapia coadyuvante anticancerosa (Shimizu y cols., 2011) y como complemento antioxidante y antirradicalario (Hou y cols., 2005). Se ha demostrado que la administración oral de grandes cantidades de Polyphenon E tiene propiedades beneficiosas, no obstante, se han dado algunos casos de toxicidad fundamentalmente hepática, sobre todo a altas concentraciones (Schöntal, 2011). Dado el efecto proapoptótico de las catequinas del té verde, se consideró la posibilidad de que pudiese interactuar con la nigrina b en sus efectos de apoptosis intestinal (Gayoso y cols., 2005), para ello se procedió a determinar el efecto de la administración de Polyphenon E en ratones tratados y no tratados con nigrina b.

Como se observa en la figura R18, la administración oral de 30 mg/kg de Polyphenon E no tuvo efecto sobre la supervivencia ni sobre el peso de los animales, al menos hasta los 14 días del estudio.

Como muestra la figura R19, tampoco 120 mg/kg de Polyphenon E vía oral tuvieron efecto sobre la mortalidad y la variación de peso. En contraste, como se observa en la figura R20, la administración intraperitoneal de la misma cantidad de Polyphenon E produjo la muerte de aproximadamente el 50 % de los animales en 5 días, de los 14 de estudio.

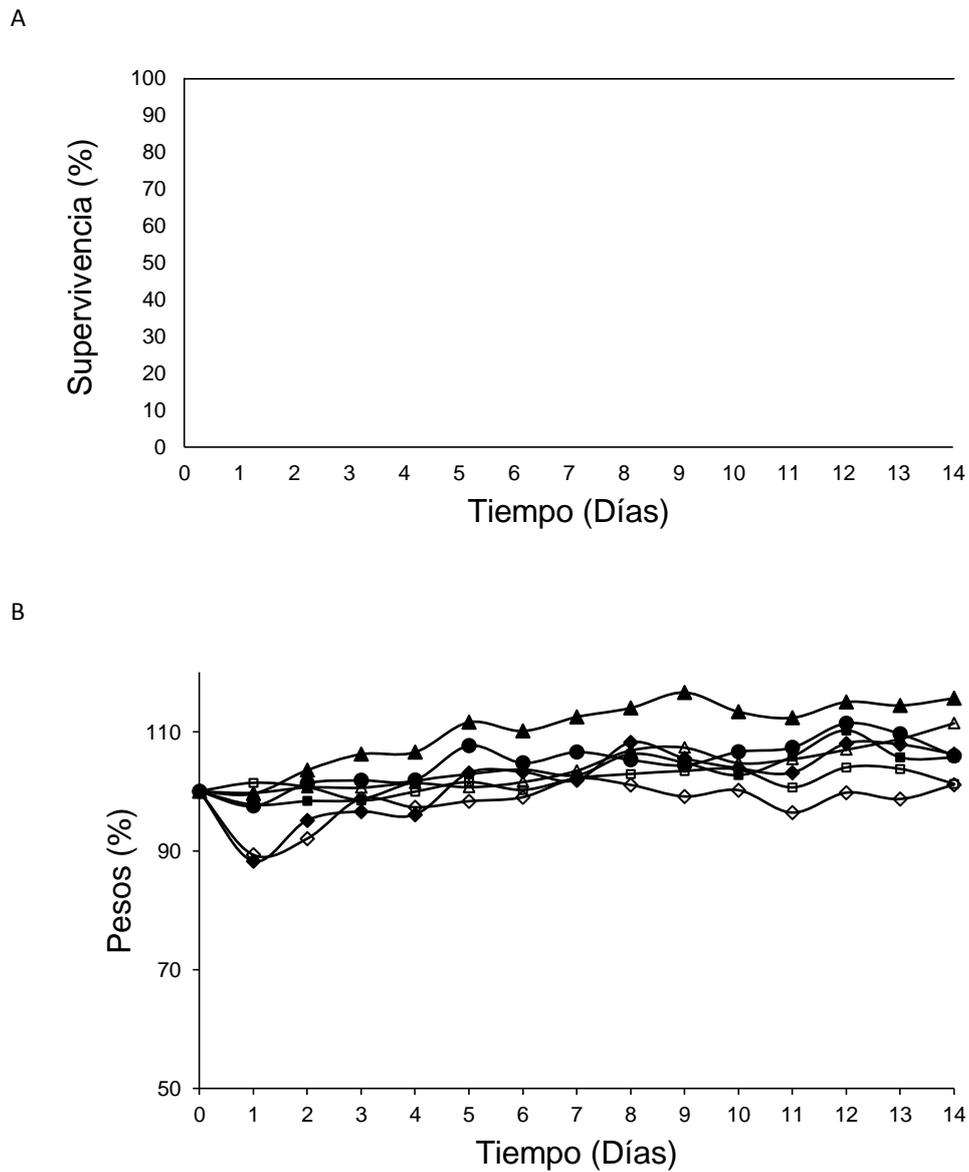


Fig. R18. Estudio del efecto de 30 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 7). A: Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

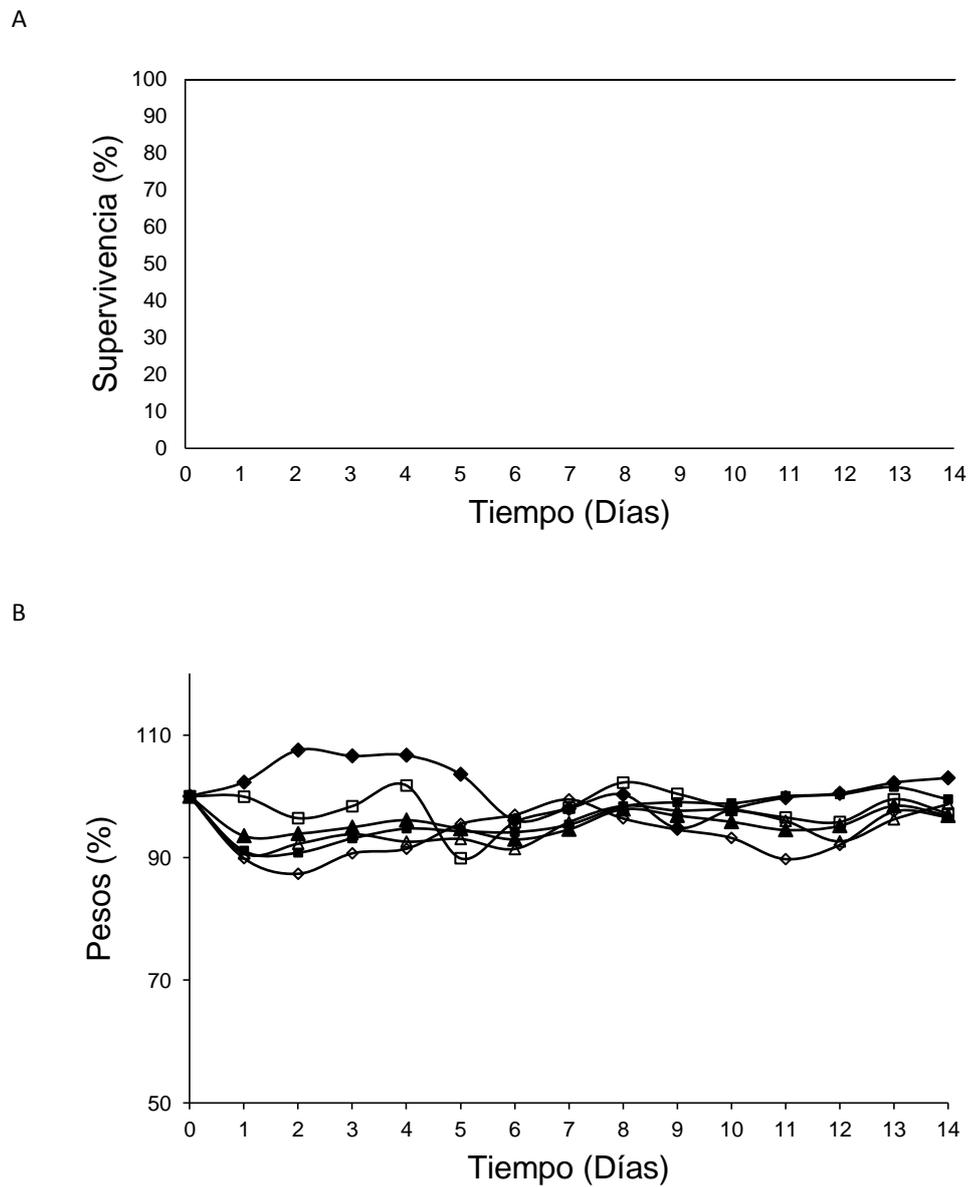


Fig. R19. Estudio del efecto de 120 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 6). **A:** Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

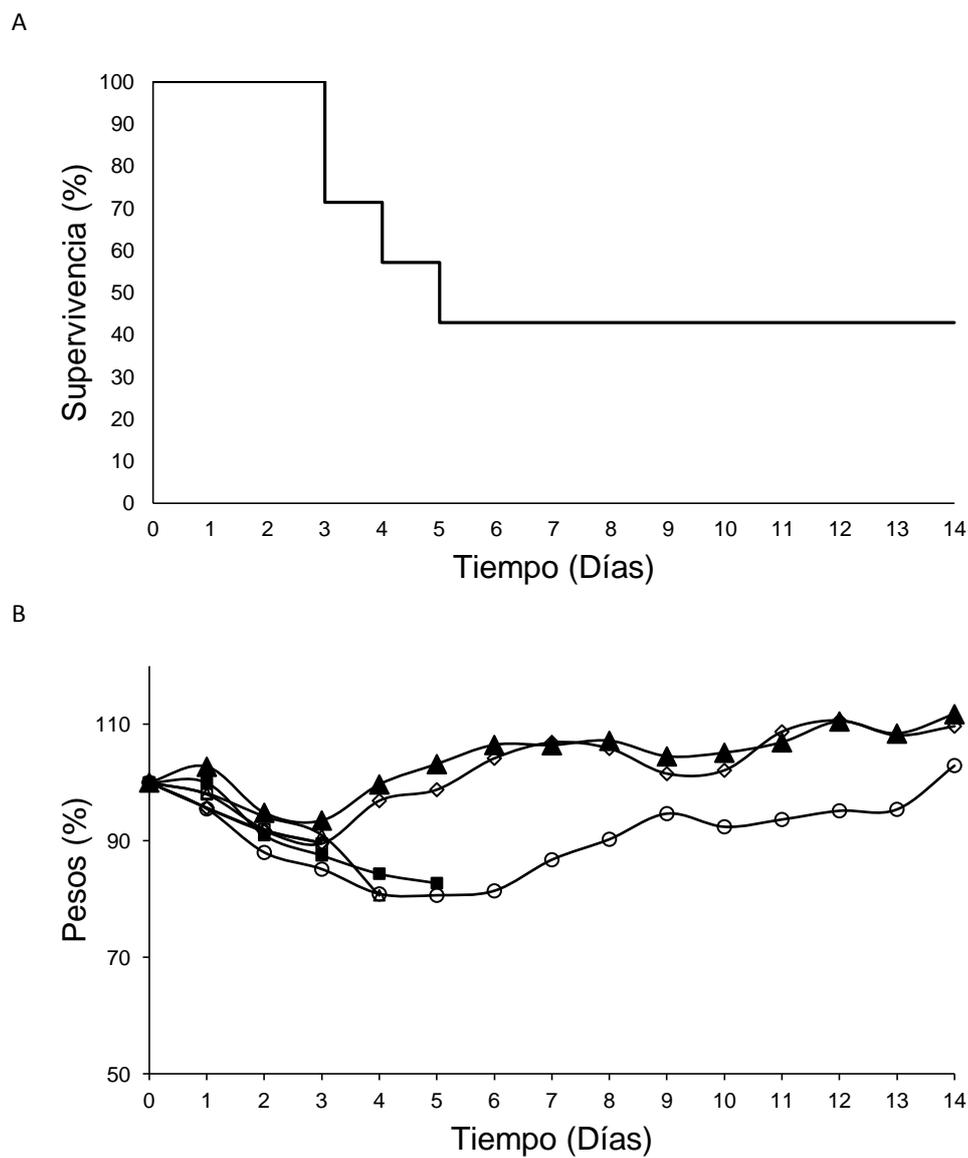


Fig. R20. Estudio del efecto de 120 mg/kg IP de Polyphenon E (n = 7). A: Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

La administración oral de Polyphenon E 120 mg/kg y de nigrina b 16 mg/kg tampoco afectó a la mortalidad ni al peso con excepción de dos ratones cuya reducción tendió a normalizarse con el tiempo, como se indica en la Figura R21.

La situación cambia radicalmente cuando se estudia el efecto del Polyphenon E en animales a los que se administró nigrina b 16 mg/kg intraperitoneal. Como puede observarse en la figura R22, el Polyphenon E aumenta dramáticamente la toxicidad de la nigrina b provocando la muerte de todos los animales entre 2 y 3 días, y una reducción de peso de hasta el 25 % en tres días.

Cuando el Polyphenon E se administró por vía oral, presentó también un fuerte efecto tóxico como se observa en la figura R23, en cuyo caso solamente sobrevivió un ratón, probablemente por deficiencia en la administración de nigrina b.

Como se indica en la figura R24, la administración conjunta de Polyphenon E 30 mg/kg por vía oral y 16 mg/kg por vía intraperitoneal provoca también un efecto fuertemente tóxico que mata los ratones entre 3 y 4 días, y produce reducciones de peso superiores al 40 %.

Incluso la administración de 16 mg/kg de Polyphenon E por vía oral a ratones tratados con 16 mg/kg de nigrina b intraperitoneal (figura R25) mató a todos los animales entre 3 y 7 días con una reducción del peso cercana al 30 %.

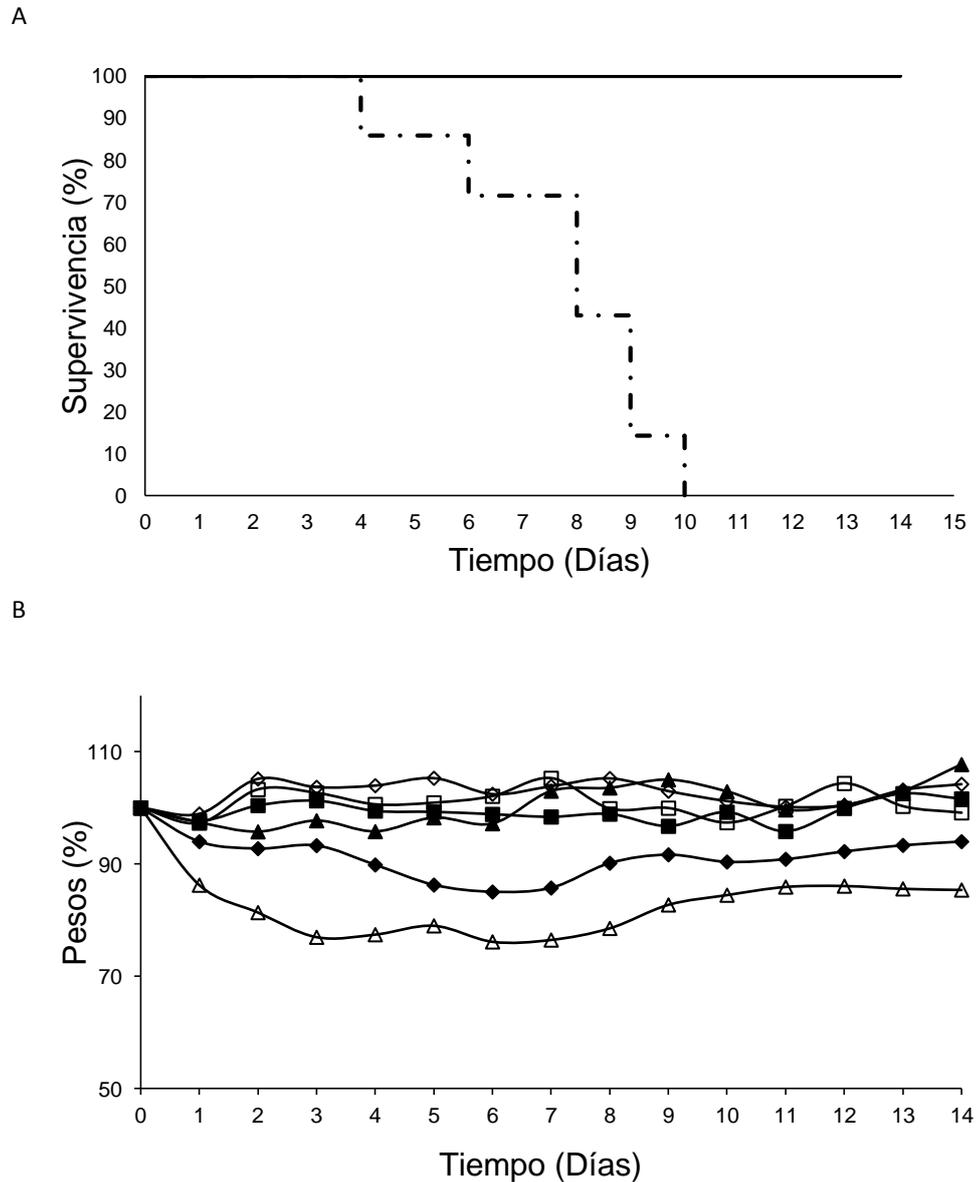


Fig. R21. Estudio del efecto de 16 mg/kg O. de nigrina b más 120 mg/kg O. de Polyphenon E (n = 6). **A:** Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

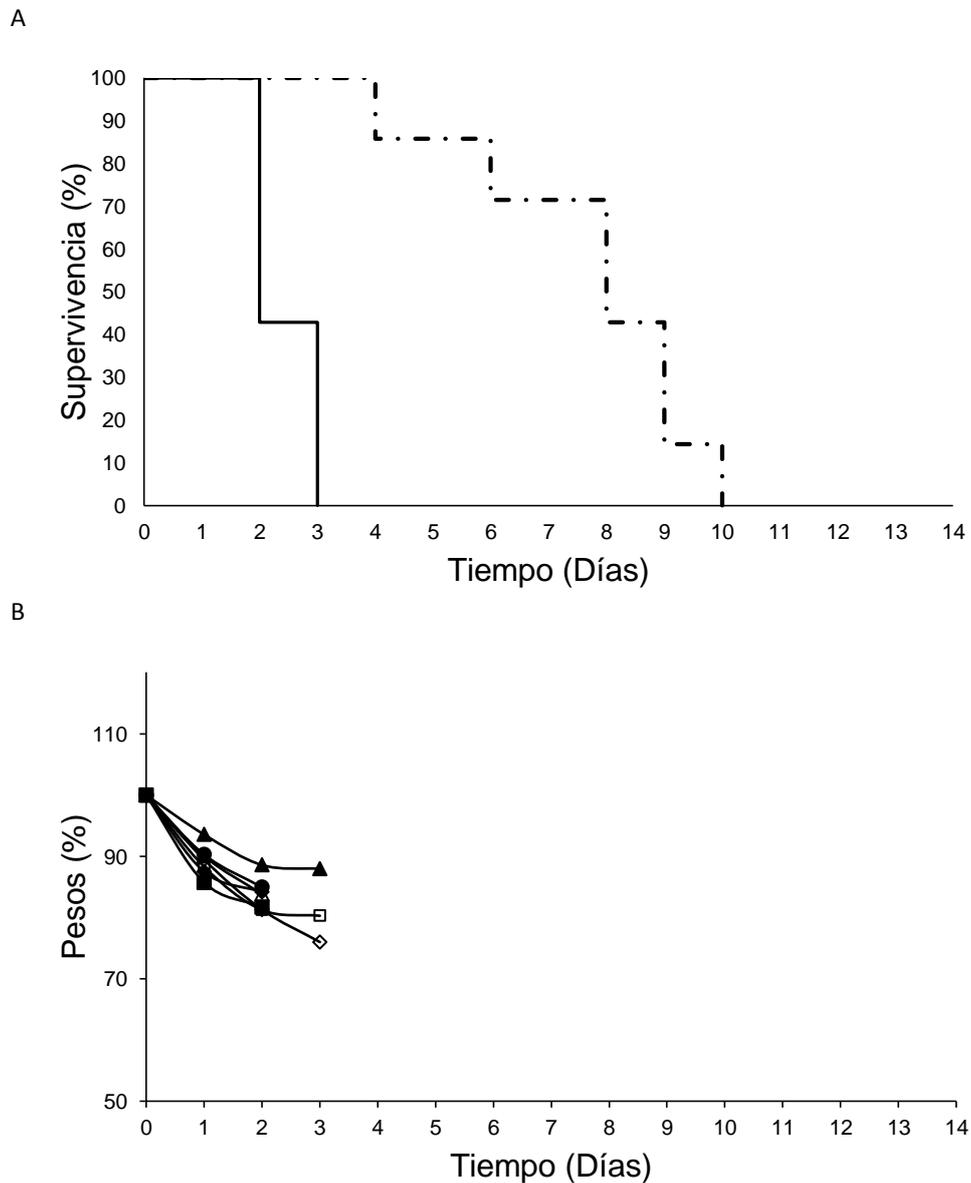


Fig. R22. Estudio del efecto de 16 mg/kg IP de nigrina b más 120 mg/kg IP de Polyphenon E en ratones (n = 7). A: Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

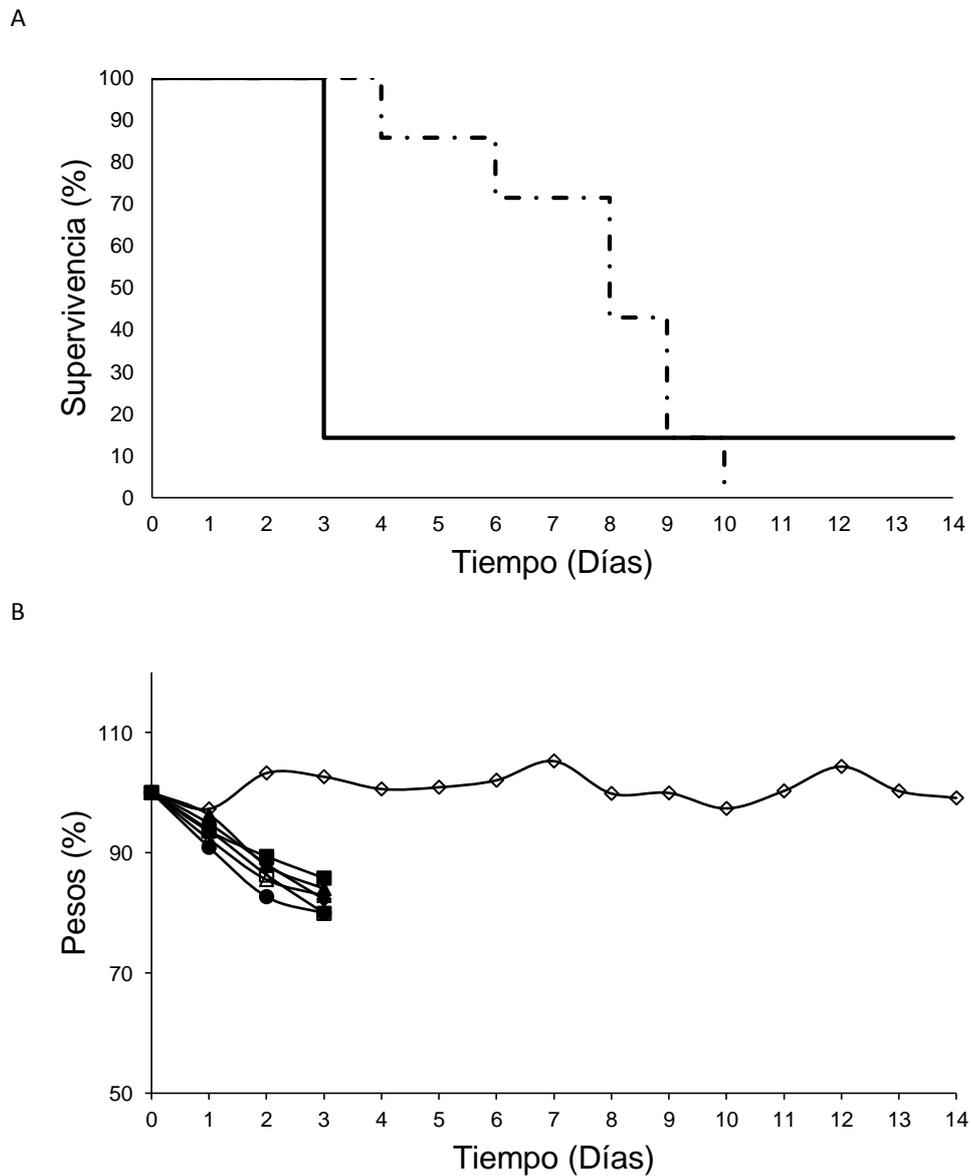


Fig. R23. Estudio del efecto de 16 mg/kg IP de nigrina b más 120 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 7). A: Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

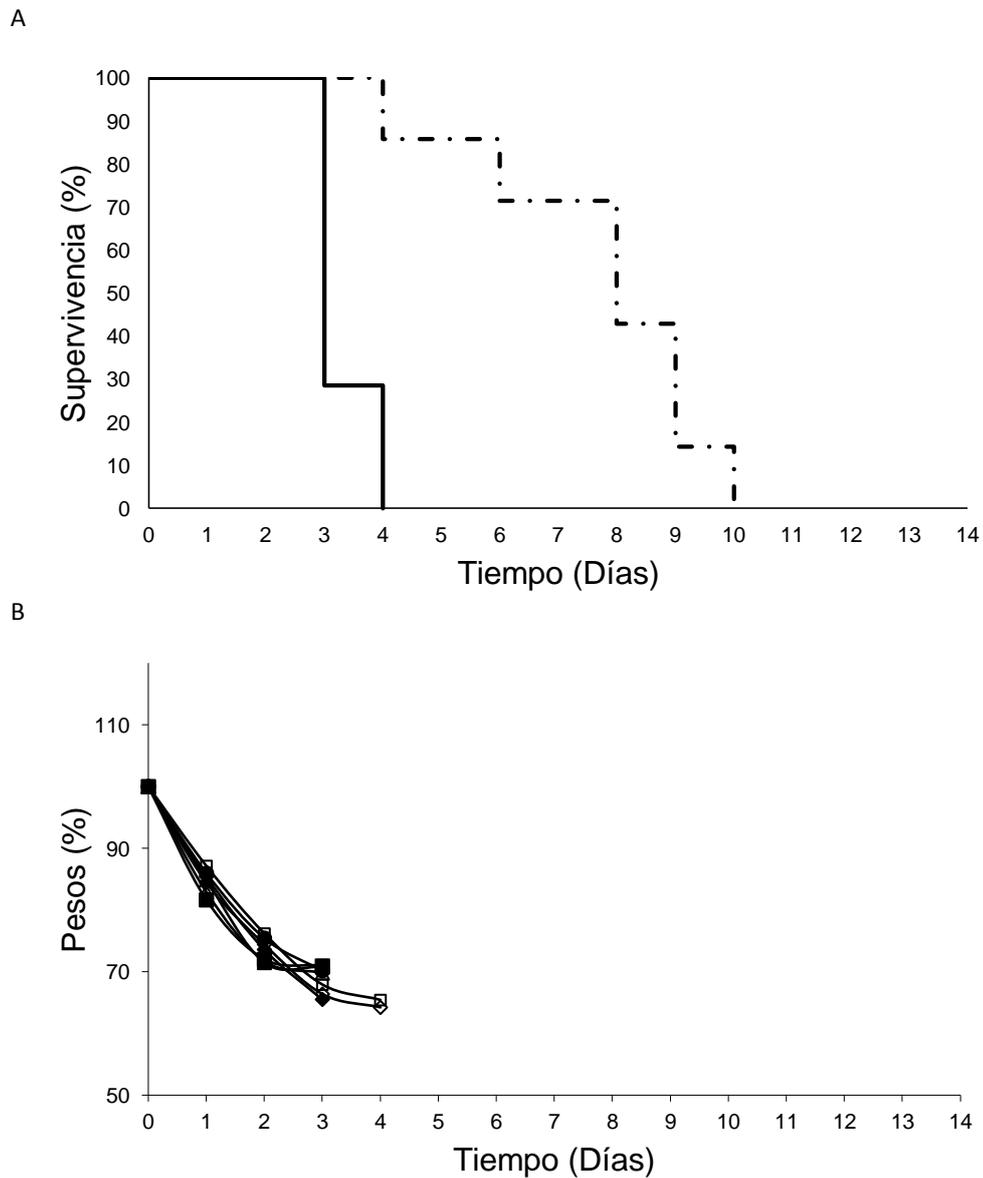


Fig. R24. Estudio del efecto de 16 mg/kg IP de nigrina b más 30 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 7). **A:** Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

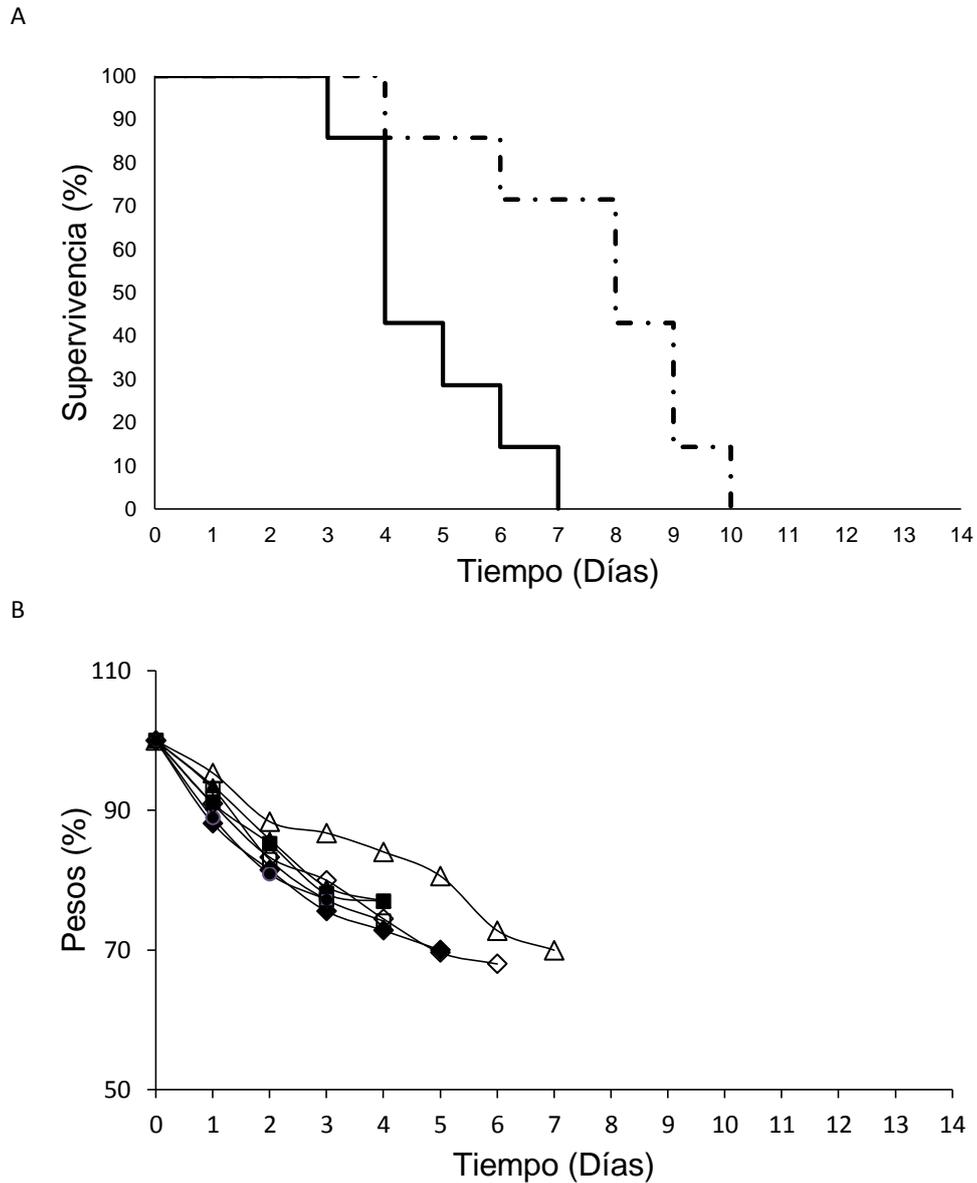


Fig. R25. Estudio del efecto de 16 mg/kg IP de nigrina b más 16 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 7). **A:** Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

Se estudió también el efecto de concentraciones subletales de nigrina b por vía intraperitoneal y el efecto de Polyphenon E por vía oral, como se indica en la figura R26. Incluso con nigrina b a 10 mg/kg, el Polyphenon E afecta profundamente a los animales, provocando la muerte del 60 % entre los 3 y 19 días, con reducción significativa de peso en los animales que mueren e inferior al 10 % en los animales que sobreviven.

Estos efectos se observaron también a una menor concentración de Polyphenon E, muriendo el 60 % de los animales en 4 días con una fuerte reducción del peso, excepto en los que sobrevivieron cuya tendencia fue la de recuperación del peso (figura R27).

Según se muestra en la figura R28 a 16 mg/ml de Polyphenon E y 10 mg/kg de nigrina b provocan una fuerte toxicidad que mata a los ratones entre 8 y 17 días, acompañada también de una fuerte reducción del peso.

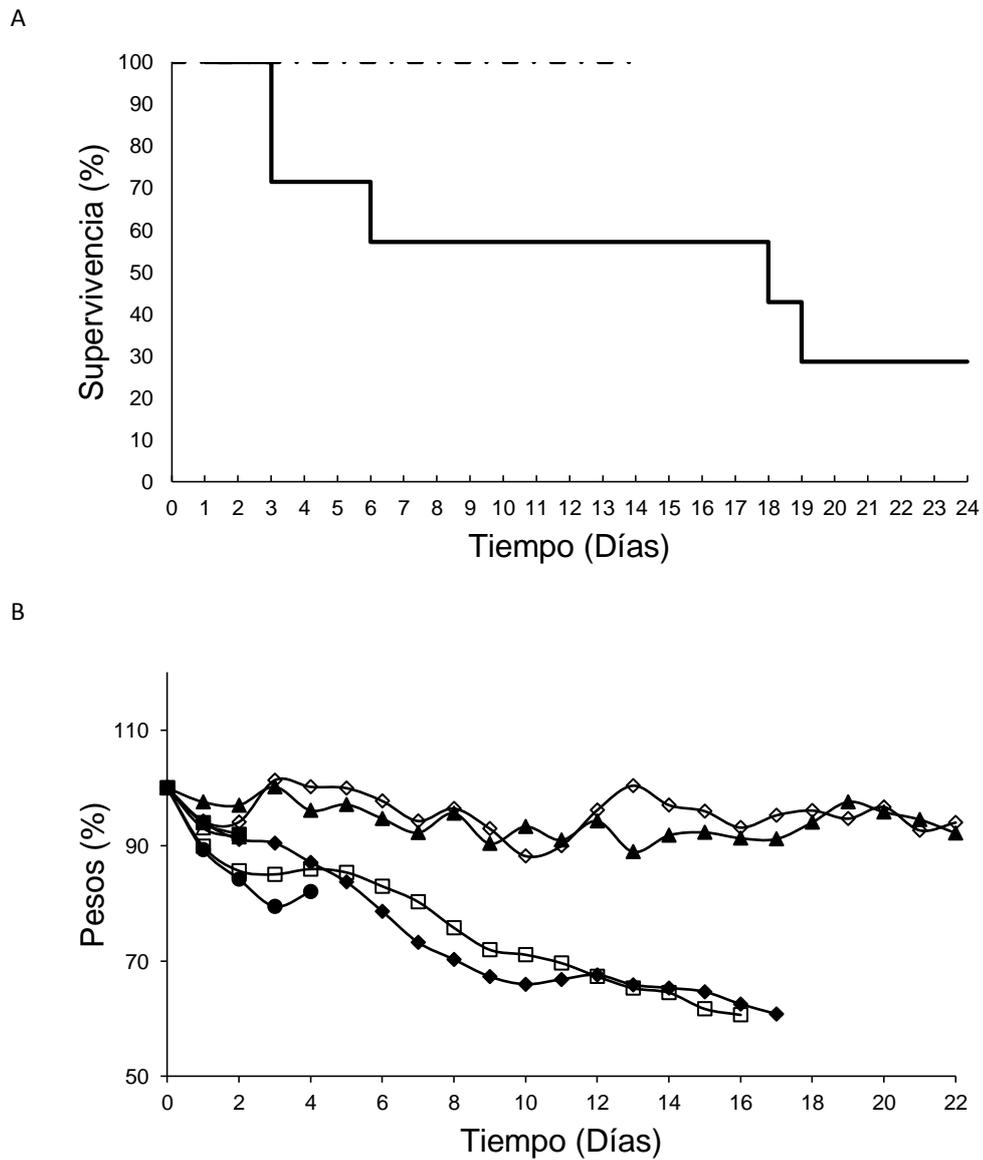


Fig. R26. Estudio del efecto de 10 mg/kg IP de nigrina b más 120 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 7). **A:** Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

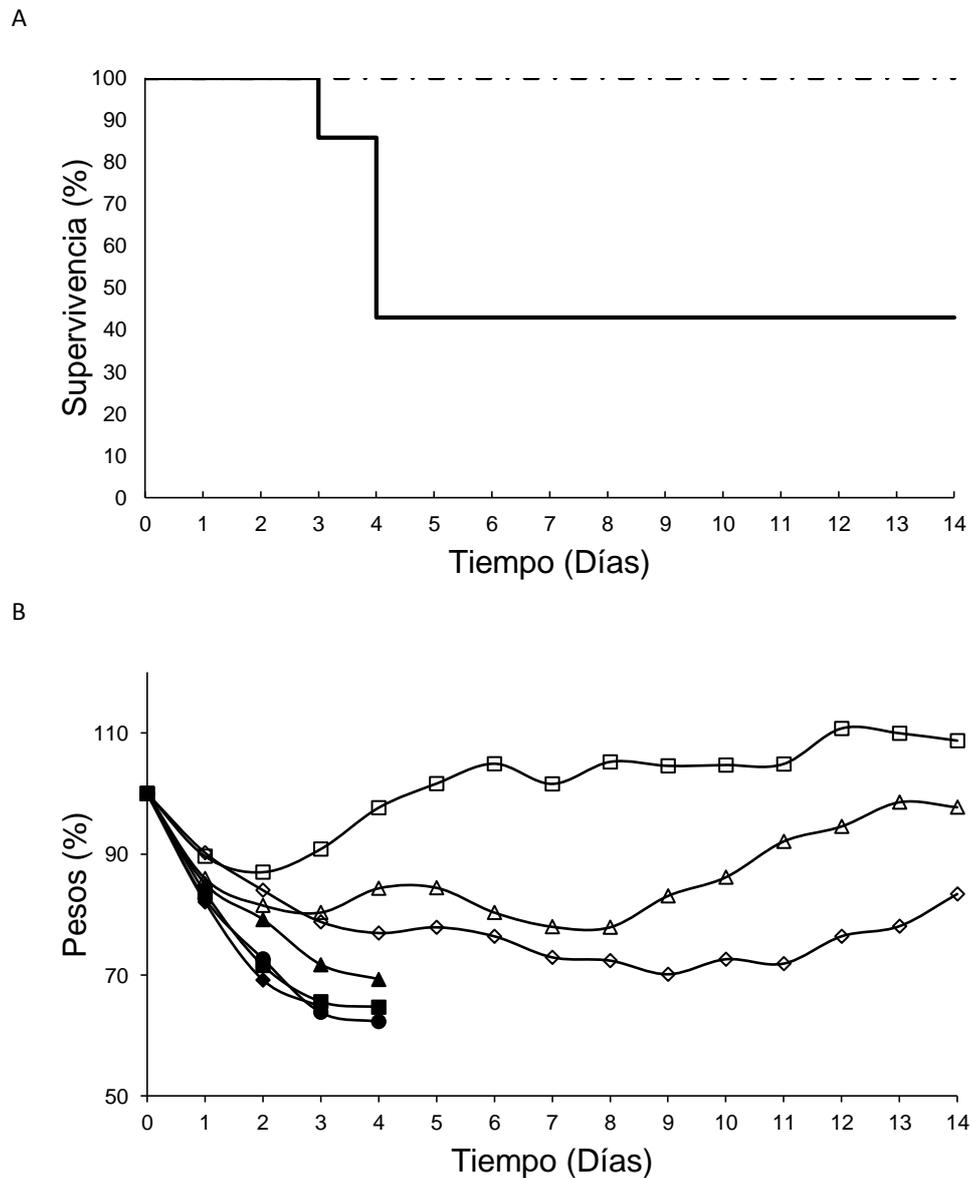


Fig. R27. Estudio del efecto de 10 mg/kg IP de nigrina b más 30 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 7). **A:** Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

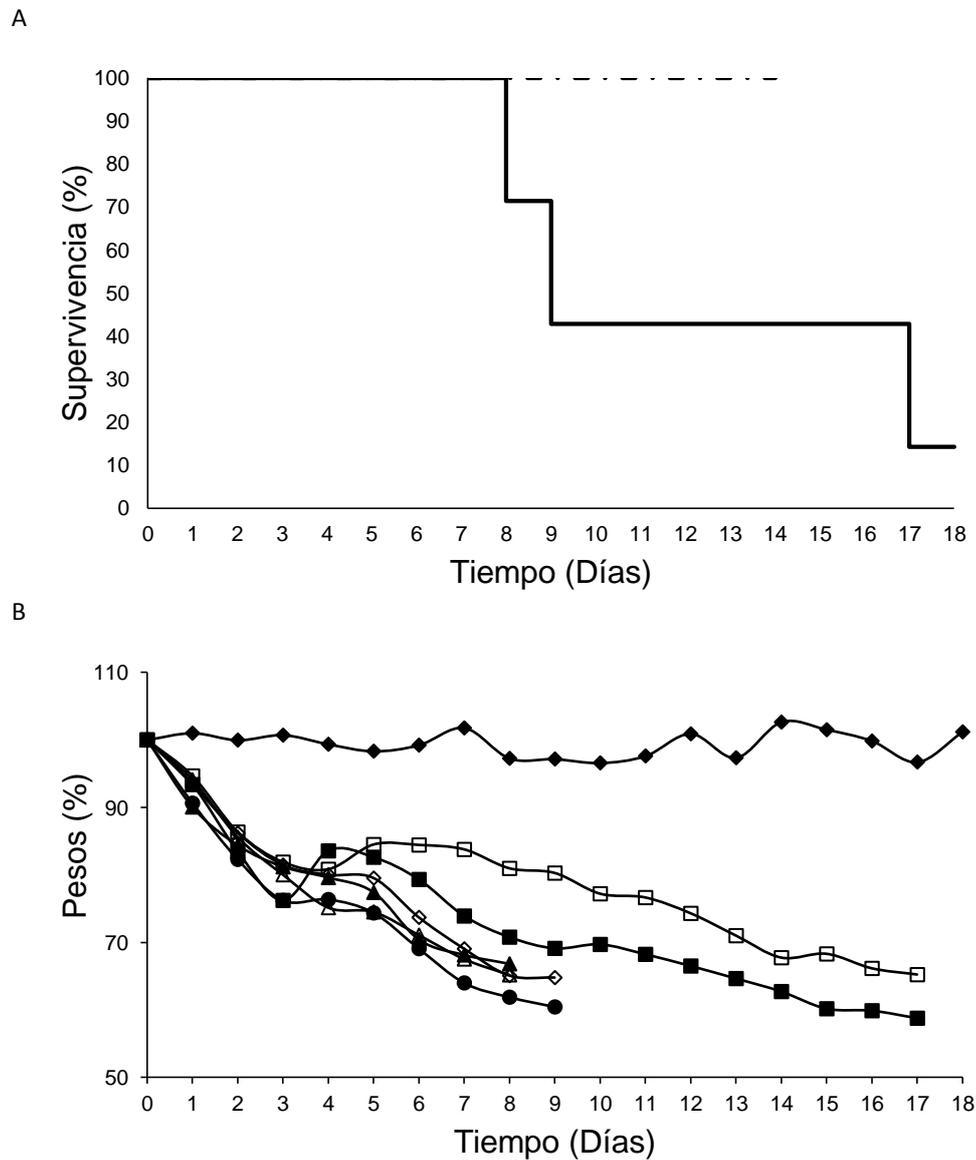


Fig. R28. Estudio del efecto de 10 mg/kg IP de nigrina b más 16 mg/kg O. de Polyphenon E en ratones (n = 7). **A:** Supervivencia (%) frente a la duración del experimento en días, la línea de trazo discontinuo indica el efecto de nigrina b por vía intraperitoneal; **B:** Evolución de cada uno de los ratones involucrados en el estudio mediante representación gráfica de su peso (%) frente al tiempo.

4.4. Análisis histológico.

4.4.1 Efectos de la administración de nigrina b a ratones.

Estudios previos indicaron que la inyección intraperitoneal de nigrina b en ratones provocaba la muerte de los mismos con una LD₅₀ ligeramente superior a 12 mg/kg (Battelli y cols, 1997). Estudios posteriores, realizados mediante administración intravenosa de nigrina b, indicaron que la lectina posee una toxicidad que depende de la vía de administración y de la concentración. Así, 5 mg/kg de nigrina b intravenosa no mata a los ratones, mientras que 10 mg/kg los mata a todos en 3 días (Gayoso y cols., 2005). Estudios preliminares revelaron que la concentración de nigrina b intraperitoneal equivalente a 5 mg/kg de nigrina b intravenosa es de 10 mg/kg.

La administración intravenosa de nigrina b 5 mg/kg a ratones produce una profunda alteración en los intestinos que se cree que es la causa de su toxicidad. El mecanismo mediante el cual la nigrina b produce este daño se demostró por medio de estudios histológicos, y consiste en la destrucción dependiente de la concentración, tanto del intestino delgado (criptas de Lieberkühn) como del intestino grueso, de una manera secuencial, (Gayoso y cols., 2005). La nigrina b ataca específicamente a las células del tercio medio de las criptas de Lieberkühn (células del TAC). Se demostró que el mecanismo estaba asociado a la promoción de la apoptosis de dichas células, cuya diferenciación lleva a los enterocitos a migrar hacia la parte superior de las criptas, mientras que las células de Paneth migran hacia el fondo de las mismas.

La alteración del intestino delgado por la inyección intravenosa de nigrina b 5 mg/kg se produce de la siguiente manera:

- 1) hasta las 24 horas se produce la destrucción por apoptosis de las criptas sin afectar aparentemente la estructura de los *villi*.
- 2) a las 72 horas se produce la recuperación de las criptas de Lieberkühn, la destrucción de los *villi* y la destrucción de las criptas del intestino grueso.
- 3) posteriormente, los animales que no mueren recuperan su estructura característica en ambos intestinos.

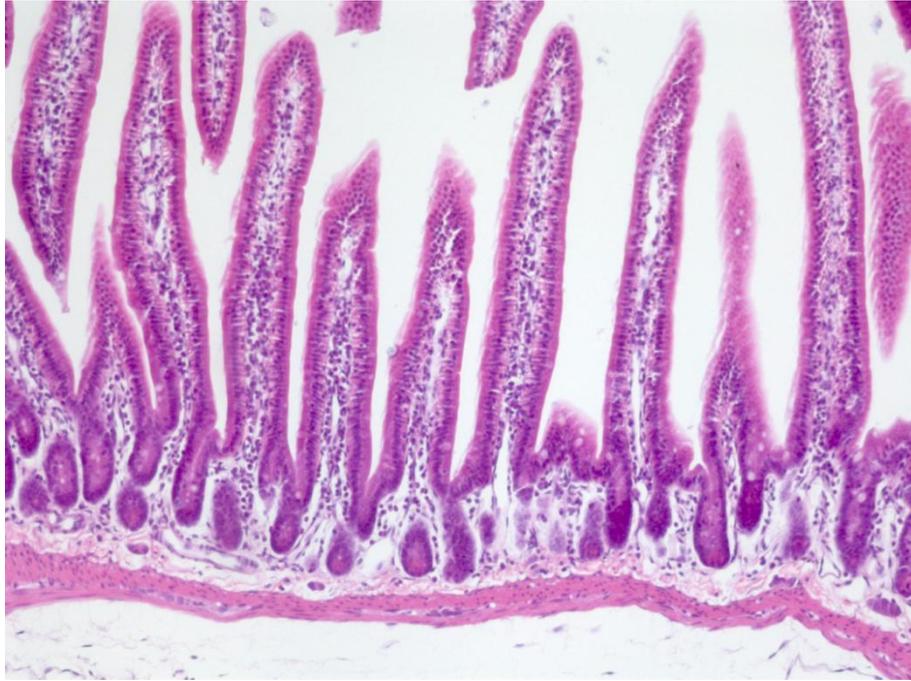
A 16 mg/kg de nigrina b intravenosa (concentración letal) se produce el mismo fenómeno pero con efectos de recuperación imposibles, llevando a los animales a la muerte antes de los dos días.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar los efectos de una mezcla de polifenoles del té verde que poseen efecto proapoptótico (Kanwar y cols., 2012) sobre el modelo de intoxicación reversible de ratones por nigrina 10 mg/kg intraperitoneal.

En primer lugar determinamos la estructura de intestino delgado y grueso en nuestras condiciones de experimentación de animales no sometidos a tratamiento experimental alguno, con la finalidad de poder detectar posibles alteraciones promovidas por los polifenoles.

Como se muestra en la figura R29, los animales control presentan la estructura columnar característica de los *villi*, así como las criptas de Lieberkühn, conteniendo células en constante proliferación.

A



B

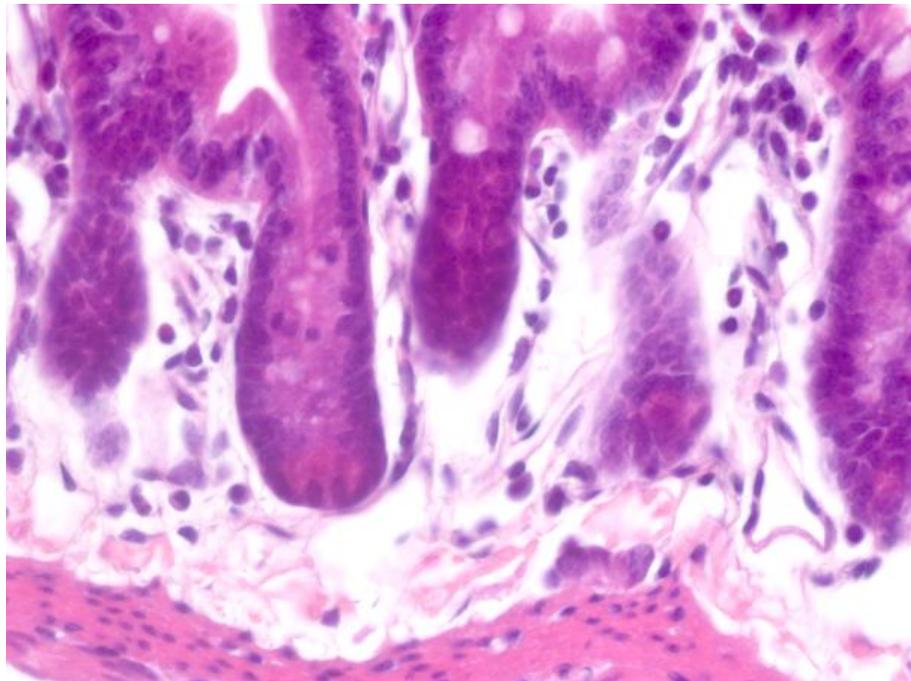


Fig. R29. Análisis histológico del intestino delgado de un ratón sin tratamiento con nigrina b (control negativo). Micrografías de una sección intestinal teñida con hematoxilina/eosina. **A:** Micrografía de 10 aumentos; **B:** Detalle de las criptas a 40 aumentos de la micrografía anterior.

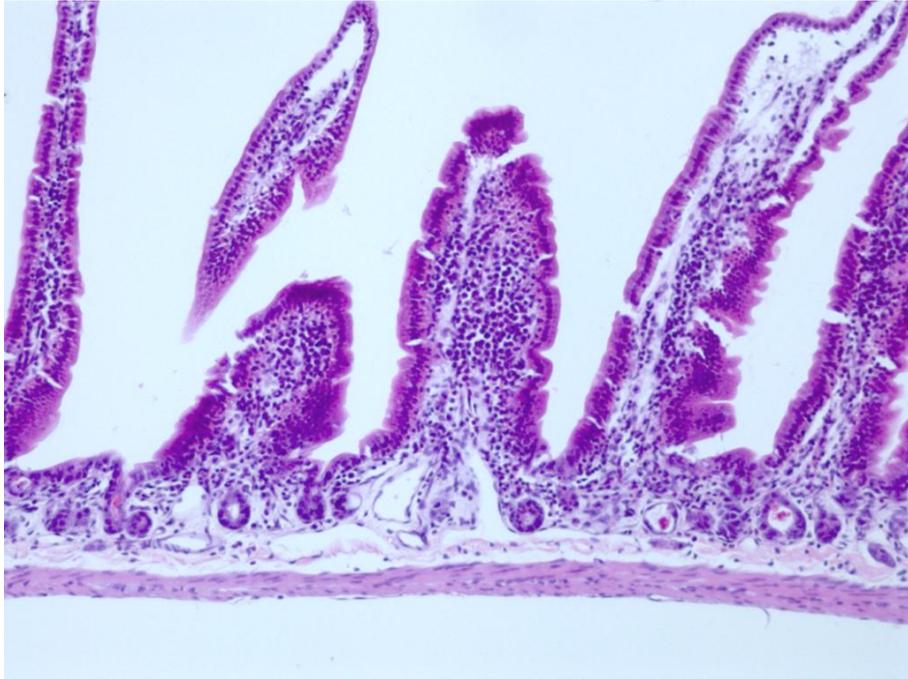
A las 24 horas de la administración intraperitoneal de 10 mg/kg de nigrina b se produce una gran alteración de la mucosa del intestino delgado, caracterizada por una fuerte destrucción de las criptas de Lieberkühn, que pierden su estructura característica, y aparecen con restos de numerosas células muertas por apoptosis. Los *villi* se muestran algo afectados, pero en general preservan su estructura (figura R30).

Como se indica en la figura R31, 48 horas después de la administración de nigrina b las criptas se encuentran en fase de recuperación y los *villi* muestran algunos signos de lesión.

72 horas después de la administración de nigrina b se observa (figura R32) una notable regeneración de las criptas, que recuperan su estructura longitudinal alargada, mientras que los *villi* aparecen más cortos pero sin signos evidentes de lesión importante.

Respecto al intestino grueso, los efectos de nigrina b son menos patentes que en el intestino delgado, pero evidentes entre 24 y 72 horas (figura R33).

A



B

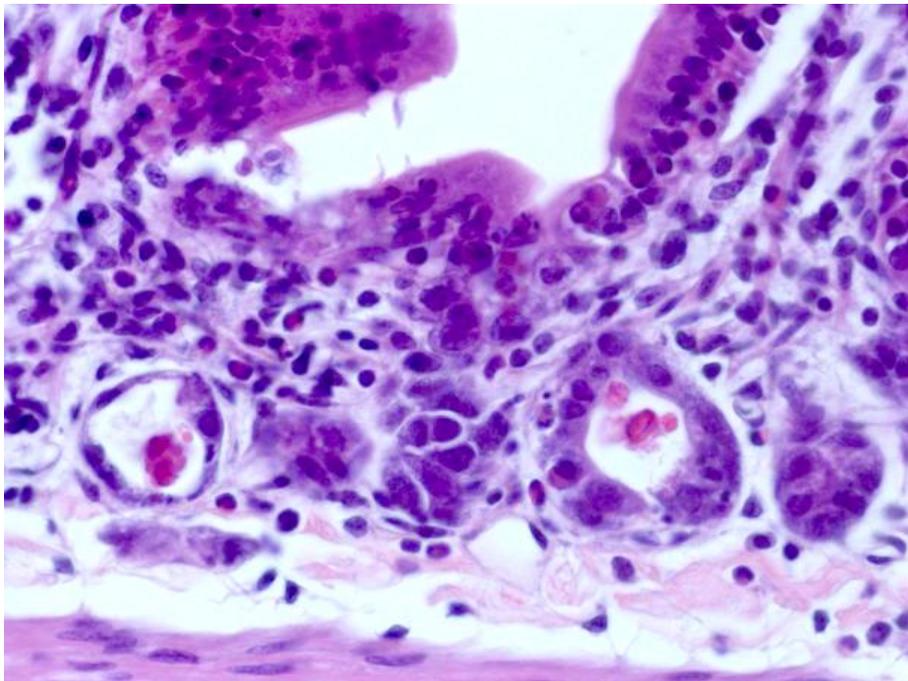
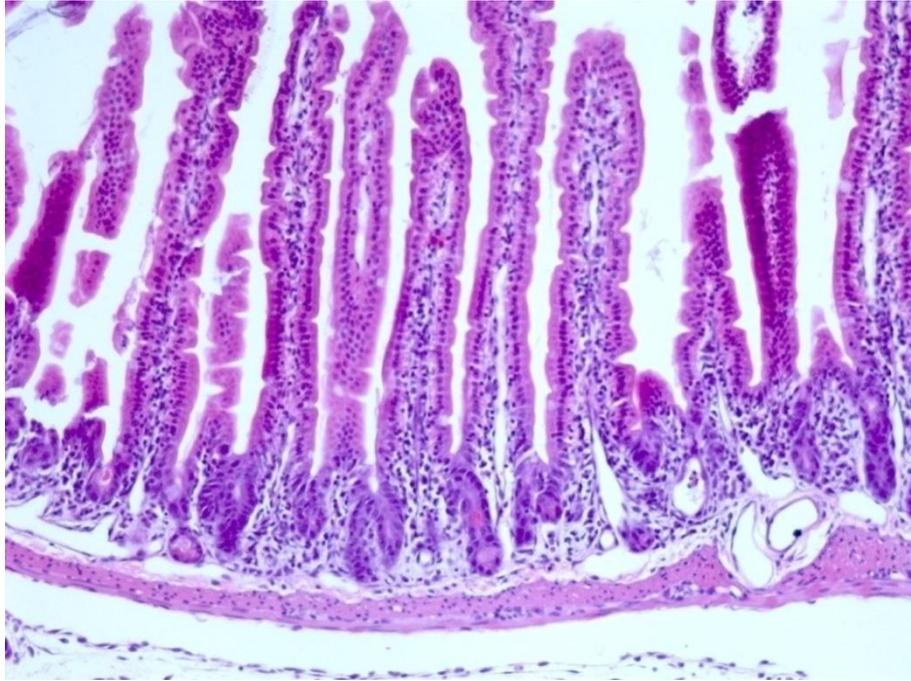


Fig. R30. Análisis histológico a 24 horas tras la administración de 10 mg/kg de **nigrina b** por vía intraperitoneal en ratones. Micrografías del intestino delgado teñido con hematoxilina/eosina. **A:** Micrografía de 10 aumentos; **B:** Detalle de las criptas a 40 aumentos de la micrografía anterior.

A



B

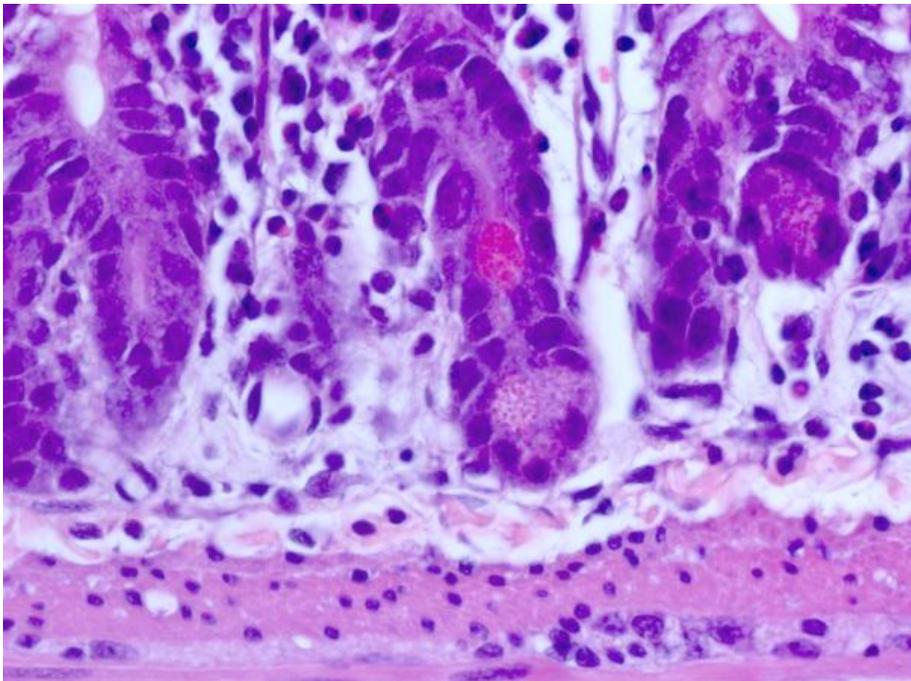
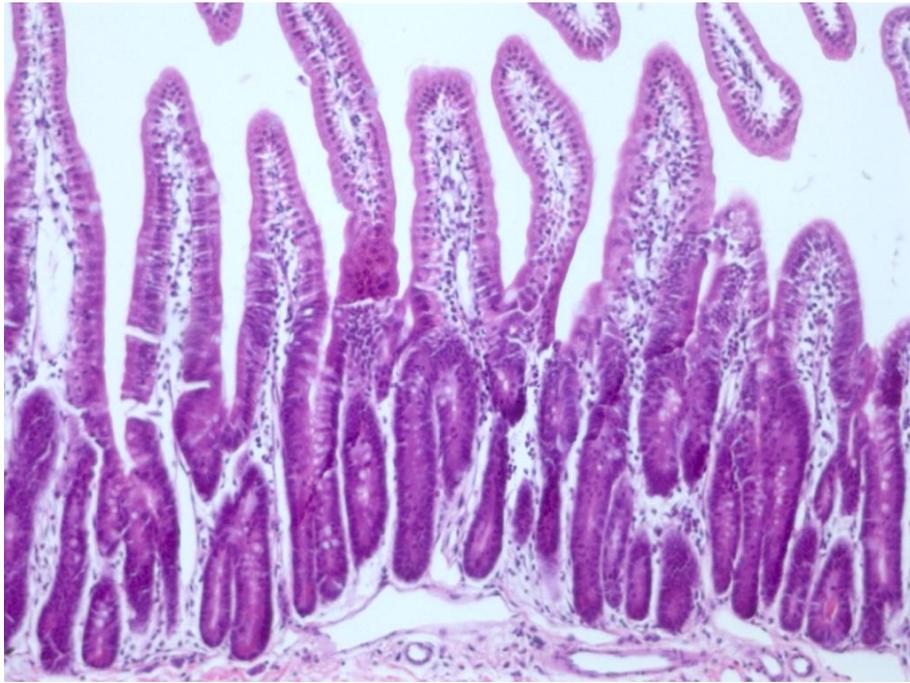


Fig. R31. Análisis histológico a 48 horas tras la administración de 10 mg/kg de **nigrina b** por vía intraperitoneal en ratones. Micrografías del intestino delgado teñido con hematoxilina/eosina. **A:** Micrografía de 10 aumentos; **B:** Detalle de las criptas a 40 aumentos de la micrografía anterior.

A



B

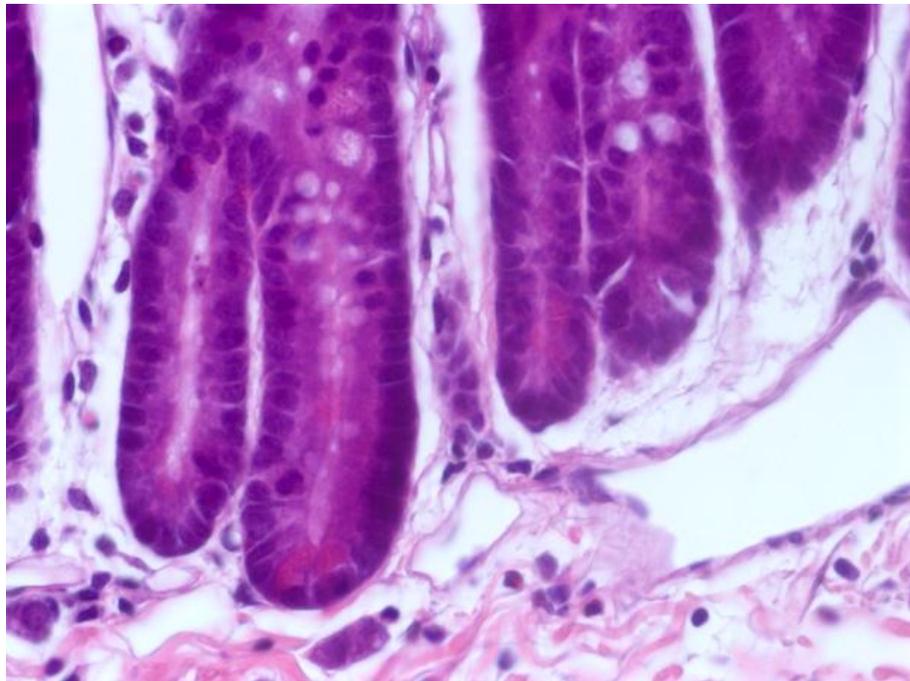
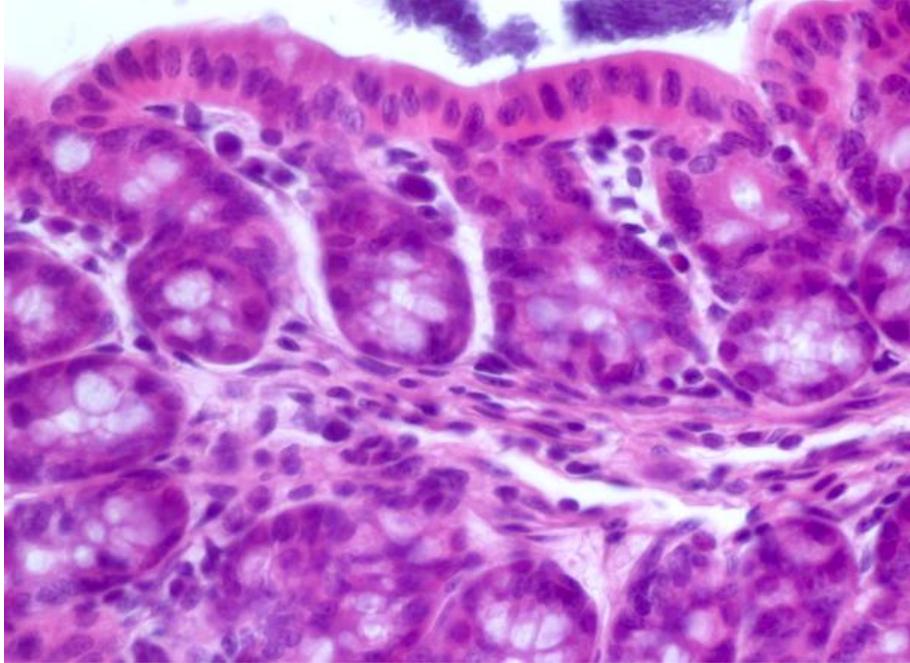


Fig. R32. Análisis histológico a 72 horas tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal en ratones. Micrografías del intestino delgado teñido con hematoxilina/eosina. A: Micrografía de 10 aumentos; B: Detalle de las criptas a 40 aumentos de la micrografía anterior.

A



B

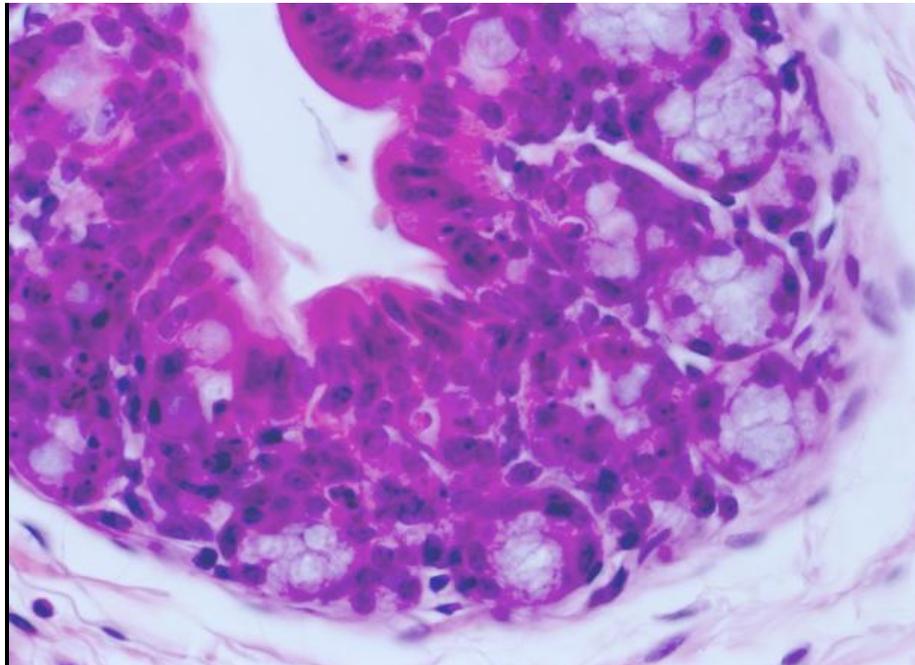


Fig. R33. Análisis histológico a diferentes tiempos tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal en ratones. Micrografías a 40 aumentos de secciones intestinales teñidas con hematoxilina/eosina. A: Sección del intestino grueso de un ratón control negativo; **B:** Sección del intestino grueso de un ratón perfundido a las 24 horas;

C



D

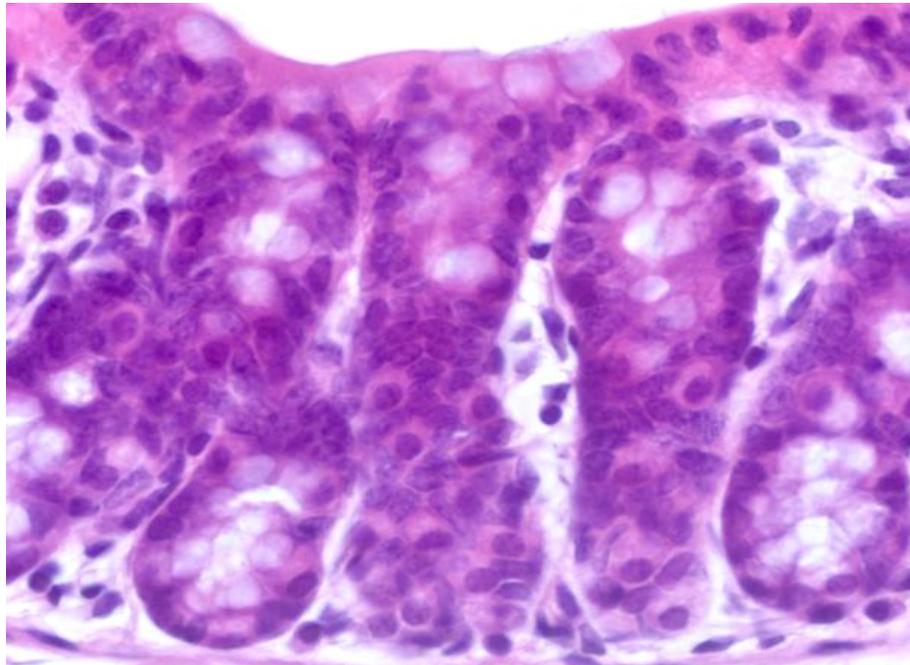


Fig. R33 (continuación). Análisis histológico a diferentes tiempos tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal en ratones. Micrografías a 40 aumentos de secciones intestinales teñidas con hematoxilina/eosina. **C:** Sección del intestino grueso de un ratón perfundido a las 48 horas; **D:** Sección del intestino grueso de un ratón perfundido a las 72 horas.

4.4.2 Efectos de la administración de Polyphenon E a ratones.

La administración oral de Polyphenon E 30 mg/kg no ejerció efecto ni sobre la mortalidad de animales (apartado 4.3.2) ni sobre la arquitectura de la mucosa del intestino delgado (figura R34), en la que se observa una disposición normal prácticamente idéntica a la de los controles tanto de criptas como de *villi*.

Sin embargo, la administración de la misma concentración de Polyphenon E a animales tratados simultáneamente con nigrina b 10 mg/kg intraperitoneal provocó un fuerte efecto tóxico, traducido en una mortalidad de los animales (apartado 4.3.2) y la alteración de la estructura normal de las criptas de Lieberkühn, las cuales aparecen bastante más dañadas que en ratones tratados sólo con nigrina b. Estas criptas, cuando existen, aparecen atrofiadas y mostrando la desaparición de muchas de ellas, quedando la mucosa intestinal constituida por una especie de epitelio raquíptico con gran número de células muertas, presumiblemente por apoptosis (figuras R35-R37).

Se estudiaron también el riñón, el hígado y el pulmón de animales tratados simultáneamente con nigrina b y Polyphenon E. El tratamiento conjunto provoca daños evidentes en el riñón, mayores a 72 que a 24 horas, y más evidentes en la médula renal (figuras R38-R39).

Los efectos sobre el hígado son también dependientes del tiempo, apareciendo congestión a las 48 horas y fuerte alteración a las 72 horas (figura R40).

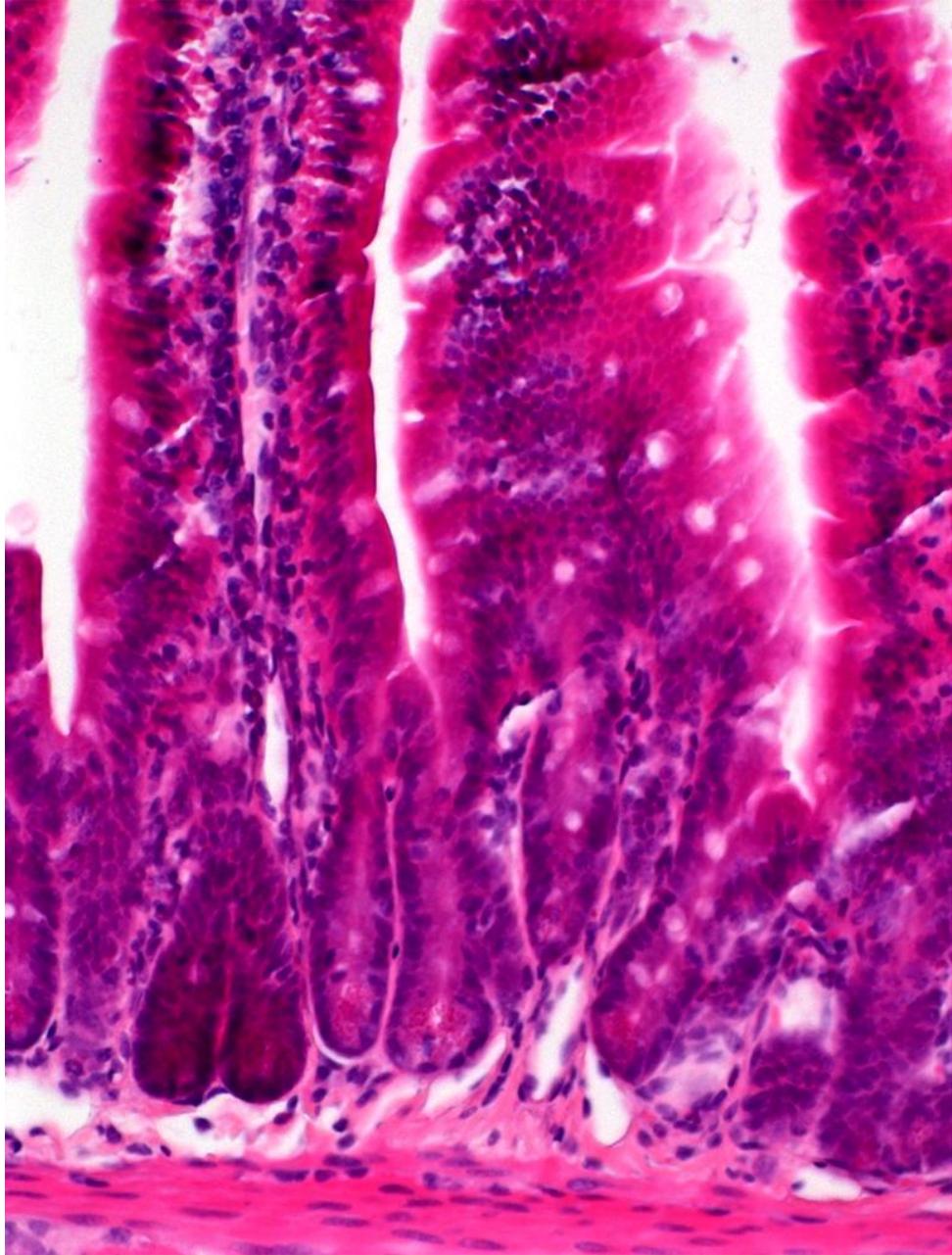
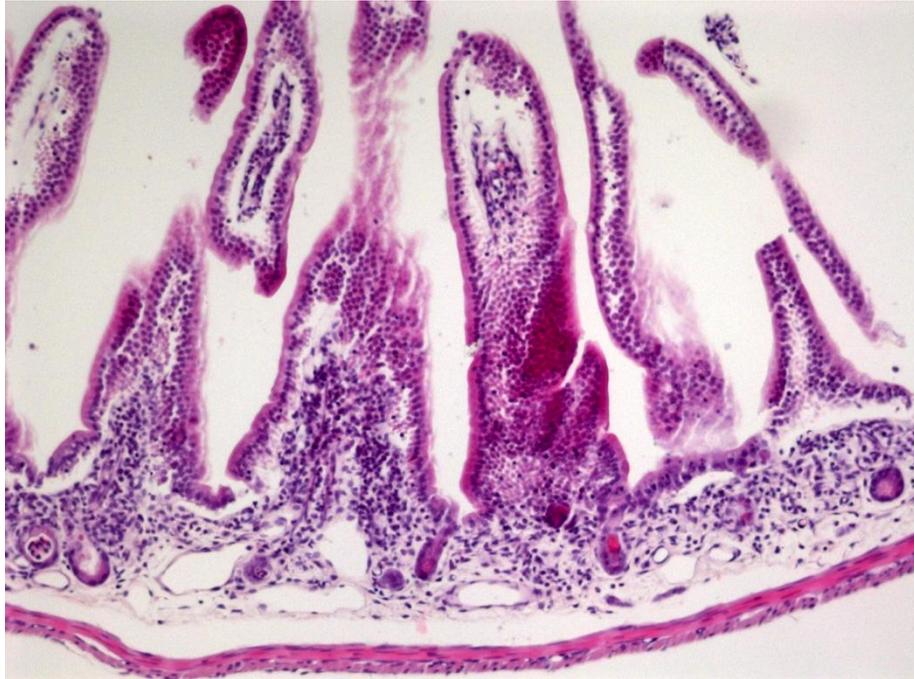


Fig. R34. Análisis histológico a 24 horas tras la administración de 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías de 20 aumentos del intestino delgado teñido con hematoxilina/eosina.

A



B

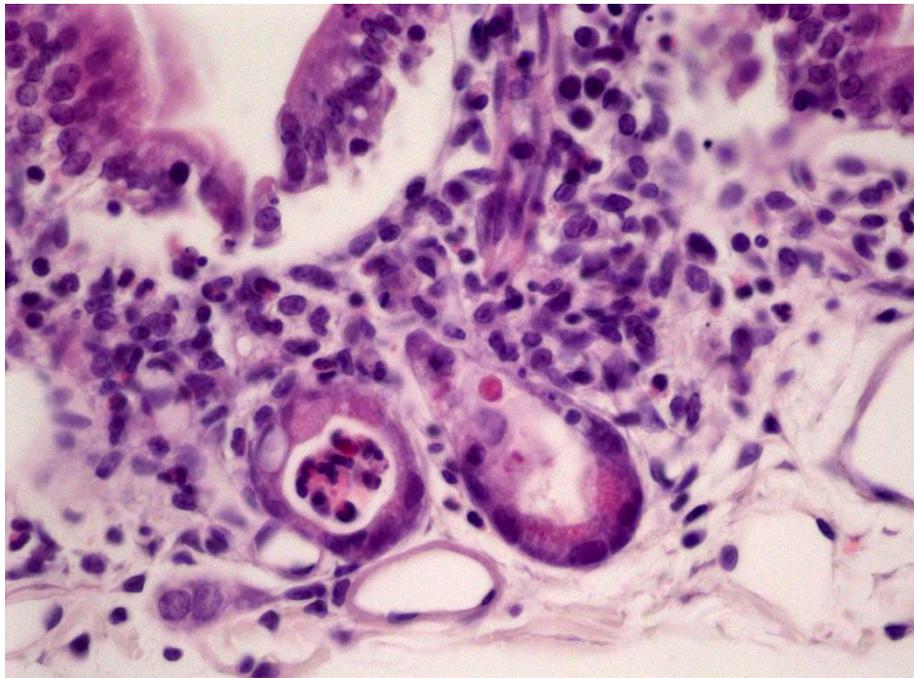


Fig. R35. Análisis histológico a 24 horas tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías del intestino delgado teñido con hematoxilina/eosina. **A:** Micrografía de 10 aumentos; **B:** Detalle de las criptas a 40 aumentos de la micrografía anterior.

A



B

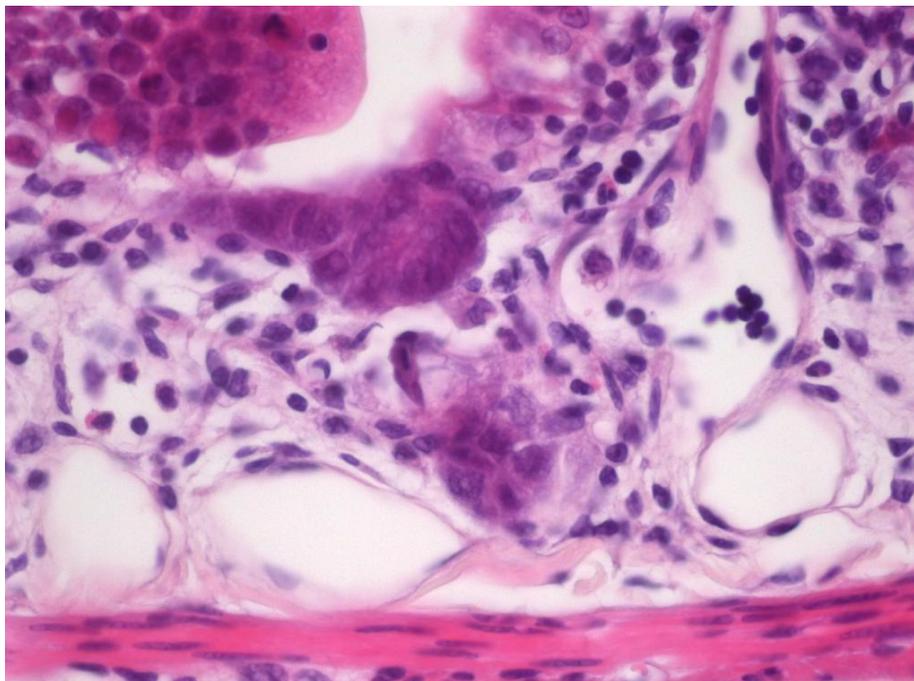
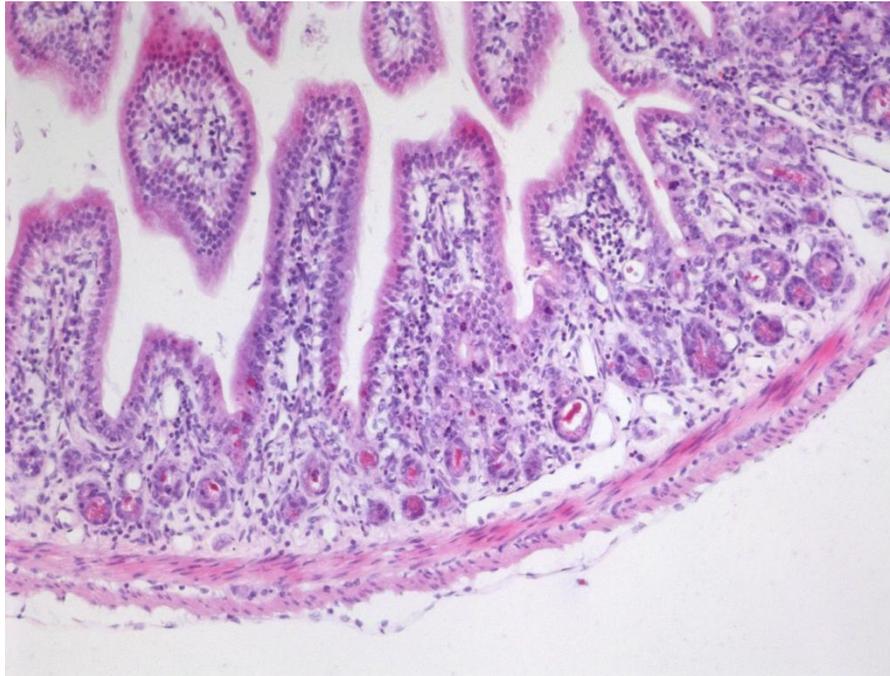


Fig. R36. Análisis histológico a 48 horas tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías del intestino delgado teñido con hematoxilina/eosina. **A:** Micrografía de 10 aumentos; **B:** Detalle de las criptas a 40 aumentos de la micrografía anterior.

A



B

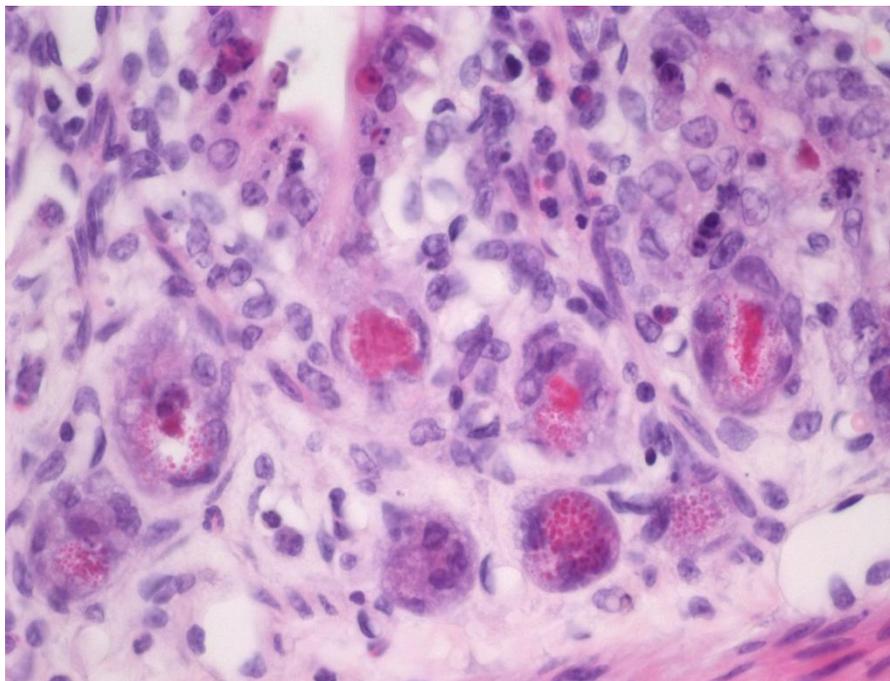
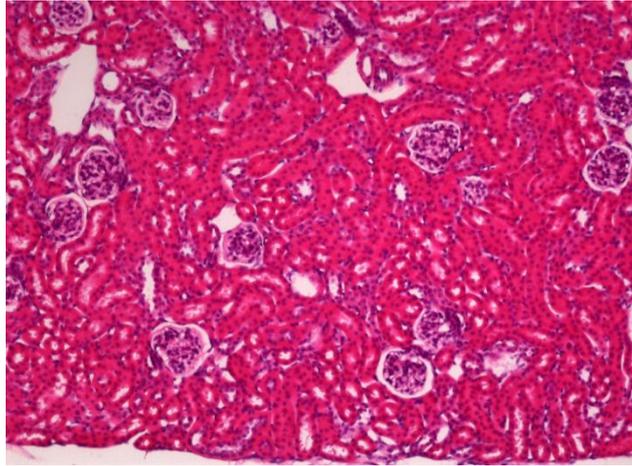
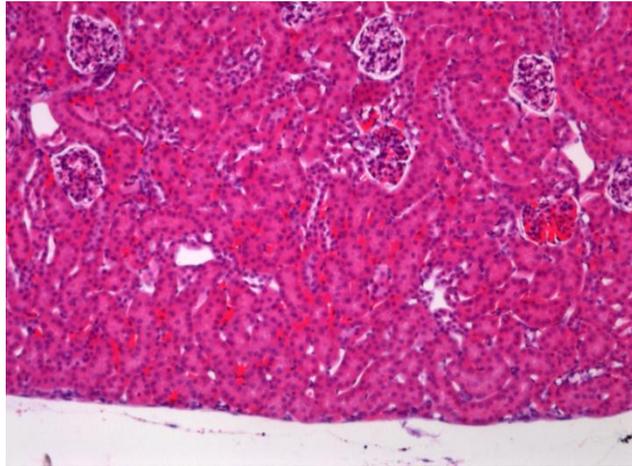


Fig. R37. Análisis histológico a 72 horas tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías del intestino delgado teñido con hematoxilina/eosina. A: Micrografía de 10 aumentos; B: Detalle de las criptas a 40 aumentos de la micrografía anterior.

A



B



C

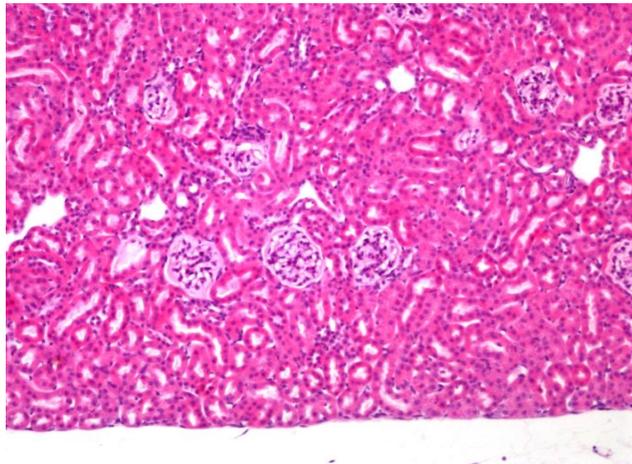
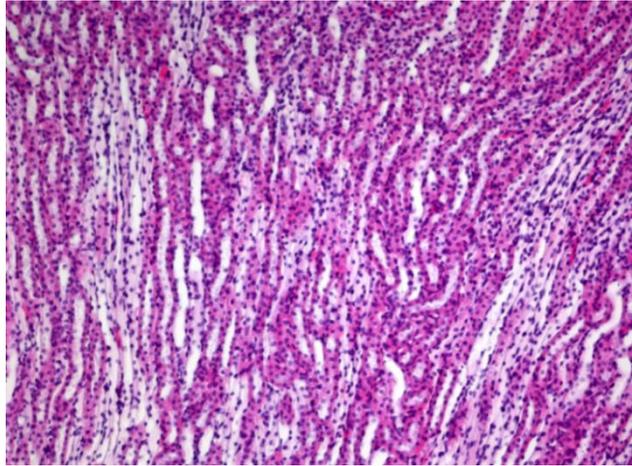
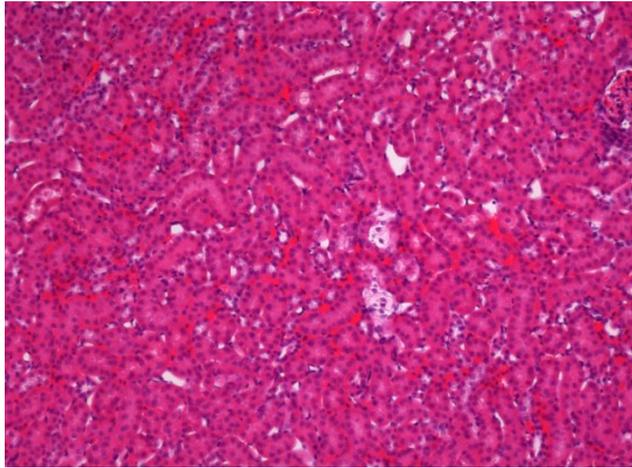


Fig. R38. Análisis histológico tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías a 10 aumentos de glomérulos del riñón teñidos con hematoxilina/eosina. **A:** 24 horas; **B:** 48 horas; **C:** 72 horas después de la administración.

A



B



C

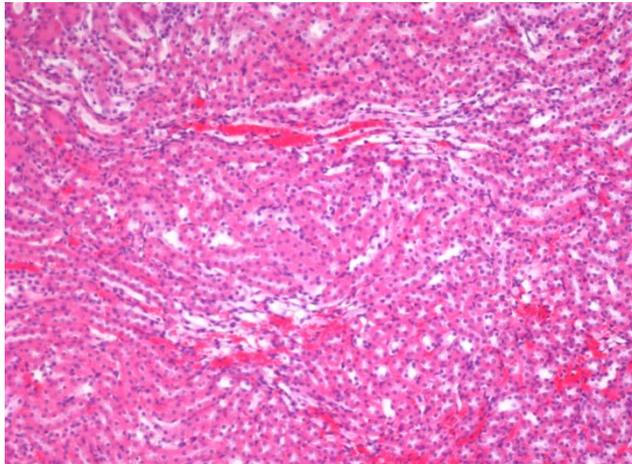


Fig. R39. Análisis histológico tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías a 10 aumentos de la médula del riñón teñida con hematoxilina/eosina. **A:** 24 horas; **B:** 48 horas; **C:** 72 horas después de la administración.

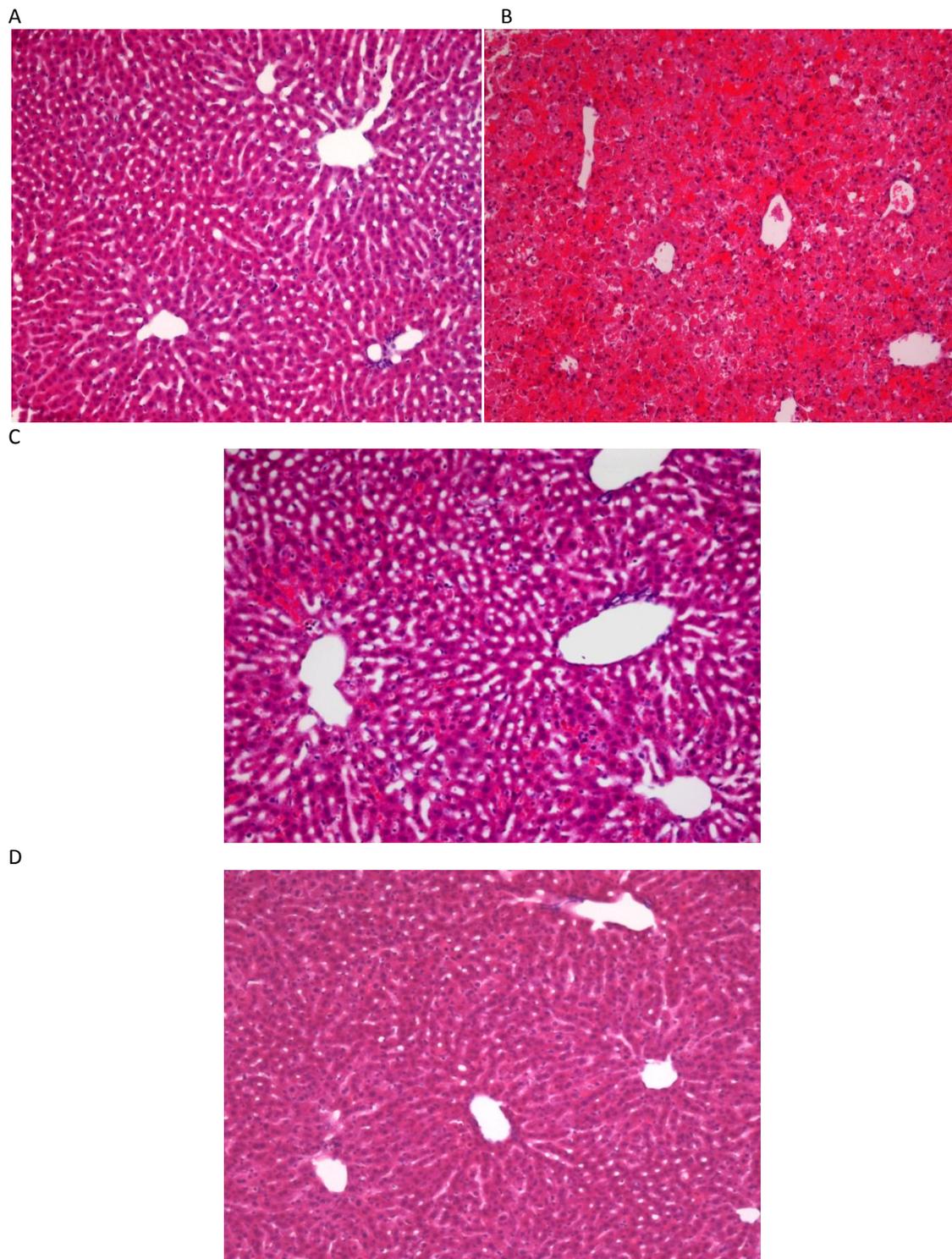


Fig. R40. Análisis histológico tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías a 10 aumentos del hígado teñido con hematoxilina/eosina. **A:** 24 horas; **B:** 24 horas, micrografía de un segundo ratón, donde puede observarse mayor daño en la zona; **C:** 48 horas; **D:** 72 horas después de la administración.

En lo que respecta al pulmón, los efectos fueron al contrario que en riñón e hígado, mayor a 24 horas, con congestión pulmonar y áreas hemorrágicas, y menor a 72 horas, con aspecto poco dañado aunque ligeramente congestivo (figura R41). Estos efectos dependen del grado de daño que sufra el ratón a estudio.

Cuando se administró Polyphenon E 30 mg/kg por vía oral a animales tratados simultáneamente con 16 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal se evidenciaron efectos notablemente más dañinos, mostrando un fuerte incremento de la mortalidad (apartado 4.3.2), así como una destrucción muy importante del intestino delgado (figura R42).

En estas condiciones, las criptas aparecen atrofiadas y prácticamente se desvanecen, dejando restos de células muertas con morfología apoptótica. La mucosa pierde completamente su organización histológica y el epitelio prácticamente desaparece, dando lugar a una estructura aplanada que no conserva ningún parecido con la estructura normal de criptas y *villi*.

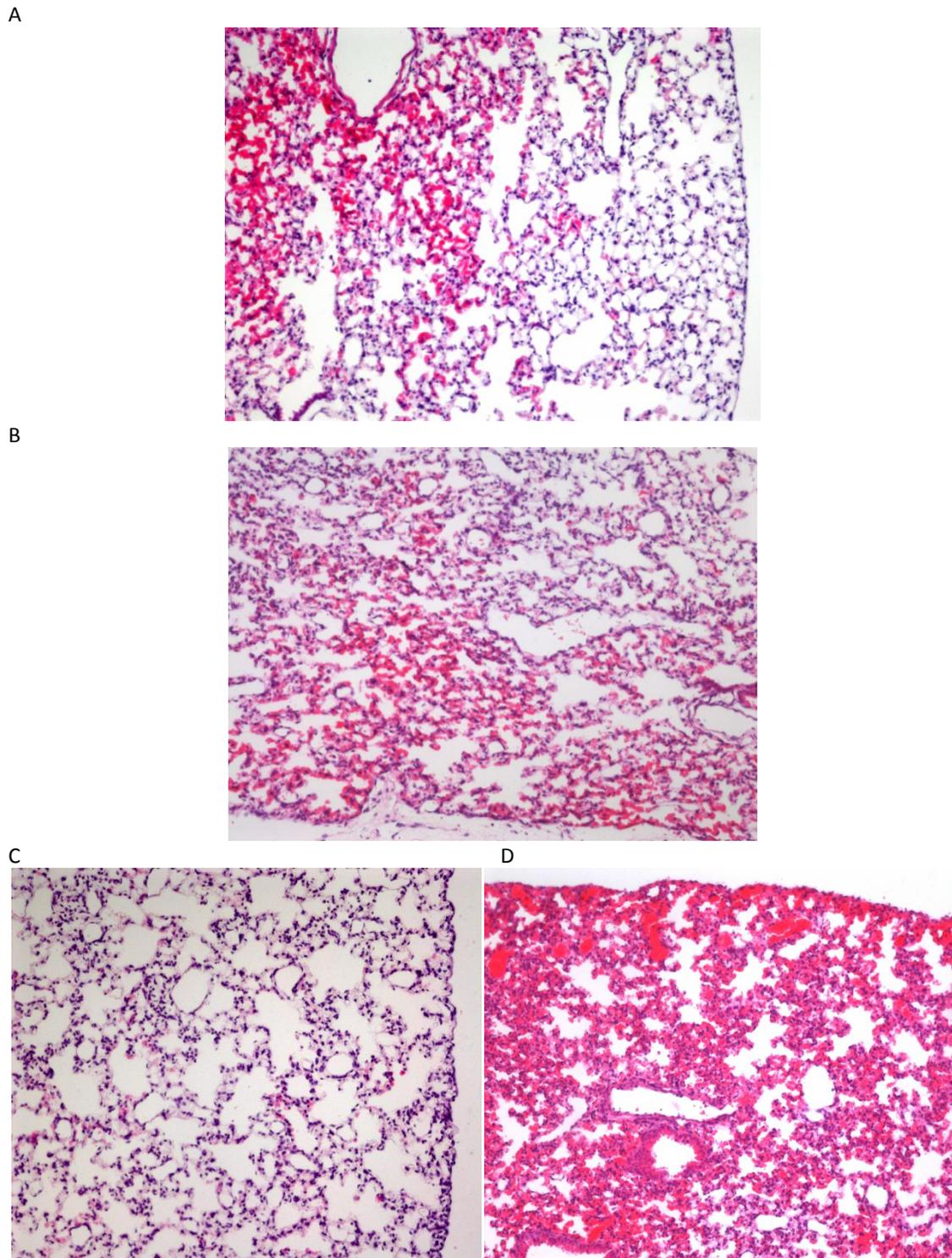
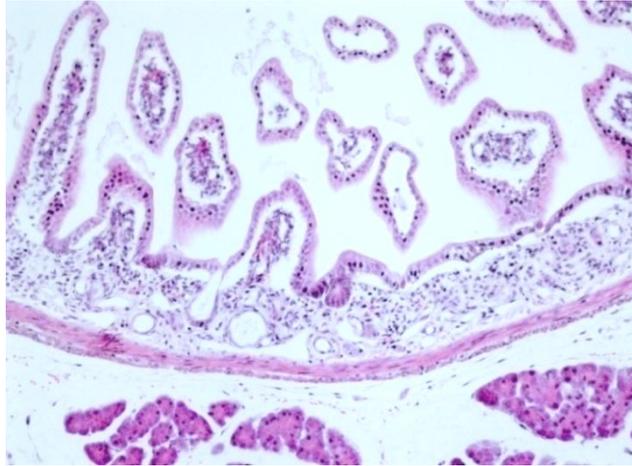
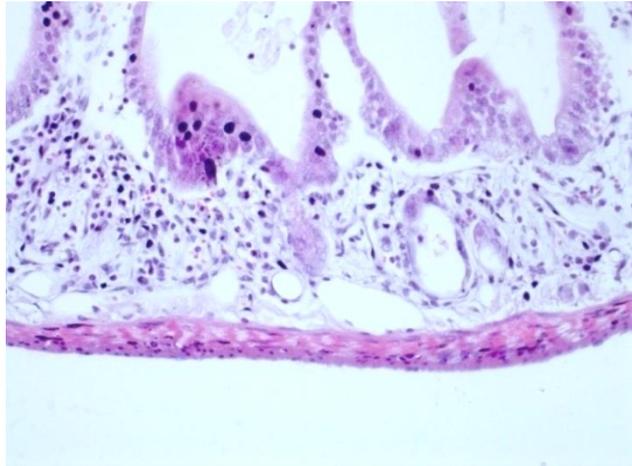


Fig. R41. Análisis histológico tras la administración de 10 mg/kg de nigrina b por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Micrografías a 10 aumentos del pulmón teñido con hematoxilina/eosina. **A:** 24 horas; **B:** 48 horas; **C:** 72 horas después de la administración; **D:** 72 horas, micrografía de un segundo ratón, donde puede observarse mayor daño en la zona.

A



B



C

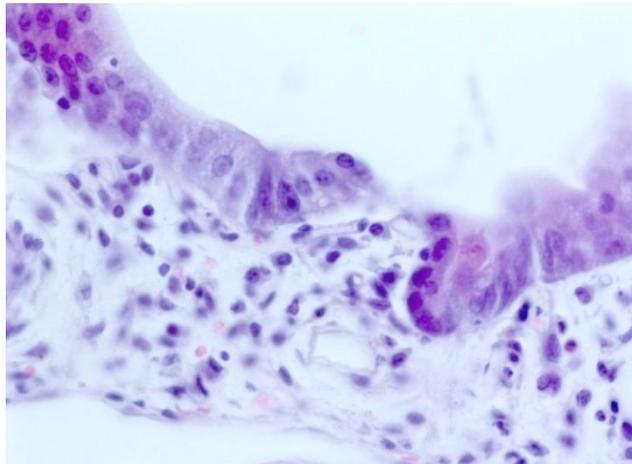


Fig. R42. Análisis histológico a las 48 horas tras la administración de 16 mg/kg por vía intraperitoneal de nigrina b y 30 mg/kg por vía oral de Polyphenon E en ratones. Micrografías de secciones intestinales teñidas con hematoxilina/eosina. **A:** Sección del intestino delgado a 10 aumentos; **B:** Sección del intestino delgado a 20 aumentos; **C:** Sección del intestino delgado a 40 aumentos.

5. DISCUSIÓN.



Existen dos procedimientos descritos para el aislamiento de nigrina b a partir de la corteza de *Sambucus nigra*. El primero de ellos es fundamentalmente un procedimiento de afinidad, mientras que el segundo es un procedimiento que juega con las propiedades iónicas de la nigrina b.

El procedimiento de aislamiento por cromatografía de afinidad consiste en la obtención de los extractos proteicos de la corteza, su fijación por afinidad a una columna de Sepharose 6B tratada con ácido para liberar D-galactosas terminales y finalmente una cromatografía de exclusión molecular para separar las lectinas (Girbés y cols., 1993b). Con la cromatografía de afinidad se consigue que las proteínas con afinidad a D-galactosa se fijen a la resina en un procedimiento que tradicionalmente se ha llevado a 4 °C, sin saber realmente la razón. Recientemente se ha encontrado que las proteínas análogas presentes en *Sambucus ebulus* se fijan a la misma resina de afinidad mediante interacciones dependientes de temperatura, siendo máxima la fijación por debajo de los 10 °C y prácticamente inexistente a los 20 °C (Citores y cols., 2008). La fijación a la resina de afinidad exige que las proteínas correspondientes sean activas y reconozcan las cadenas con D-galactosa terminal, de manera que la posterior purificación se realiza sólo con proteínas completamente activas en su capacidad de lectina.

La mezcla de proteínas con afinidad por la D-galactosa se separa posteriormente por cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75, que permite una clara separación entre las tres proteínas que se fijan a la D-galactosa, SNA I, nigrina b y SNA II.

El otro procedimiento de aislamiento de estas proteínas es más reciente (Ferrerías y cols., 2011), y consiste en la obtención de los extractos de proteínas, su clarificación por centrifugación, el tratamiento con ácido acético para eliminar material indeseable (agregados proteicos, proteínas básicas, algunos polisacáridos cargados, etc.) y posterior cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Por este procedimiento se puede aislar nigrina b con un rendimiento mayor (5 veces), sin embargo, posee dos inconvenientes mayores, uno es que solamente se aísla nigrina b por este procedimiento, y el otro que no se garantiza que toda la proteína aislada presente la misma afinidad por D-galactosa. De hecho, podría darse la circunstancia de que existiesen cadenas polipeptídicas desnaturalizadas o poco activas de nigrina b que podrían aislarse por intercambio iónico pero no por afinidad a D-galactosa, que es una medida de su actividad a la lectina.

Para estudiar los efectos funcionales de la nigrina b es necesario, por tanto, proteína con la máxima actividad, lo que se garantiza mejor mediante el aislamiento por afinidad. Esta es la razón por la cual en este trabajo se ha utilizado nigrina b aislada por el procedimiento de afinidad.

Se ha descrito que la mayor concentración de nigrina b en corteza de *Sambucus nigra* se produce en la corteza secundaria durante la primavera y el verano, por ello, se utilizó corteza recogida siempre en julio. Los procesos de obtención de nigrina b descritos previamente (Girbés y cols., 1993b; Ferrerías y cols., 2011) utilizan corteza recién separada de la rama que se congela hasta su utilización. La corteza congelada se tritura a continuación con nitrógeno líquido hasta fragmentarla en partículas

inferiores a 1 mm de diámetro para incrementar la superficie de extracción con el tampón adecuado. En este procedimiento se trata el 68 % de agua contenida en la corteza húmeda, lo que reduce notablemente el rendimiento en peso de corteza y exige disponer de nitrógeno líquido y de una trituradora de cuchillas especial que permita cortar la corteza, que posee una consistencia celulósica muy dura.

Uno de los objetivos de este trabajo fue explorar la posibilidad de utilizar corteza de *Sambucus nigra* seca como producto de partida para la obtención de nigrina b. El secado de la corteza a una temperatura de entre 22 y 25 °C con aireación suave deseca el material entre 2 y 3 días en función del tamaño de los fragmentos de corteza, provocando una pérdida de peso del 68 % (masa seca 32 % del original). El material seco es notablemente quebradizo, fácil de manipular y de triturar.

La trituración de la corteza seca con molinillo de café de cuchillas convencionales permite obtener un grano igual o menor que el obtenido por el procedimiento anterior. Este material triturado se utiliza para la extracción con tampón y, como hemos presentado en los resultados, permite la obtención entre 2 y 2,5 veces más proteína por unidad de peso corregido por la humedad, a partir de corteza seca que de corteza húmeda. Esto indica que el secado de la corteza no afecta a la capacidad de fijación de D-galactosa de las proteínas y tampoco a la actividad enzimática de la cadena A como lo demuestra la toxicidad de la nigrina b purificada. Desde el punto de vista práctico este resultado es extraordinariamente importante, por cuanto reduce el material de partida necesario para obtener la misma cantidad de proteína así como el equipamiento experimental.

La caracterización físico-química y funcional de las lectinas de D-galactosa de la corteza de *Sambucus nigra* indica que las proteínas conservan su capacidad hemoaglutinante y su masa molecular relativa determinada por electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS. Es más, hemos encontrado que poseen también la dependencia de la hemoaglutinación con la temperatura, que se ha observado con ebulina I, SELId y SELIm (Citores y cols., 2008). Tanto los valores de hemoaglutinación como las masas moleculares relativas están de acuerdo con los valores publicados cuando se descubrió la nigrina b por el procedimiento de afinidad (Girbés y cols., 1993b).

El aislamiento inicial de las lectinas SNA I y SNA II se realizó con fetuina-agarosa, resina de afinidad que permite la fijación de sialil- $\alpha(2,6)$ gal/galNAc (Van Damme y cols., 1996). Con este sistema cromatográfico es imposible la detección de nigrina b, que por el contrario sí puede realizarse con Sepharose 6B tratada con ácido. Esto indica claramente que nigrina b no interacciona con el ácido siálico.

La nigrina b, a diferencia de SNA I y SNA II, se presenta como una proteína homogénea de Mr. 58.000 mientras que SNA I presenta dos formas, una tetramérica de tipo 2(A-B) y otra octamérica de 2(A-B)₂ (Van Damme y cols., 1996). Esta heterogeneidad puede presentarse también en electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS al 10 %, en la que pueden observarse dos bandas nítidas en la parte superior del gel de SNA I. SNA II presenta también heterogeneidad, probablemente debida a distintos grados de glucosilación de la cadena B. Por otro lado, hay que resaltar que

aunque la nigrina b está también glucosilada (Citores y cols., 1996), no presenta dicha heterogeneidad en el grado de glucosilación.

La nigrina b posee una estructura relativamente compacta y resistente a la hidrólisis con pepsina ácida. Esta propiedad la comparten también SNA I y SNA II. La desnaturalización por calor de las tres proteínas las convierte en completamente susceptibles a la digestión por pepsina ácida. Se ha sugerido que la resistencia a pepsina podría estar relacionada con el grado de glucosilación de las proteínas, de manera que las cadenas glucosiladas de las proteínas podrían constituir una esfera de hidratación que redujese el acceso de la pepsina. Al perderse esta organización estructural por calor, podría desaparecer o reducir esta estructura de hidratación y aumentar el número de sitios de acceso a la pepsina en la cadena polipeptídica, y por lo tanto aumentar la posibilidad de degradación.

En contraste con la pepsina, la pancreatina (mezcla de enzimas de origen pancreático, entre ellas proteasas) degrada muy ligeramente a nuestras lectinas. Es de resaltar también la persistencia a la pancreatina de la BSA en nuestras condiciones. Estas diferentes sensibilidades a enzimas proteolíticas y la relación con la estructura nativa refleja la dependencia que tiene el proceso gástrico de la digestión proteica previo al intestinal.

Existen en el mercado distintas preparaciones de saúco basadas fundamentalmente en los frutos. Por ello se estudió también la sensibilidad de las lectinas de frutos, nigrina f y SNA IV, observándose el mismo resultado que las lectinas de corteza, lo que sugiere que la resistencia a pepsina ácida es una característica de estas lectinas de *Sambucus nigra*.

En cuanto al jarabe que contiene saúco, no parece contener proteínas de suficiente tamaño molecular como para poder separarse por electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS. Las bandas teñidas que se observan en la electroforesis en la parte superior del gel, corresponden a los agregados, dextrinas, que tiene el colorante.

De haber habido proteínas se hubieran degradado por pepsina, ya que el proceso de concentración del jarabe se utiliza TCA en caliente, es decir, condiciones de desnaturalización que como hemos demostrado en el presente trabajo facilita el ataque de pepsina ácida.

El hecho de que las lectinas de *Sambucus nigra* resistan la acción de pepsina ácida y de pancreatina indica que puede haber riesgo de respuesta alérgica a estas proteínas si el individuo está previamente sensibilizado por contacto con el polen o, en general, con partes del saúco.

En el presente trabajo se administró la nigrina b como solución acuosa intraperitoneal. Para que la nigrina b ejerza su acción, es necesario que se difunda a través de los distintos tejidos que circundan al punto de inyección, que entre en la sangre y que se distribuya al resto de tejidos. Dado que no se detectó nigrina b en sangre utilizando la técnica de Western-blot e inmunodetección con anticuerpos policlonales antinigrina b de conejo, el efecto tóxico que se observa en nuestras condiciones (apartado 4.3) indica que la nigrina b ejerce el efecto mediante una rápida difusión que alcanza los intestinos, sobre los cuales actúa como se ha visto en los resultados. Resultados no publicados (Prof. Girbés) indican que la inyección intravenosa de nigrina b a ratones por la vena de la cola en las

mismas condiciones, permite la detección de la lectina en plasma, pero de manera transitoria (1 hora), desapareciendo rápidamente.

La toxicidad de la nigrina b a concentración subletal (10 mg/kg IP) se traduce en un acortamiento notable de los intestinos, que se recuperan perfectamente entre los 8 y los 22 días después de la administración de nigrina b. Resultados similares se obtuvieron en los dos intestinos, delgado y colon.

En todos los casos de administración de nigrina b se observó una reducción general en la ingestión de comida, que achacamos al efecto tóxico, muy probablemente doloroso, de la nigrina b en los ratones y ésta podría ser la causa de que dejaran de comer. Nos encontraríamos en el caso de una atrofia intestinal por ayuno, provocada indirectamente por la administración de nigrina b. Existen estudios en la bibliografía que indican que el ayuno de roedores implica un acortamiento intestinal atrófico (Chappell y cols., 2003). Al utilizar jaulas convencionales, en las que es muy difícil determinar la cantidad de pienso en forma de partículas pequeñas que cae de la rejilla que contiene los pellets de pienso, no pudimos determinar con precisión la reducción en la ingesta. Lo mismo sucedió con la formación de heces concomitante a la ingesta de pienso y a la destrucción del epitelio intestinal. El uso de jaulas metabólicas nos hubiese permitido determinar estos datos.

Las alteraciones inflamatorias de los intestinos se definen por un incremento en la actividad mieloperoxidasa, asociada a la infiltración de neutrófilos. Este incremento se ha caracterizado en distintos modelos

animales de la enfermedad inflamatoria intestinal (Gonzalez-Rey y cols., 2009). El producto químico (TNBS) provoca una fuerte irritación intestinal que desencadena cambios que se suponen parecidos a los que se experimentan en la colitis ulcerosa de la enfermedad de Crohn (Gonzalez-Rey y cols., 2009; Wirtz y cols., 2007).

Debido a los efectos de la nigrina b decidimos estudiar la actividad mieloperoxidasa a distintos tiempos después de la administración. Se observó un incremento máximo en intestino delgado a las 24-48 horas, con tendencia a disminuir en días posteriores. En el intestino grueso, sin embargo, se observó una variabilidad de difícil explicación, no detectada en el intestino delgado. Una explicación que podría hacer referencia a la flora microbiana del colon, que pasa de nutrirse de pienso a recibir restos tisulares del intestino delgado producidos por la administración de nigrina b. A los 22 días la recuperación es total.

Tomados en su conjunto, los datos sobre mieloperoxidasa y sobre los intestinos y su recuperación, apoyan el uso de la nigrina b como modelo de daño-regeneración intestinal.

El análisis de la toxicidad intraperitoneal de nigrina b revela que nuestras preparaciones son muy activas y producen un daño en los ratones, prácticamente idéntico al publicado previamente (Battelli y cols., 1997; Ferreras y cols., 2011). La administración de nigrina b a 16 mg/kg mata todos los ratones en 10 días, mientras que la administración de 10 mg/kg, a pesar de que produce cambios histológicos notables, no afecta la mortalidad de los animales al menos en los 22 días de estudio, lo que añade

valor a nuestra propuesta de utilización de nigrina b como nuevo modelo animal.

Como prueba del modelo se ha estudiado la absorción y acumulación en sangre de distintas sustancias, como fármacos y vitaminas (resultados no publicados del Prof. Girbés). En este trabajo se estudió el efecto de una mezcla de polifenoles en el modelo de nigrina b, en la creencia de que pudieran alterar el efecto destructivo de la lectina sobre el tubo digestivo. Los resultados indican claramente que la administración oral de grandes cantidades de Polyphenon E no provoca mortalidad en los ratones. En cambio, los polifenoles administrados a alta concentración por vía intraperitoneal matan a la mitad de los ratones en 5 días, de los 14 días de estudio. La administración conjunta de polifenoles (16-120 mg/kg) por vía oral a ratones inyectados intraperitonealmente con nigrina b (10-16 mg/kg) provoca un incremento notable de la toxicidad de la nigrina b, que se traduce en un aumento de la mortalidad (curvas Kaplan-Meier, apartado 4.3) y en un daño intestinal reversible caracterizado por la destrucción apoptótica de las criptas de Lieberkühn, y posterior destrucción de los *villi*.

El blanco de la nigrina b son precursores de proliferación del compartimento TAC, derivados directamente de la célula madre intestinal (Vries y cols., 2010). A dosis subletales la nigrina b no acaba con todas estas células y, por lo tanto, las criptas se regeneran. En nuestro estudio esta recuperación se produce ya a las 48 horas después del tratamiento, restaurándose prácticamente a las 72 horas.

Los polifenoles presentan propiedades proapoptóticas que se utilizan en la terapia coadyuvante del cáncer de colon y en obesidad. Se ha descrito que la adición conjunta de polifenoles y sulindac reduce la formación de *aberrant crypt foci* en roedores (Ohishi y cols., 2002), disminuyendo así la incidencia de tumores de colon. La ingestión oral de grandes cantidades de polifenoles no afecta a la mortalidad de los ratones, pero sí incrementa notablemente la de la nigrina b intraperitoneal y en particular a 10 mg/kg. Por lo tanto, el mecanismo, directa o indirectamente, está relacionado con la sensibilización de las células del TAC a nigrina b. Ello podría tener lugar bien por un incremento en los receptores celulares para nigrina b (glucoproteínas fundamentalmente; resultados no publicados del Prof. Girbés) o mediante la predisposición de procesos que conducen a la apoptosis. La primera posibilidad es difícil de asumir, por lo elevadas que son las concentraciones necesarias de nigrina b para exhibir efectos notables en la mortalidad. La segunda posibilidad parece más atractiva y estaría relacionada con el incremento de la secreción de citoquinas proinflamatorias y/o proapoptóticas en línea con estudios realizados con el modelo TNBS en ratones (González-Rey y cols., 2006; Wirtz y cols., 2007). Nosotros creemos que los polifenoles preparan la escena molecular para que la nigrina b ejerza sus efectos apoptóticos de manera más eficiente.

Los resultados de mortalidad obtenidos con la administración conjunta se reflejan en los estudios histológicos, en los que de hecho se observa una potenciación del daño celular, pero no sólo de intestinos sino que también en pulmón, hígado y riñón, órganos que aparecen congestionados e incluso hemorrágicos en los animales afectados. En el caso del daño hepático, los

resultados están en consonancia con los efectos adversos descritos asociados a la ingestión de cantidades elevadas de concentrados de polifenoles del té verde por humanos (Schöntal y cols., 2011).

A la dosis letal de 16 mg/kg (vía intraperitoneal) todos los ratones mueren en 10 días. Mientras que la administración conjunta de Polyphenon E por vía oral (16-120 mg/kg) con nigrina b a 16 mg/kg mata rápidamente a los ratones entre 3-7 días.

6. CONCLUSIONES.



1. El rendimiento en la preparación de nigrina b de corteza de saúco depende de factores estacionales y del grado de desarrollo de la planta así como del estado de la corteza secundaria.
2. La corteza desecada a temperatura ambiente retiene perfectamente la actividad de la nigrina b determinada tanto por capacidad hemoaglutinante como por la actividad tóxica *in vivo*.
3. La utilización de corteza desecada incrementa no solamente el rendimiento por reducción de la humedad del agua sino también por eficiencia del proceso que es ligeramente superior al doble del procedimiento tradicional que utiliza corteza húmeda congelada.
4. Las lectinas de corteza de *Sambucus nigra*, SNA I, nigrina b y SNA II, y de frutos, nigrina f y SNA IV, en su forma nativa, son resistentes a la degradación por pepsina ácida y por pancreatina lo que sugiere que pueden resistir el proceso de digestión, y por tanto el consumo de productos de saúco puede tener implicaciones alérgicas dada su relación en la secuencia de aminoácidos con el alérgeno Sam n1.
5. Las lectinas de corteza y de frutos de *Sambucus nigra*, desnaturalizadas por calor son extremadamente sensibles al tratamiento con pepsina ácida.
6. La administración intraperitoneal de dosis subletales de nigrina b a ratones, no produce mortalidad pero si alteraciones reversibles en el intestino delgado, provocando apoptosis en las células de las criptas de

Lieberkühn. En contraste la administración de dosis letales de nigrina b provoca la destrucción rápida e irreversible del intestino delgado.

7. La administración intraperitoneal de cantidades elevadas de una mezcla estandarizada de polifenoles del té verde concentrados (Polyphenon E) provoca unos efectos tóxicos que conduce a la muerte de la mitad de los ratones tratados. En contraste la administración oral de las mismas cantidades, no produce efecto tóxico aparente.
8. La administración simultánea de Polyphenon E oral potencia la toxicidad de nigrina b administrada intraperitonealmente a ratones, lo que se traduce en una mayor destrucción de las criptas de Lieberkühn, la congestión de riñón y pulmones, y hemorragias en el hígado de los ratones dañados.

7. REFERENCIAS.



Audi J., Belson M., Patel M., Schier J. y Osterloh, J., (2005) Ricin poisoning: a comprehensive. *JAMA* 294, 2342–2351.

Balentine D.A., Wiseman S.A. y Bouwens L.C., (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37(8):693-704.

Barbieri L., Brigotti M., Perocco P., Carnicelli D., Ciani M., Mercatali L. y Stirpe F., (2003) Ribosome-inactivating proteins depurinate poly(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.* 538:178-182.

Barbieri L., Gorini P., Valbonesi P., Castiglioni P. y Stirpe F., (1994) Unexpected activity of saporins. *Nature* 372: 624.

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

Barbieri L., Battelli M.G. y Stirpe F. (1993) Ribosome inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 237–282.

Barker N., van Es J.H., Kuipers J., Kujala P., van den Born M., Cozijnsen M., Haegebarth A., Korving J., Begthel H., Peters P.J. y Clevers H., (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003-1007.

Battelli M.G., Citores L., Buonamici L., Ferreras J.M., de Benito F.M., Stirpe F. y Girbés T. (1997) Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. *Arch. Toxicol.* 71(6):360-364.

Battelli M.G. (2004a) Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 513–521.

Battelli M.G., Musiani S., Buonamici L., Santi S., Riccio M., Maraldi N.M., Girbés T. y Stirpe F. (2004b) Interaction of volkensin with HeLa cells: binding, uptake, intracellular localization, degradation and exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1975–1984.

Battelli M.G., Polito L., Falà F., Musiani S., Tazzari P.L., Stirpe F. y Bolognesi A. (2005) Toxicity of xanthine oxidoreductase to malignant B lymphocytes. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 19(3-4):120-9.

Battle E., Henderson J.T., Beghtel H., van den Born M.M., Sancho E., Huls G., Meeldijk J., Robertson J., van de Wetering M., Pawson T. y Clevers H. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 111(2):251-63.

Bauer P., Lush C.W., Kvietys P.R., Russell J.M. y Granger D.N. (2000) Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278(5):R1140-1147.

Benítez J., Ferreras J.M., Muñoz R., Arias Y., Iglesias R., Córdoba-Díaz M., del Villar R. y Girbés T. (2005) Cytotoxicity of an ebulin I-anti-human CD105 immunotoxin on mouse fibroblasts (L929) and rat myoblasts (L6E9) cells expressing human CD105. *Med. Chem.*(1):65-70.

Benitez J., Rojo M.A., Muñoz R., Ferreras J.M., Jiménez P. y Girbés T.(2004) Design and cytotoxicity analysis of a conjugate containing the new D-galactose-binding lectin SELId and the non-toxic type 2 Ribosome-inactivating protein nigrin b. *Lett. Drug Des. Discov.* 1:35-44.

Bjerknes M. y Cheng H. (1981) The stem-cell zone of the small intestinal epithelium I to IV. *Am. J. Anat.* 160(1):93-103.

Bolognesi A., Polito L., Lubelli C., Barbieri L., Parente A. y Stirpe F. (2002) Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. *J. Biol. Chem.* 277: 13709-13716.

Bolognesi A., Polito L., Tazzari P.L., Lemoli R.M., Lubelli C., Fogli M., Boon L., De Boer M. y Stirpe F. (2000) In vitro anti-tumour activity of anti-CD80 and anti-CD86 immunotoxins containing type 1 ribosome-inactivating proteins. *Brit. J. Haematol.* 110, 351–361.

Campos E.C., Schiavi C., Bolognesi A., Bellusci C., Lubelli C., Duca A., Polito L., Poulas K., Tzartos S.J. y Stirpe F. (2002) Selective lesions of rabbit extraocular muscles injected with the anti-AChR immunotoxin saporin-mAb 73. *Curr. Eye Res.* 24, 58–65.

Chappell V.L., Thompson M.D., Jeschke M.G., Chung D.H., Thompson J.C. y Wolf S.E.(2003) Effects of incremental starvation on gut mucosa. *Dig. Dis. Sci.* 48(4), 765-9.

Cheng H. y Leblond C.P. (1974) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* 141(4):537-61.

Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Argüeso P., Jiménez P., Méndez E. y Girbés T. (1998) Presence of polymerized and free forms of the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein ebulin and a structurally related new homodimeric lectin in fruits of *Sambucus ebulus* L. *Planta.* 204(3):310-9.

Citores L., Ferreras J.M., Muñoz R., Benítez J., Jiménez P. y Girbés T. (2002) Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin I. *Cancer Lett.* 184(1):29-35.

- Citores L., Rojo M.A., Jiménez P., Ferreras J.M., Iglesias R., Aranguéz I. y Girbés T. (2008) Transient occurrence of an ebulin-related D-galactose-lectin in shoots of *Sambucus ebulus* L. *Phytochemistry*.69(4):857-864.
- Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Jimenez P., Argueso P., Farias G., Méndez E. y Girbés T. (1996) Isolation and characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein from fruits of elder (*Sambucus nigra* L.) *J. Exp. Bot.* 47:1577-1585.
- Clevers H. (2006) Wnt/ beta-catenin signalling in development and disease. *Cell*. 127,469-480.
- Day P.J., Lord J.M., y Roberts L.M., (1998) The deoxyribonuclease activity attributed to ribosome-inactivating proteins is due to contamination. *Eur. J. Biochem.* 258:540-545.
- Day P.J., Pinheiro T.J., Roberts L.M. y Lord J.M. (2002) Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. *Biochemistry* 41:2836-2843.
- de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Citores L., Camafeita E., Méndez E. y Girbés T. (1998) Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.) *FEBS Lett.* 428:75-79.
- Duff S.E., Li C., Garland J.M. and Kumar S. (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17(9):984-992.
- Endo Y., Mitsui K., Motizuki M. y Tsurugi K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosome. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* 262:5908-5912.
- Endo Y. y Wool I.G., (1982) The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 257:9054-9060.
- Fando J.L., Alaba I., Escarmis C., Fernandez-Luna J.L., Méndez E. y Salinas M. (1985) The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *Eur. J. Biochem.* 149:29-34.
- Ferrari C., Barbieri L., y Stirpe F., (1991) Effects of plant ribosome-inactivating proteins on ribosomes from *Musca domestica*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 100:223-227.

Ferreras J.M., Citores L., de Benito F.M., Arias F.J., Rojo M.A., Muñoz R., Iglesias R. y Girbés T. (2000) Ribosome-inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. *Current Topics in Phytochemistry*. 3:113-127.

Ferreras J.M., Citores L., Iglesias R., Jiménez P. y Girbés T. (2010) Sambucus Ribosome-Inactivating Proteins and Lectins. *En. Toxic Plant Proteins*. 107-131 *Serie: Plant Cell Monographs*. Springer-Verlag, Heidelberg.

Ferreras J.M., Citores L., Iglesias R., Jiménez P., y Girbés T. (2011) Use of ribosome-inactivating proteins from sambucus for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins (Basel)*.3(5), 420-41.

Ferreras J.M., Barbieri L., Girbés T., Battelli M.G., Rojo M.A., Arias F.J., Rocher M.A., Soriano F., Mendéz E. y Stirpe, F. (1993) Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis*, L. (Caryophyllaceae). *Biochim. Biophys. Acta*. 1216,31-42.

Fonsatti E., Jekunen A.P., Kairemo K.J., Coral S., Snellman M., Nicotra M.R., Natali P.G., Altomonte M. y Maio M. (2000) Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin. Cancer Res*. 6(5):2037-2043.

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

Förster-Waldl E., Marchetti M., Schöll I., Focke M., Radauer C., y cols. (2003) Type I allergy to elderberry (*Sambucus nigra*) is elicited by a 33.2 kDa allergen with significant homology to ribosomal inactivating proteins. *Clin. Exp. Allergy*. 33,1703-1710.

Frankel A.E., Neville D.M., Bugge T.A., Kreitman R.J. y Leppla S.H. (2003) Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. *Semin. Oncol*. 30,545-557.

Fu T.J., Abbot U.R., y Hatzos C., (2002) Digestibility of Food Allergens and Nonallergenic Proteins in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid –A comparative study. *J. Agric. Food Chem*. 50,7154-7160.

Gayoso M.J., Muñoz R., Arias Y., Villar R., Rojo M.A., Jiménez P., Ferreras J.M., Aranguez I. y Girbés T. (2005) Specific dose-dependent damage of Lieberkühn crypts promoted by large doses of type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b intravenous injection to mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 207(2):138-146.

Girbés T. (2004a) Nigrina b: una proteína inactivadora de ribosomas no tóxica del saúco. Utilidad farmacéutica en la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia del cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm*.70:73-94.

- Girbés T., Barbieri L., Ferreras J.M., Arias F.J., Rojo M.A., Iglesias R., Alegre C., Escarmis C. y Stirpe F. (1993a) Effects of ribosome-inactivating proteins on *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* translation systems. *J. Bacteriol.* 175:6721.
- Girbés T., Citores L., Ferreas J.M., Rojo M.A., Iglesias R., Muñoz R., Arias F.J., Calonge M., García J.R. y Méndez E., (1993b) Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol. Biol.* 22:1181-1186.
- Girbés T., Citores L., Iglesias R., Ferreas J.M., Muñoz R., Rojo M.A., Arias F.J., García J.R., Méndez E. y Calonge M., (1993c) Ebulin 1, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J. Biol. Chem.* 268:18195-18199.
- Girbés T., de Torre C., Iglesias R., Ferreras J.M. y Méndez E., (1996) RIP for viruses. *Nature.* 379:777-778.
- Girbés T., Ferreras J.M., Arias J.A. y Stirpe F. (2004b) Description, Distribution, Activity and Phylogenetic Relationship of Ribosome-Inactivating Proteins in Plants, Fungi and Bacteria. *Mini-Ref.s in Medicinal Chemistry.* 4:461-476.
- Girbes T., Vazquez D. y Modolell J. (1976) Polypeptide-chain elongation promoted by guanyl-5'-yl imidodiphosphate. *European Journal of Biochemistry.* 67:257-265.
- Go T.T., Yeung H.W. y Fong W.P. (1992) Deoxyribonucleolytic activity of alpha- and beta-momorcharins. *Life Sci.* 51:1347-1353.
- González-Rey E., Fernández-Martín A., Chorny A. y Delgado M. (2006) Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut.* 55, 824-832.
- Graham H.N. (1992) Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21(3),334-350.
- Harlow E. y Lane D. (1988) Antibodies. *Cold Spring Harbor.* New York.
- Hartley M.R., Chaddock J.A. y Bonness M.S. (1996) The structure and function of ribosome-inactivating proteins. *Trends Plant Sci.* 1,254-260.
- Heath J.P. (1996) Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol. Int.* 20(2):139-46.
- Hossann M., Li Z., Shi Y., Kreilinger U., Buttner J., Vogel P.D., Yuan J., Wise J.G. y Trommer W.E. (2006) Novel immunotoxin: a fusion protein consisting of gelonin and an acetylcholine receptor fragment as a potential immunotherapeutic agent for the treatment of myasthenia gravis. *Protein Expr. Purif.* 46, 73-84.

- Hou Z., Sang S., You H., Lee M.J., Hong J., Chin K.V. y Yang C.S. (2005) Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res.* 65(17),8049-56.
- Hursel R., Viechtbauer W. y Westerterp-Plantenga M.S. (2009) The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *Int. J. Obes. (Lond).* 33(9):956-61.
- Iglesias R., Citores L., Ferreras J.M., Pérez Y., Jiménez P., Gayoso M.J., Olsnes S., Tamburino R., Di Maro A., Parente A. y Girbés T. (2010) Sialic acid-binding dwarf elder four-chain lectin displays nucleic acid N-glycosidase activity. *Biochimie.* 92(1):71-80.
- Iglesias R., Arias F.J., Rojo M.A., Escarmis C., Ferreras J.M. y Girbés T. (1993a) Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Lett.* 325:291-294.
- Iglesias R., Escarmis C., Alegre C., Ferreras J.M. y Girbés T. (1993b) Fusidic acid-dependent ribosomal complexes protect *Escherichia coli* ribosomes from the action of the type 1 ribosome-inactivating protein crotin 2. *FEBS Letters.* 318:189-192.
- Jain R.K. (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.* 271(1):58-65.
- Kaczanowska M. y Rydén-Aulin M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 71:477-94.
- Kalb V.F. Jr. y Bernlohr R.W. (1977) A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Analytical Biochemistry.* 82:362-371.
- Kanwar J., Taskeen M., Mohammad I., Huo C., Chan T.H. y Dou Q.P. (2012) Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci. (Elite Ed).* 4:111-31.
- Karpova I.S., Koretska N.V., Palchikovska L.G. y Negrutskaya V.V., (2007) Lectins from *Sambucus nigra* L. inflorescences: isolation and investigation of biological activity using prokaryotic test-system. *Ukr Biokhim Zh.* 79:145-152.
- Koppelman S.J., Hefle S.L., Taylor S.L. y de Jong A.H. (2010) Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, y Ara h 6: A comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Mol. Nutr. Food Res.* 54,1-11.
- Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P.J. y Clevers H. (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* 19(4):379-83.
- Kreitman R.J. (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 11(5):570-578.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

Lavelle E.C., Grant G., Pfüller U., Girbés T., Jiménez P., Pusztai A., Leavy O., Mills K.H.G. y O'Hagan D.T. (2000) Mistletoe lectins are strong mucosal adjuvants. *Immunology*. 101,32.

Lee-Huang S., Huang P.L., Kung H.F., Li B.Q., Huang P.L., Huang P., Huang H.I. y Chen H.C. (1991) TAP 29: an anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6570-6574.

Lin Y.S., Tsai Y.J., Tsay J.S., y Lin J.K., (2003) Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J. agric. Food Chem.* 51,1864-1873.

Lombard S., Helmy M.E. y Pieroni G., (2001) Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *J. Biochem.* 358:773-781.

Lord M.J., Jolliffe N.A., Marsden C.J., Pateman C.S., Smith D.C., Spooner R.A., Watson P.D. y Roberts L.M. (2003) Ricin: mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol. Rev.* 22,53-64.

McGrath M.S., Hwang K.M., Caldwell S.E., Gaston I., Luk K.C., Wu P., Ng V.L., Crowe S., Daniels J., Marsh J., Deihart T., Lekas P.U., Uennaari J.C., Yeung H.W. y Lifson J.F. (1989) GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,2844-2848.

Modolell J, Girbés T y Vázquez D. (1975) Ribosomal translocation promoted by guanylylimido-diphosphate and guanylyl-methylene diphosphonate. *FEBS Letters*. 60:109-113.

Montfort W., Villafranca J.E., Monzingo A.F., Ernst S.R., Katzin B., Rutenber E., Xuong N.H., Hamlin R. y Robertus J.D. (1987) Three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. *J. Biol. Chem.* 262,5398-5403.

Moore R.J, Jackson, K.G. y Minihane, A.M. (2009) Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *Br. J. Nutr.* 102,1790-1802.

Muñoz R., Arias Y., Ferreras J. M., Jiménez P., Rojo M.A., Bernadéu C., Córdoba-Díaz D. y Girbés T. (2012) Transient injury-dependent up-regulation of CD105 and its specific targeting with an anti-vascular anti-mouse endoglin-nigrin b immuno-toxin. *Med. Chem.* 8(6).

Muñoz R., Arias Y., Ferreras J.M., Jiménez P., Rojo M.A. y Girbés T. (2001) Sensitivity of cancer cell lines to the novel non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett.* 167(2):163-169.

- Muñoz R., Arias Y., Ferreras J.M., Rojo M.A., Gayoso M.J., Nocito M., Benitez J., Jiménez P., Bernabéu C. y Girbés T. (2007) Targeting a marker of the tumour neovasculature using a novel anti-human CD105-immunotoxin containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett.* 256(1):73-80.
- Murayama T., Zuber C., Seelentag W.K., Li W.P., Kemmner W., Heitz P.U. y Roth J. (1997) Colon carcinoma glycoproteins carrying alpha 2,6-linked sialic acid reactive with Sambucus nigra agglutinin are not constitutively expressed in normal human colon mucosa and are distinct from sialyl-Tn antigen. *Int. J. Cancer.* 70(5):575-581.
- Nicolas E., Beggs J.M., Haltiwanger B.M., y Taraschi T.F., (1998) A new class of DNA glycosylase/apurinic/aprimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 273:17216-17220.
- Nielsen. K. y Boston R.S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 785–816.
- Ohishi T., Kishimoto Y., Miura N., Shiota G., Kohri T., Hara Y., Hasegawa J. y Isemura M. (2002) Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with sulindac against colon carcinogenesis of rats treated with azoxymethane. *Cancer Lett.* 177(1),49-56.
- Parikh B.A. y Tumer N.E. (2004) Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev. Med. Chem.* 4,523–543.
- Park S.W., Stevens N.M. y Vivanco J.M. (2002) Enzymatic specificity of three ribosome-inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with antifungal activity. *Planta.* 216:227-234.
- Pascal J.M., Day P.J., Monzingo A.F., Ernst S.R., Robertus J.D., Iglesias R., Pérez Y., Ferreras J.M., Citores L. y Girbés T. (2001) 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins.*43(3):319-326.
- Pelosi E., Lubelli C., Polito L., Barbieri B., Bolognesi A. y Stirpe F. (2005) Ribosome-inactivating proteins and other lectins from *Adenia* (Passifloraceae). *Toxicon* 46,658–663.
- Peumans W.J., Qiang H. y Van Damme J.M. (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *The FASEB journal.* Vol. 15:1493-1506.
- Phung O.J., Baker W.L., Matthews L.J., Lanosa M., Thorne A. and Coleman C.I. (2010) Effect of green tea catechins with or without caffeine on anthropometric measures: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*91(1):73-81.

Reinbothe S., Reinbothe C., Lehmann J., Becker W., Apel K. y Parthier B. (1994) JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7012–7016.

Rojo M.A., Citores L., Arias F.J., Ferreras J.M., Jimenez P. y Girbés T. (2003) cDNA molecular cloning and seasonal accumulation of an ebulin I-related dimeric lectin of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L) leaves. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35(7):1061-1065.

Rojo M.A., Yato M., Ishii-Minami N., Minami E., Kaku H., Citores L., Girbés T. y Shibuya N. (1997) Isolation, cDNA cloning, biological properties, and carbohydrate binding specificity of sieboldin-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of Japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). *Arch. Biochem. Biophys.* 340(2):185-194.

Sangiorgi E. y Capecchi M.R. (2008) Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet.* 40(7):915-20.

Schöntal A.H. (2011) Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Mol. Nutr. Food Res.* 55,874-885.

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

Shimizu M., Adachi S., Masuda M., Kozawa O. y Moriwaki H. (2011) Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res.* 55(6),832-43.

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

Stirpe F., Barbieri L., Gorini P., Valbonesi P., Bolognesi A. y Polito L., (1996) Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS lett.* 382:309.

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

Sturgeon J.L., Williams M. y van Servellen G. (2009) Efficacy of green tea in the prevention of cancers. *Nurs. Health Sci.* 11,436-446.

Szalai K., Schöll I., Förster-Waldl E., Polito L., Bolognesi A., Untersmayr E., Riemer A.B., Boltz-Nitulescu G., Stirpe F. y Jensen-Jarolim E. (2005) Occupational sensitization to ribosome-inactivating proteins (RIPs) in researchers. *Clin. Exp. Allergy* 35, 1354–1360.

Tomatsu M., Kondo T., Yoshikawa T., Komeno T., Adachi N., Kawasaki Y., Ikuta A. y Tashiro F. (2004) An apoptotic inducer, aralin, is a novel type II ribosome-inactivating protein from *Aralia elata*. *Biol Chem.* 385(9):819-27.

Van Damme EJ, Barre A, Rougé P, Van Leuven F y Peumans WJ. (1996) Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrin b), a GalNAc-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). *Eur J Biochem.* 237(2), 505-13.

Vanaclocha B y Cañigüeral S. (Eds). *Fitoterapia, Vademécum de Prescripción*, 4ª edición. Barcelona: Masson, 2003.

Vries R.G.J., Huch M. y Clevers H. (2010) Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Molecular Oncology* 4,273-384.

Wang P. y Tumer N.E. (2000) Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv. Virus Res.* 55,325–355.

Wilson D.N. y Nierhaus K.H. (2006) The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis. *Cellular and Molecular Life Science.* 63:2725-37.

Wirtz S., Neufert C., Weigmann B. y Neurath M.F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc.* 2(3),541-6.

Wolfram S., Wang Y. y Thielecke F. (2006) Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res.* 50(2):176-87.

Wu W. y Sun R., (2012) Toxicological studies on plant proteins: a review. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 377–386

Xia Y. y Zweier J.L. (1997) Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. *Anal. Biochem.* 245(1):93-96.

Yeung H.W., Li W.W., Feng Z., Barbieri L. y Stirpe F. (1988) Trichosanthin, alpha-momorcharin and beta-momorcharin: identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* 31,265–268.

Youngman E.M. y Green R. (2007) Ribosomal translocation: LepA does it backwards. *Current Biology.* 17:R136-139.

Zhang Q., Fu H., Pan J., He J., y cols. (2010) Effect of dietary Polyphenon E and EGCG on lung tumorigenesis in A/J mice. *Pharm. Res.* 27,1066-1071.

Zhu L., Gibson P., Currel D.S., Tong Y., Richardson R.J., Bayazitov I.T., Poppleton H., Zakharenko S., Ellison D.W. y Gilbertson R.J. (2009) Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature.* 457(7229):603-7.

Zúñiga J.M., Orellana J.M., Tur J.A. (2008) Ciencia y Tecnología del animal de laboratorio. Editado por: *UAH* y *SECAL*. ISBN: 978-84-8138-783-4.