



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

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

TESIS DOCTORAL:

**“Caracterización químico-física y toxicológica
de las lectinas antinutricionales ebulina f y
SELfd de frutos de *Sambucus ebulus* L.”**

Presentada por *Jesús Tejero del Río* para optar al grado de
doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por: D. Tomás Girbés Juan, Dña. Pilar Jiménez López y
D. Salvador Hernández Navarro.

1. INTRODUCCIÓN.

1. Introducción.

Los humanos desde el principio de los tiempos empleamos las plantas como alimento y medicina. Su consumo nos aporta sustancias que aprovechamos como nutrientes, como reguladores biológicos de nuestro organismo y otras presentan un marcado carácter antinutriente que las hace tóxicas o incluso mortales. Dentro de las sustancias antinutrientes encontramos varios grupos químicos, polienos, terpenos, glucósidos cianogénicos, compuestos policíclicos, ácidos, alcaloides, etc., algunos con gran poder tóxico.

Un grupo de estas sustancias antinutrientes que se encuentran en las plantas lo constituyen una serie de proteínas que expresan una gran afinidad por los azúcares. Estas proteínas se unen a todo tipo de azúcares, a los sencillos y a los polisacáridos complejos que forman las estructuras biológicas. En conjunto a estas proteínas se las denomina lectinas y presentan diversos tipos de afinidad específica por el azúcar.

Dentro de las lectinas hay un grupo muy importante que son las que poseen actividad enzimática, las denominadas lectinas antirribosómicas, que forman un tipo especial de las denominadas RIPs. Su importancia radica en su interacción por afinidad con los polisacáridos que conforman los receptores glicoproteicos y glicolipídicos de la superficie celular de las células del epitelio del intestino pudiendo modificar su comportamiento funcional y provocar problemas toxicológicos y nutricionales.

1.1. Breve reseña del saúco negro (*Sambucus nigra* L.) y del yezgo (*Sambucus ebulus* L.)

Las plantas de saúco son conocidas por los humanos desde los tiempos del Neolítico. Se recolectaban sus frutos, hojas, corteza y rizomas para ser consumidos como alimento o empleados en la preparación de compuestos medicinales. Como alimento se consumen principalmente los frutos que son una reserva de compuestos de gran interés nutricional, sustancias bioactivas como compuestos fenólicos, flavonoides y vitamina C (Verberic y cols., 2009; Kaak y Austed, 1998).

En la cuenca mediterránea europea se han estudiado diversos yacimientos arqueológicos en el sur de Francia y el norte de Italia (Martín y cols., 2008; Rottoli y Castiglioni, 2009) que datan de hasta unos 6.000 años, en donde se han encontrado restos saúco negro (*Sambucus nigra* L.) y de saúco enano o yezgo (*Sambucus ebulus* L.) que demuestran su conocimiento y recolección. Hipócrates y Dioscórides describen en sus tratados al saúco como una importante planta de uso medicinal. Los dacios y los romanos utilizaban sus remedios contra la hidropesía, la gota, las mordeduras de serpiente y como purgante.

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

En 1651 el doctor alemán Blockwich publicó “Anatomia Sambuci”, tratado escrito en latín en donde se recoge una serie de hasta 70

enfermedades que pueden ser tratadas con remedios preparados a base de saúco. Este tratado será traducido al inglés y publicado en Londres en 1655. En esta misma época el doctor Culpeper en Inglaterra hacía referencia al saúco como “la medicina del tórax de la medicina popular”.

1.1.1. Botánica.

La familia *Sambucaceae* a la pertenecen las diversas variedades de saúco, contiene al menos 40 especies diferentes, constituidas principalmente por arbustos de porte medio que pueden desarrollar y llegar a mayores portes cuando las condiciones de clima y suelo lo permiten. Estas especies se desarrollan generalmente en climas templados y tropicales en su mayoría pero una parte de estas especies necesitan climas más continentales y altitudes mayores para su desarrollo. Su distribución geográfica global muestra zonas en las cuales no se tiene conocimiento de su presencia natural como en la India, península Arábiga, en la Amazonía y en múltiples zonas del Pacífico y Oceanía. En África se sabe de una especie endémica de las montañas del este.

El saúco negro o común, *Sambucus nigra* L. es la especie que más se ha desarrollado y estudiado ya que su consumo es mayor en alimentación y medicina. Es un arbusto leñoso de 3 a 5 m de porte que en ocasiones puede alcanzar lo 8 m de altura. De corteza es suberosa sus hojas son caducas, pecioladas, opuestas, compuestas de 2-4 pares e folíolos peciolados, puntiagudos, dentados y lisos, de color verde oscuro en el haz y más claro con vello en el envés. Sus flores son blancas y pequeñas, pedunculadas muy abundantes y formando umbrelas terminales. Su floración se produce al final de la primavera. Sus frutos son bayas carnosas de aspecto globoso y de color azul-negro (color vino oscuro) que se encuentran reunidas en ramilletes.

El saúco enano o yezgo, *Sambucus ebulus* L. es un arbusto talmente, su porte es menor llegando a 2 m de altura, su base vegetativa es un rizoma reptante que permanece enterrado en el terreno y que rebrota en los meses de Abril-Mayo dependiendo del clima de la estación y florece al inicio del verano. El hábitat propio de del saúco son las zonas de clima templado y húmedo, cercanos a los ríos con suelos frescos y húmedos, en hondonadas y sotos. El libro “Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado” obra de Pío Font Quer, describe la botánica, composición y uso tanto del saúco negro como del saúco enano.

En las figura 1 se presentan fotografías de *Sambucus ebulus* L. En diversos estados vegetativos, floración, con frutos verde y maduros.

1.1.2. Fitoquímica.

Lo que sabemos de la composición química del saúco y que conocemos por algunos trabajos realizados nos ha permitido identificar multiples compuestos químicos de importancia y algunos de aplicación farmacológica. En su descripción sin poder ser muy exhaustiva encontramos pigmentos antociánicos en los que se incluirían: cianidin-3,5-diglucósido, cianidin-3-glucósido, cianidin-3-glucosa, cianidin-3-sambubiósido y cianidin-3-sambubiósido-5-glucósido (Timberlake y Bridle, 1977; Bridle y Garcia-Viguera, 1997). Se encuentran también compuestos volátiles más comunes: damascenona, fenilacetaldehido, 2-feniletanol, metil-n-undecanoato, etil-5-decanoato, metil-n-dodecanoato, vainillina, hexanal, hexanol y hexenol, y terpenos como linalool y citral.

A**B****C****D****E****F**

Figura 1. Planta con rizoma (A), planta pequeña (B), flor (C) macizo de flores (D), frutos verdes (E) y maduros F) de *Sambucus ebulus* L. Muestras recogidas en Barruelo del Valle (Valladolid) en el mes de julio los frutos verdes y en agosto los frutos maduros.

Posee el saúco también una serie de proteínas características de las plantas entre las que se encuentran proteínas estructurales, funcionales e incluso algunas enzimáticas que han sido estudiadas particularmente por su interés para aplicaciones en la biomedicina, son las lectinas y las proteínas inactivadoras de ribosomas de las que se hablaremos en apartados posteriores.

1.2. Aplicaciones actuales más frecuentes del saúco.

Las aplicaciones actuales del saúco son un compendio testado de los usos culturales y científicos que ha tenido el saúco durante los últimos 6.000 años. Las aplicaciones recogidas en el vademécum de prescripción de plantas medicinales (Vanaclocha y Cañigual, 2003), están basadas en principios farmacológicos atribuidos a las diversas partes del saúco empleadas en su preparación. Con las flores son de interés las preparaciones de acción diaforética, diurética, demulcentes, venotónicas, antirreumáticas y galactogénicas. Con los frutos y la corteza las acciones purgantes y antirreumáticas. Actualmente sus indicaciones por vía interna son resfriados, gripe, bronquitis, reumatismo, gota, oliguria, urolitiasis, cistitis y estreñimiento. Se emplea por vía externa para conjuntivitis, faringitis, vaginitis, dermatosis, heridas, quemaduras, neuralgias, forúnculos y urticaria.

Las flores y los frutos son las partes más empleadas del saúco comun para uso en la preparación de formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de algunas dolencias (Krawitz y cols., 2011; Vlachojannis y cols., 2010). Los frutos en combinación con otras bayas del bosque son consumidos como suplemento alimenticio dado su carácter antioxidante y diurético (Walz y Chrubasik, 2008). El carácter altamente antioxidante de

los frutos puede ser el motivo de su empleo en la formulación de dietas contra el sobrepeso y la obesidad (Chrubasik y cols., 2008; Hasani-Ranjbar y cols., 2009), también en su empleo en la fabricación de vino (Schmitzer y cols., 2010). En estos consumos alimentarios de lo frutos es necesario tener presente a las lectinas que describiran en un apartado posterior, para evaluar el posible desarrollo de alergias.

Recientemente se ha descrito como en los extractos crudos de flores de saúco hay sustancias que actiban eficazmente el receptor nuclear PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) que estimula la captación de glucosa dependiente de la insulina, esto abre la posibilidad de su utilización en la prevención y el tratamiento de la resitancia a la insulina (Christensen y cols., 2010).

Las hojas y el liber tienen un importante efecto purgante, que como comprobaremos en el desarrollo de este trabajo, puede tener su origen en la presencia de fitoaglutininas, lectinas con actividad inactivadora de ribosomas, que a concentraciones altas produce efectos tóxicos específicos en el epitelio intestinal (Gayoso y cols., 2005).

En otro ámbito, los saúcos, tanto *Sambucus ebulus* L. como *Sambucus nigra* L. tradicionalmente se han utilizado como insecticidas.

1.3. Toxicidad del saúco.

El saúco se ha empleado como planta medicinal desde muy antiguo, conociéndose que el consumo directo de frutos verdes, corteza o brotes de hojas produce náuseas y vómitos cuya gravedad depende del grado de madurez de los frutos (Font-Quer, 1999). Los efectos pueden ser tan graves

que incluso pueden provocar intoxicaciones gastrointestinales serias similares a las provocadas por la ingesta de frutos de *Ricinus communis* (Fitoterapia: Vademécum de Prescripción, 1994), causada por la presencia de ricina, una proteína muy tóxica (Olsnes, 2004). Similares efectos gastrointestinales produce la ingestión de corteza o de brotes de hojas de saúco que tienen una fuerte carácter purgante (Olsnes y Phil, 1982).

El tratamiento térmico por decocción de los frutos, la corteza o los brotes de hojas de saúco, elimina la toxicidad (Font-Quer, 1999). Este tipo de efectos hacen pensar que esta toxicidad está relacionada con sustancias termolábiles que son más abundantes en los frutos verdes y la corteza. Se piensa que pueden ser proteínas, aunque no se descartan sustancias orgánicas con bajo peso molecular como las sustancias cianogénicas que pueden liberar ácido cianhídrico al hidrolizarse, aunque no sea suficiente para explicar la intoxicación por cianhídrico ni la baja concentración, ni los síntomas de intoxicación. Por otra parte los efectos tóxicos causados por la ingesta de frutos verdes, corteza y brotes de hoja a nivel intestinal ya descritos, nauseas, vómitos, dolor intestinal, hemorragias intestinales, etc., (Vanaclocha y Cañigueral, 2003), coinciden con los resultados obtenidos por la acción de dos lectinas con actividad antirribosómica, nigrina y ebulina, al ser administradas por vía intravenosa a alta concentración a ratones.

1.3. Lectinas (fitohemaglutininas) del saúco.

De las diversas especies del género *Sambucus* se han aislado un número importante de lectinas o fitohemaglutininas como actualmente se las tiende denominar, algunas poseen actividad antirribosómica y otras no. En su mayor parte son isoformas parecidas que tan solo difieren en unos pocos aminoácidos, que sin embargo producen variaciones en la actividad

enzimática que en algunos casos es importante. En otros casos son proteínas prácticamente idénticas.

1.3.1. Lectinas antirribosómicas.

En la tabla 2 se muestran todas las lectinas con actividad antirribosómica descubiertas hasta la fecha. La letra que acompaña al nombre hace referencia a la parte de la planta de donde se aísla la proteína.

Tabla 2. Lectinas antirribosómicas de *Sambucus*.

Especie	Tejido	Proteína	Mr aparente	
			Cadena A	Cadena B
<i>S. ebulus</i>	Hojas	ebulin l	26000	30000
	Frutos	ebulin f	26000	30000
	Rizomas	SEA I	67000	67000
	Rizomas	ebulin r1	26000	30000
	Rizomas	ebulin r2	26000	30000
<i>S. mexicana</i>	Corteza	mexin	25000	34000
<i>S. nigra</i>	Corteza	nigrin b	26000	32000
	Corteza	nigrin bb	32000	32000
	Corteza	SNAI 2A-2B	35000	35000
	Corteza	SNAI' 2A-2B	32000	35000
	Corteza	SNLRP1	32000	32000
	Corteza	SNLRP2	32000	32000
	Hojas	nigrin l1	26000	34000
	Hojas	nigrin l2	26000	34000
	Frutos	nigrin f	26300	31600
	Semillas	nigrin s	26300	31000
	<i>S. racemosa</i>	Corteza	racemosin	26000
<i>S. sieboldiana</i>	Corteza	sieboldin b	27000	33000
	Corteza	SSA 2A-2B	32000	34000

Las lectinas antirribosómicas son del tipo dimérico A-B excepto SNA I, SNA I' y SSA que están formadas por tetrámeros del tipo 2A-2B. La

unión entre las cadenas A y B se realiza mediante puentes disulfuro intercatenarios.

La nigrina y la ebulina fueron las primeras lectinas antirribosómicas que se aislaron en la familia *Sambucaceae* (Girbés y cols., 1993b). Se buscaba definir el patrón de lectinas de *S. nigra*, que en aquel momento contaba con la descripción de cuatro lectinas diferentes, las denominadas SNA I (*Sambucus nigra* agglutinin I), SNA II, SNA III y SNA IV (Barbieri y cols., 1993), y en el *S. ebulus* solo se conocía una la SEA aislada de la corteza. Lo que se conocía de ellas era su poder aglutinador de los glóbulos rojos de la sangre y que podían producir intoxicaciones graves en caso de ingerir alguna parte de la planta en ciertas condiciones.

Las lectinas antirribosómicas pertenecen a la categoría de proteínas inactivadoras de ribosomas, denominadas también RIPs de “Ribosome Inactivating Proteins”, son proteínas que en su mayor parte son de origen vegetal aunque existen algunas excepciones de origen bacteriano y algas, que presentan la propiedad de fijar azúcares sencillos y complejos, y además provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas que realizan los ribosomas de los mamíferos, los hongos, algunas plantas y bacterias (Barbieri y col., 1993; Girbés y col., 2004; Nielsen y Boston, 2001). Al ser lectinas se pueden denominar también lectinas inactivadoras de ribosomas (RILs: ribosome-inactivating lectins)

La clasificación actual de las RIPs las divide en dos categorías, las de tipo 1 y las de tipo 2 (Girbés y col., 2004). Las de tipo 1 de origen vegetal y bacteriano están formadas por una única cadena polipeptídica que es la que presenta la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas. Las de tipo 2

presentan dos cadenas polipeptídicas diferentes, una denominada cadena A que presenta la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas y que es equivalente a la cadena única de las RIPs de tipo 1, y una segunda cadena denominada B que tiene propiedades de lectina. Las RIPs de tipo 2 pueden también estar formadas por dímeros unidos por fuerzas no covalentes, donde cada dímero es una molécula de dos cadenas polipeptídicas, equivalente cada una a una RIP de tipo 1.

Las RIPs de tipo 2 tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares debido a que reconocen y pueden unirse a los receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol (Girbés y col., 2004), lo que hace que algunas de ellas como ricina, abrina, volkensina, viscumina y modeccina sean extremadamente tóxicas. Otras en cambio pueden ser mucho menos tóxicas que la ricina, como la ebulina y la nigrina (Girbés y cols., 2004), y por eso se las ha conocido como no-tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones de ensayo. Las RIPs de tipo 1 no reconocen a los receptores de membrana plasmática por lo que no pueden utilizarlos para atravesar la membrana y esto hace que sean menos tóxicas que las de tipo 2, a excepción de los macrófagos mencionada antes (Barbieri y cols., 1993).

La ricina se descubrió en 1888 por Stillmark (Olsnes, 2004) pero no ha sido hasta 1987 cuando se ha descrito el mecanismo molecular mediante el cual la ricina y otras RIPs hacen su efecto en el ribosoma de las células. El efecto de las RIPs es actuar como N-glicosidasas sobre el ARN mayor de los ribosomas de los mamíferos, y en algunos caso también de plantas, bacterias y hongos (Barbieri y cols., 1993; Girbés y cols., 2004).

1.4.1.1. Toxicidad *in vitro* en células.

La ebulina y la ricina forman una familia de proteínas muy parecidas a la ricina pero cuya toxicidad *in vivo* es 1.000-5.000 veces menor. La ebulina I (isoforma aislada de las hojas) inhibe la biosíntesis de proteínas llevada a cabo en lisados de reticulocitos de conejo con una IC₅₀ de 0,15 nM, valor muy cercano al de la ricina en las mismas condiciones (IC₅₀ de 0,1 nM). Ebulina I inhibe también otros sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de las lectinas antirribosómicas de *S. ebulus* L. sobre los sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas de mamíferos y plantas (Ferrerías y cols. , 2000).

Proteína	Reticulocitos de conejo	Hígado de rata	Cerebro de rata	<i>Vicia sativa</i>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Triticum aestivum</i>
ebulina I	0.15	0.28	0.09	>1786	>1786	>1786
ebulina f	0.03	0.15	0.06	>1786	>1786	>1786
ebulina r1	0.05	0.34	0.32	>893	>893	>893
ebulina r2	0.04	0.34	0.30	>893	>893	>893

La ebulina está compuesta por una cadena A (26 kD), que presenta la actividad enzimática responsable de la inhibición de la biosíntesis de proteínas y una cadena B (30 kD responsable de la actividad lectina, que a 51 µg/ml es capaz de aglutinar completamente eritrocitos humanos. La cadena A es similar a las RIPs monocatenarias de la familia *Cucurbitaceae*, mientras que la cadena B posee homología secuencial con la cadena B de la ricina y las lectinas no antirribosómicas de *Sambucus*.

La isoforma ebulina f se aísla de frutos verdes de *S. ebulus*, aunque no se encuentra en los frutos maduros y es algo más activa sobre los ribosomas de lisados de reticulocito de conejo que la ebulina l y también más tóxica en células HeLa (Citores y cols., 1998).

1.4.1.2. Toxicidad *in vivo* en ratones.

Una de las mayores diferencias entre la familia de las lectinas antirribosómicas del saúco y la ricina es la baja toxicidad que tienen sobre células animales en cultivo y en los animales de experimentación, ratas y ratones (Girbés y cols., 1993a). Así tenemos que la IC₅₀ de ebulina l en células HeLa es 64,3 nM (unas 60.000 veces superior que la IC₅₀ de la ricina).

En la experimentación con animales la dosis de administración intraperitoneal a ratones de ebulina l es de 2 mg/kg de su peso corporal, mientras que para la ricina es de 8 µg/kg. La baja toxicidad de la ebulina con respecto a la ricina en células en cultivo podría deberse a las diferencias en sus cadenas B según se desprende de los estudios de cinética (Svinth y cols., 1998).

1.4.2. Lectinas no antirribosómicas.

Todas las lectinas sin actividad antirribosómica aisladas del *Sambucus* hasta el momento están recogidas en la Tabla 3. Hay que destacar que las lectinas homodiméricas resultan de la unión de dos cadenas polipeptídicas iguales unidas por un puente disulfuro, en el caso de las monoméricas la cisteína que forma el puente disulfúrico por mutación desaparece y no permite formar los dímeros (Citores y col., 2008).

Tabla 3. Lectinas de Sambucus sin actividad antirribosómica.

Especie	Tejido	Proteína	Mr. ap.
<i>S. ebulus</i>	Hojas	SELlm	34.000
	Hojas	SELld	68.000
	Frutos	SELfd	68.000
	Rizomas	SEA II	33.500
<i>S. nigra</i>	Corteza	SNA II	30.000
	Frutos	SNA IV	30.000
	Semillas	SNA III	33.000
<i>S. racemosa</i>	Corteza	SRA	136.000
<i>S. sieboldiana</i>	Corteza	SSA	132.000

1.4.3. Etapa afectada de la biosíntesis de proteínas.

Son tres las etapas que conforman el complejo proceso de la elongación de las cadenas polipeptídicas (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007; Youngman y Green, 2007; Wilson y Nierhaus, 2006), que describimos en la figura 2:

1^a.- la fijación de aminoacil-ARNt al sitio ribosómico aceptor o sitio A, que se encuentra vacío.

2^a.- la formación del enlace peptídico entre el peptidil-ARNt presente en el sitio ribosómico donador, o sitio P, y el aminoacil-ARNt presente en el sitio ribosómico aceptor.

3^a.- la translocación del nuevo peptidil-ARNt desde el sitio A al sitio P, que continúa con la eyección del ARNt deacilado presente en el sitio P y el avance del ribosoma respecto al ARN mensajero en la longitud de un codón.

Para la fijación del aminoacil-ARNt se forma un complejo ternario con factor de elongación 1 en los eucariontes y Tu en los procariontes, y GTP, con una estequiometría 1:1:1. Este proceso hidroliza el GTP a GDP y ortofosfato, utilizándose la energía liberada en la separación rápida de los factores de elongación.

Cuando el peptidil-ARNt se encuentra en el sitio donador y el aminoacil-ARNt ocupa su lugar en el sitio aceptor, se completa la formación del enlace peptídico entre el peptidilo y el aminoácido formando un peptidil-ARNt que está situado en el sitio A y tiene un aminoácido más que el inicial.

Seguidamente se produce la translocación del peptidil-ARNt formado favorecida por los factores de elongación 2 en los eucariontes y G en los procariontes, formando un complejo binario con GTP. Posteriormente a la translocación se completa la hidrólisis de GTP a GDP y ortofosfato, reacción que produce la energía utilizada en la liberación del ARNt deacilado que se encuentra en el sitio de salida del ARNt, o sitio E (Spiegel y cols., 2007) y de los factores de translocación 2 y G (Modolell y cols., 1975; Girbes y cols., 1976; Spiegel y cols., 2007). En conclusión, la interrupción en la síntesis de las proteínas está provocada por la depurinación del ARNr que impide al ribosoma fijar los factores de elongación en la etapa de translocación de las cadenas polipeptídicas.

Recientemente se ha constatado que las RIPs pueden actuar sobre ácidos nucleicos no ribosómicos (Nielsen y Boston, 2001; Barbieri y cols., 1997). Esto justifica la denominación de las RIPs como N-glicosidasas (Barbieri y cols., 1997).

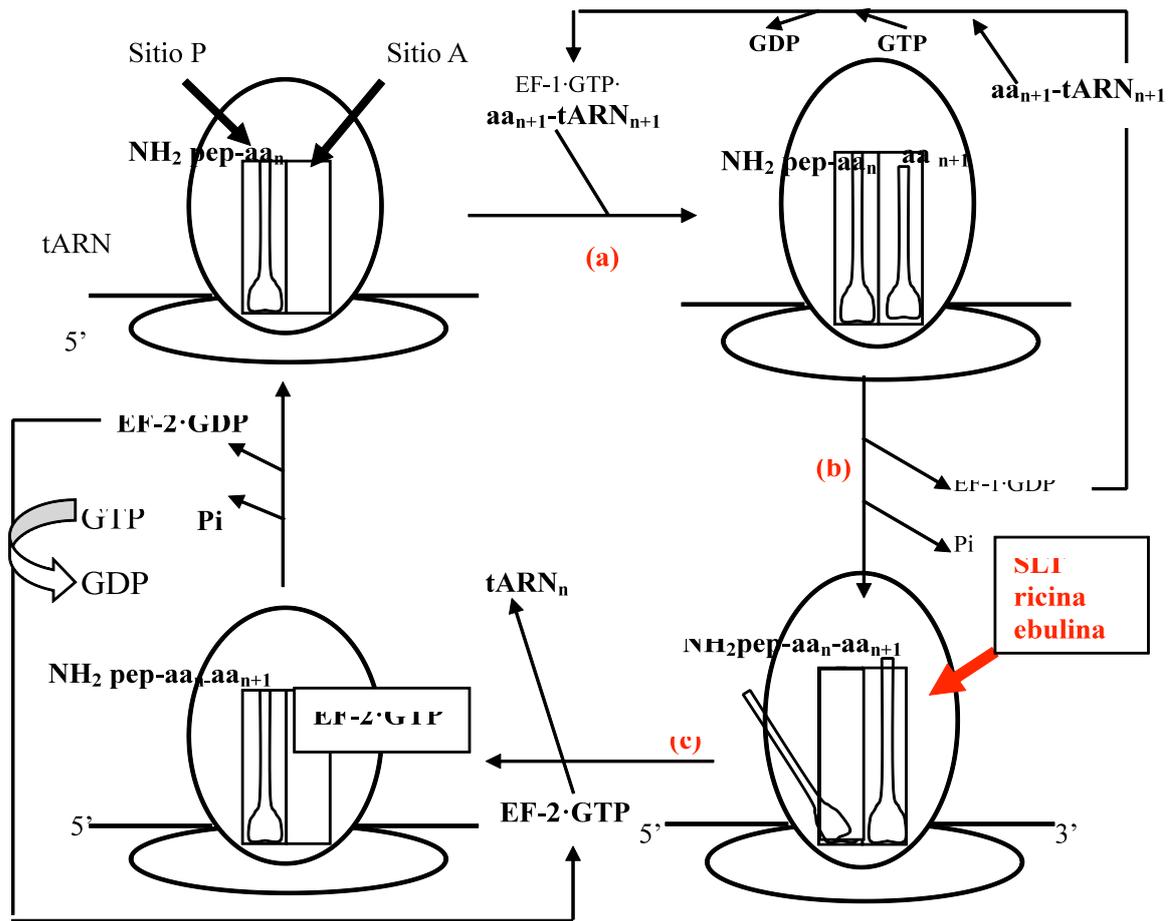


Figura 2. Alteración de la etapa de elongación en la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos por la acción catalítica de las RIPs. El efecto de las RIPs no permite la interacción del ribosoma con el factor de elongación G de los procariontas o del factor EF-2 en los eucariotas produciendo la interrupción de la síntesis de proteínas al no ser posible la translocación del peptidil-ARNt del sitio ribosómico aceptor (A) al sitio donador (P). La secuencia de fases de la elongación son (a) la fijación del peptidil-ARNt, (b) la formación del enlace peptídico y (c) la translocación.

1.4.4. Mecanismo de acción molecular.

En 1987, casi un siglo después del descubrimiento de la ricina, se fijó y describió el proceso molecular por el ejercen su efecto sobre el ribosoma de las células la ricina y otras lectinas antirribosómicas, e incluso proteínas

inactivadoras de ribosomas sin actividad lectina (Endo y Tsurugi, 1987). La toxinas *Shiga* y la ricina ejercen como N-glucosidasas sobre el ARN mayor de los ribosomas de mamíferos y en otros casos en plantas, bacterias y hongos (Barbieri y cols., 1993; Stirpe y Battelli, 2006).

En la figura 3 se muestra el esquema del mecanismo de acción de las lectinas antirribosómicas realizando una depurinación que consiste en la hidrólisis del ácido ácido ribosómico mayor del ribosoma. Este mecanismo es similar en todos los sistemas mencionados anteriormente.

La adenina eliminada es el centro de un bucle bien conservado a lo largo de la evolución, como podemos comprobar en la figura 4, que muestra las secuencias nucleotídicas del ARNr mayor de diversas especies animales, vegetales y microbianas. Esta adenina eliminada por la acción de las proteínas antirribosómicas se encuentra junto a la posición de acción de de ARNasas muy específicas de hongos, como son la α -sarcina de *Aspergillus giganteus* (Endo y Wool, 1982), y las restrictocina y mitogilina de *Aspergillus restrictus* (López-Otín y cols., 1984; Fando y cols., 1985). El resultado en estos casos es el mismo, la inhibición de la síntesis de proteínas de manera irreversible. Con otras proteínas como las inactivadoras de ribosomas SLT de *Escherichia coli*, ricina de *Ricinus communis* y ebulina de *Sambucus ebulus* se produce el mismo efecto. Existen también RIPs que liberan más de una adenina provocando multidepurinación (Iglesias y cols., 1993), aunque se desconoce el significado funcional de este proceso.

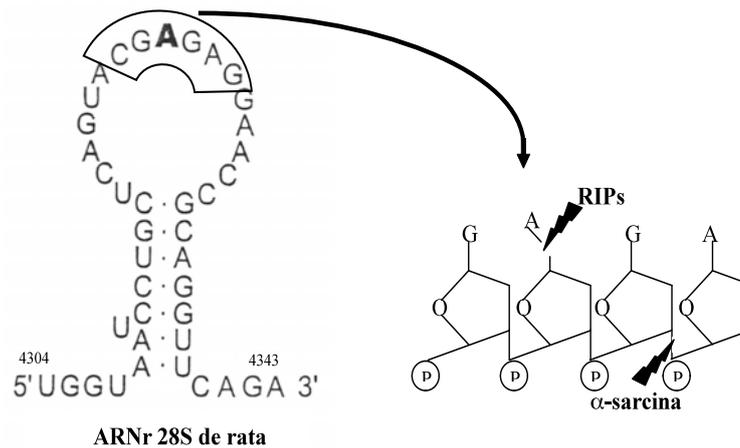


Figura 3. Secuencia de nucleótidos del bucle del ARNr responsable de la interacción del factor de elongación 2. La figura de la izquierda representa la estructura de secundaria del ARNr 28S del ribosoma de rata donde el efecto de la RIP produce la eliminación de una adenina (señalada en negrita). La figura de la derecha muestra la posición de interacción de la ribonucleasa fúngica α -sarcina en la unión con la ribosa siguiente con el esqueleto de polifosfato del ARNr.

Así pues, se trata de la eliminación de al menos una adenina (A_{4324} en el ARNr 28S de rata) que es la causante de la interacción del factor de elongación 2 en los eucariotas o del factor G en los procariotas. El resultado en los casos es la formación de complejos binarios factor-GTP (Iglesias y cols., 1993).

También se han descrito otras funcionalidades enzimáticas asociadas a las proteínas inactivadoras de ribosomas como la actividad quitinasa (Shih y cols., 1997), la actividad topoisomerasa sobre ADN (Huang y cols., 1992), la actividad inhibidora de la integrasa de VIH (Lee-Huang y cols., 1995) y la actividad superóxido dismutasa (Li y cols., 1997).

1.4.5. Variación estacional de las lectinas de *Sambucus*.

1.4.5.1. Frutos de *Sambucus nigra* y de *Sambucus ebulus*.

Los frutos de los saúcos desde su aparición hasta su maduración recorren un periodo durante el cual parte de sus compuestos se transforman debido a la maduración. Así, los frutos verdes de *nigra* que contienen nigrina f y mayoritariamente SNA IVf, que es una forma truncada de la nigrina f (Van Damme y cols., 1997; Citores y cols., 1996), sufren un cambio significativo en la distribución sus lectinas con la maduración en la que desaparece prácticamente la nigrina f (Citores y cols., 1996a).

La nigrina f presenta una toxicidad mayor que la nigrina b, que es la isoforma aislada de la corteza (Citores y cols., 1996b), pero esto no varía su carácter de lectina D-galactosa ni que expresen el mismo mecanismo antirribosómico (Citores y cols., 1996a).

La ebulina f es una lectina presente en los frutos de *S. ebulus* que tiene la capacidad de polimerizarse a diferencia de otras como la ebulina l de hojas que no lo hace (Citores y cols., 1998). Esta circunstancia puede explicar en parte la gran toxicidad de los frutos verdes *S. ebulus* que desaparece al madurar los frutos y eliminar la lectina, o mediante la desnaturalización de la lectina por cocción.

Los estudios que hemos realizado sobre los efectos fisiológicos que la nigrina y la ebulina producen en ratones, muestran que los efectos tóxicos causados por ambas lectinas son similares a los que produce la ingestión de frutos verdes, corteza y hojas, de lo que deducimos que podrían ser el origen de su toxicidad, dado su carácter enzimático.

1.4.5.2. Brotes y hojas de *Sambucus ebulus*.

De las hojas de *S. ebulus* se han aislado dos lectinas una RIP de tipo 2 llamada ebulina I y una lectina dimérica denominada SELId (Girbés y cols., 1993b; Rojo y cols., 2003). La concentración de cada una de estas proteínas depende del estadio de desarrollo de las hojas, así la ebulina I que aparece en los brotes jóvenes y hojas maduras y progresivamente desaparece al pasar las hojas a estado senescente, por el contrario la SELId que inicialmente en los brotes y hojas jóvenes se encuentra en pequeñas concentraciones, al madurar las hojas aumenta su concentración hasta ser prácticamente la única lectina que se encuentra en las hojas senescentes (Rojo y cols., 2003).

1.4.5.3. Corteza de *Sambucus nigra*.

De la corteza de *S. nigra* se han aislado varias lectinas algunas de ellas poseen actividad antirribosómica como las diméricas nigrina b y nigrina básica, también las tetraméricas SNA I y SNA I', otras en cambio como la monomérica SNA II no poseen dicha actividad antirribosómica. En el caso de la nigrina b se ha observado que la cantidad de proteína extraída de la corteza depende del estadio vegetativo de la planta, siendo relevante que la cantidad de proteína que se puede aislar de la corteza de verano, entre los periodos de la floración y la maduración de los frutos, es mucho mayor que la aislada con corteza de los meses de agosto y septiembre cuando los frutos están maduros o se han caído al suelo.

1.5. Estructura de ebulina I y nigrina b.

1.5.1. Secuencia aminoacídica de ebulina I y nigrina b.

Los estudios recientes han permitido explicar la estructura de los genes que codifican a la ebulina I (Pascal y cols., 2001), la nigrina b (Van Damme y cols., 1996) y así compararlos con los de la ricina (Lord y cols., 1994). Del estudio de la estructura de codificación de sus genes se puede pensar que posiblemente las nigrinas y las ebulinas se procesan y sintetizan siguiendo el mismo modelo que se ha fijado para la ricina. Del análisis de las secuencias de genes de cada una de las proteínas ha posibilitado la determinación con precisión de la secuencia proteica de estas RIPs.

En las figuras 5 y 6 se presentan las estructuras primarias que se deducen de la secuencia de los genes de la nigrina b y de la ebulina I en comparación con la estructura primaria de la ricina (Lord y cols., 1994).

La disposición general de los dominios y cadenas se ajustan al modelo de la ricina: en el extremo amino terminal de la cadena A presenta un péptido señal, seguido por la cadena A al completo, a continuación un péptido de conexión que conecta el extremo carboxilo terminal de la cadena A con el extremo amino terminal de la cadena B y finalmente la cadena B.

Para el caso de la ebulina I, se ha determinado la estructura molecular por dispersión de rayos X en la escala de 2,8 Å y corresponde perfectamente con la determinada a partir de la secuencia del gen correspondiente (Pascal y cols., 2001). Esto ha permitido abrir al estudio la interacción estructural comparada de los derivados de D-galactosa con los sitios de unión en la cadena B de la ebulina y de la ricina.

		0	20	30	40	50	
1	NIGRINA B	MR-VVAAAMLYFYIVVLAICSVGIQG-----ID-----YPSVSFNLDG	37				
2	EBULINA L	MR-VVKAAMLYLHLVVLAIYSVGIQG-----ID-----YPSVSFNLAG	37				
3	RICINA	MKPGGNTIIVIMYAVATWLCFGSTSGWSFTLEDNNIFPKQYPIINFTTAG	50				
		60	70	80	90	100	
1	NIGRINA B	AKSATYRDFLSNLRKTVAATGTYEVNGLPVLRRRESEVQVKSFRVFLVPLTNY	87				
2	EBULINA L	AKSTTYRDFLKNLRDRVATGTYEVNGLPVLRRRESEVQVKNRFVFLVRLTNY	87				
3	RICINA	ATVQSYTNFIRAVRGRLLTGADVRHEIPVLPNRVGLPINQRFILVELSNH	100				
		110	120	130	140	150	
1	NIGRINA B	NGNTVTLAVDVTNLYVVAFSGNANSYFFK-DATEVQK--SNLFGTK-QN	133				
2	EBULINA L	NGDVTSAVDVTNLYLVAFSANGNSYFFK-DATELQK--SNLFLGTT-QH	133				
3	RICINA	AELSVTLALDVTNAYVGYRAGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDQNR	150				
		160	170	180	190	200	
1	NIGRINA B	TLSFTGNYDNLETAANTRRESIELGPSPLDGAITSLYHGDS-----VA	176				
2	EBULINA L	TLSFTGNYDNLETAAGTRRESIELGPNPLDGAITSLWYDGG-----VA	176				
3	RICINA	TFAFGGNYDRLEQLAGNLRNIELGNGLPEEAISSALYYYSTGGTQLPTLA	200				
		210	220	230	240	250	
1	NIGRINA B	RSLLVVIQMVSEAAARFRYIEQEVRRSLQQATSFTPNALMLSMENNWSSMS	226				
2	EBULINA L	RSLLVLIQMVPEAAARFRYIEQEVRRSLQQLTSFTPNALMLSMENNWSSMS	226				
3	RICINA	RSFIICIQMISEAAARFYIEGEMRTRIRYNRRSAPDPSVITLENSWGRLS	250				
		260	270	280	290	300	
1	NIGRINA B	LEIQQAGNNVSPFFGTVQLLNVDHTHRLVDNFEEELYKITGIAILLFRCSS	276				
2	EBULINA L	LEVQLSGDNVSPFSGTVQLQNYDHTPRLVDNFEEELYKITGIAILLFRCVA	276				
3	RICINA	TAIQES--NQGFASPIQLQRRNGSKFSVYDVSILIP--IALMVYRCAP	296				
		310	320	330			
1	NIGRINA B	-PSNDNAIRMPLDLAGEDNKYN	297				
2	EBULINA L	TKTTHNAIRMPHVLVGEDNKFN	298				
3	RICINA	PPSSQF-----	302				

Figura 5. Estructura primaria de cadena A de nigrina b, ebulina l y ricina.

		10	20	30	40	50	
1 NIGRINA b							
		DGETCTLR	TSFTRN	IVGRDGL	CVDVRN	GYDTDGT	PLQLWP
2 EBULINA l		DGETCAIP	PAPFTRR	IVGRDGL	CVDVRN	GYDTDGT	PIQLWP
3 RICINA		-ADVCM	DPEPIVR-	IVGRNGL	CVDVRD	GRFHNG	NAIQLWP
		CG--TQR	NQR	48			
		CG--TQR	NQQ	48			
		CKSNTD	ANQL	48			
		60	70	80	90	100	
1 NIGRINA b		WTFDSDD	TIRSMG	KCMTAN	GLNNGS	NIVIFNC	STAAEN
2 EBULINA l		WTFYNDK	TIRSMG	KCMTAN	GLNSGS	YIMITDC	STAAED
3 RICINA		WTLKRDN	TIRSN	GKCLTY	GYS	PGVYVMI	YDCNTA
		ATD	ATRWQ	IWDNG	TI	98	
		ATD	ATRWQ	IWDNG	TI	98	
		ATD	ATRWQ	IWDNG	TI	98	
		110	120	130	140	150	
1 NIGRINA b		INPSSGL	VMTAPR	AASRTIL	LLLEDNI	YAASQGW	TVTNNV
2 EBULINA l		INPSSGL	VMTAPR	ASGASRT	TLLENNI	HAASQGW	TVSNDV
3 RICINA		INPRS	SLVLA	ATSGNS	GTTTLTV	QTNII	YAVSQG
		WLP	TNNTQ	PFVTT	IVGLY	148	
		WLP	TNNTQ	PFVTT	IVGLY	148	
		WLP	TNNTQ	PFVTT	IVGLY	148	
		160	170	180	190	200	
1 NIGRINA b		EMCLQ	SNGEN	NGVW	MEDCE	ATSLQ	QWALY
2 EBULINA l		EMCLQ	ANGEN	NNVW	MEDCD	VTSVQ	QWALF
3 RICINA		GLCLQ	AN--	SGQV	WIED	CSSEK	AEQQW
		ALY	ADGS	IRPQ	QNRD	NCLT	SDSN
		ALY	ADGS	IRPQ	QNRD	NCLT	SDSN
		ALY	ADGS	IRPQ	QNRD	NCLT	SDSN
		210	220	230	240	250	
1 NIGRINA b		NSKDLI	IILK	CQGLPS	-QRW	FFNSD	GAI
2 EBULINA l		VSKDLI	VIRK	CQGLAT	-QRW	FFNSD	GSVV
3 RICINA		IRET	VVKI	LSCG	PASSG	QRW	MFKND
		G	TILN	LYS	GLVLD	VRAS	DP
		G	TILN	LYS	GLVLD	VRAS	DP
		G	TILN	LYS	GLVLD	VRAS	DP
		260	270	280			
1 NIGRINA b		IFPAT	GPNQ	QWVT	QVLPS	266	
2 EBULINA l		IFPAT	GPNQ	QWRT	QVPQI	266	
3 RICINA		LYPL	HGD	PNQI	WLPLF	---	262

Figura 6. Estructura primaria de cadena B de nigrina b, ebulina l y ricina.

1.5.2. Estructura espacial de ebulina y nigrina y análisis comparado con ricina.

La estructura tridimensional de la ricina como se puede ver en la figura 7 está compuesta por una cadena A unida por un puente disulfuro intercatenario a una cadena B que presenta dos dominios 1α y 2γ que son fundamentales para la fijación de azúcares a la molécula.

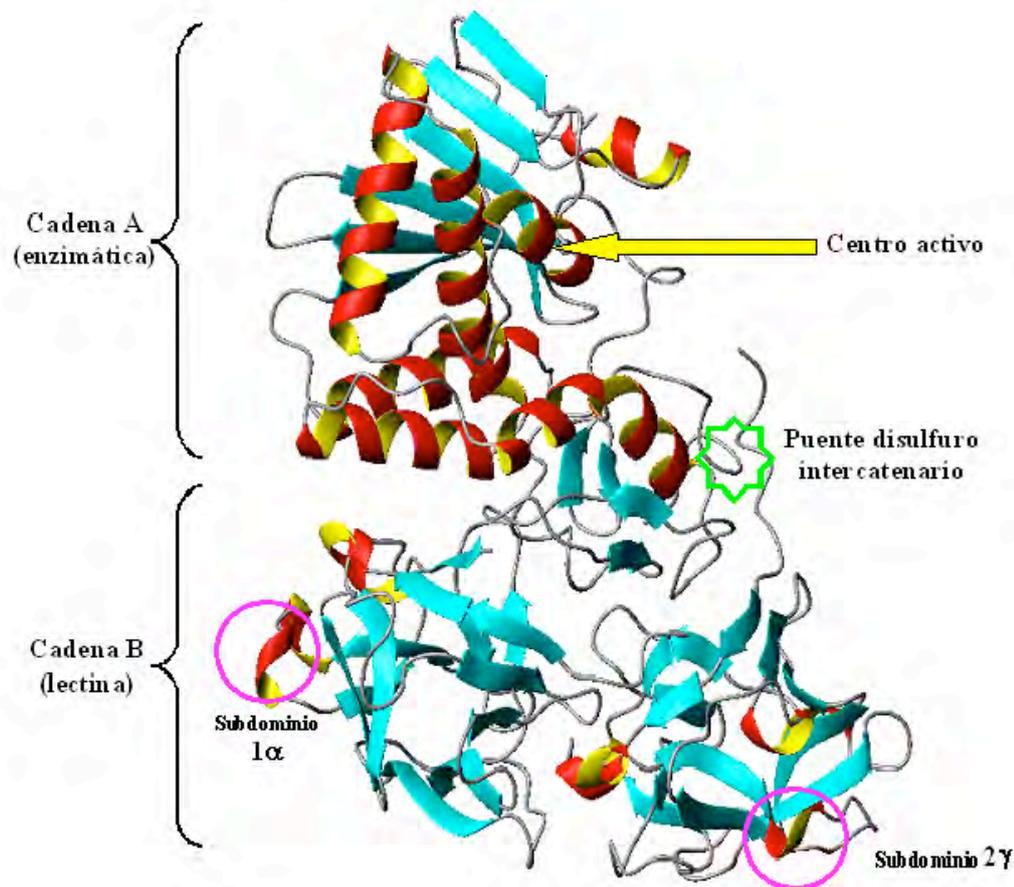


Figura 7. Estructura tridimensional de la ricina.

En la figura 8 se muestra la estructura tridimensional de la ebulina 1. Se ha obtenido por difracción de rayos X de cristales de ebulina 1 (Pascal y cols., 2001). La comprobación de los datos cristalográficos concluyen que la ebulina 1 cristaliza en los sistemas ortorrómbico y trigonal. El análisis comparado de las estructuras de ambas proteínas muestra que sus distribuciones espaciales son equivalentes y por lo que se puede considerar que la estructura de la ebulina es como la de la ricina en terminos generales, aunque hay alguna diferencia en los subdominios de fijación de azúcar que trataremos en otro apartado.

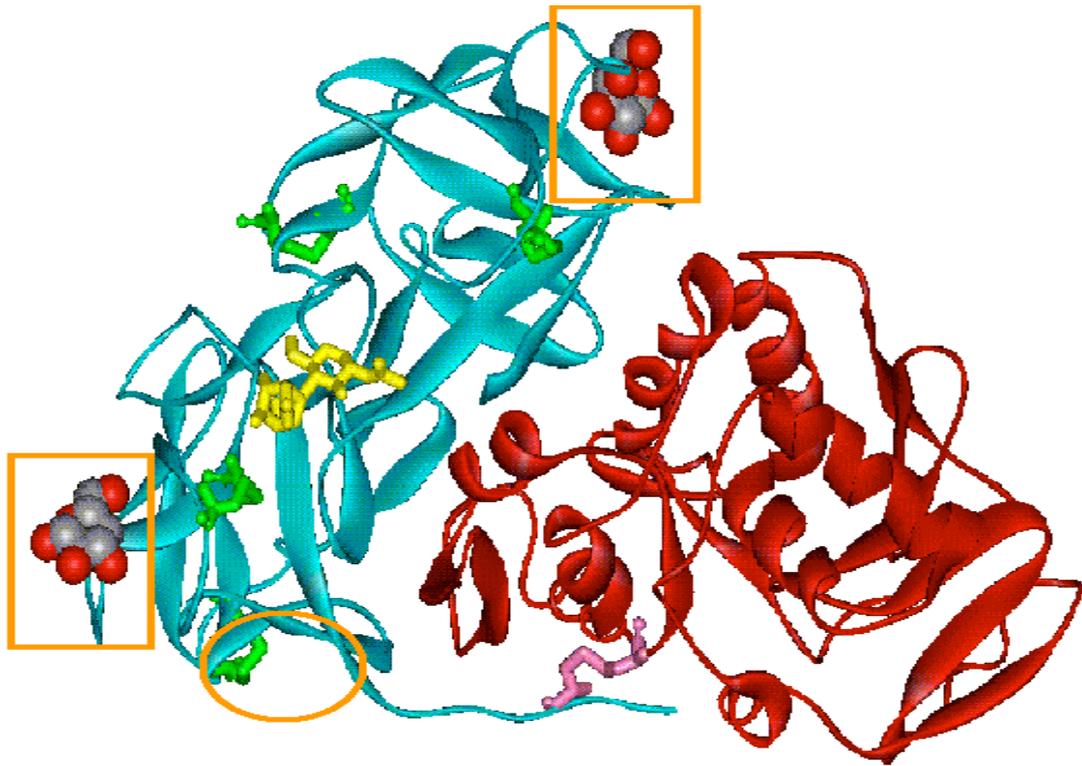


Figura 8. Estructura tridimensional de la ebulina I determinada por difracción de rayos X en cristales de ebulina I, en base a la secuencia de amino ácidos de la proteína. Los recuadros indican las posiciones de fijación de azúcares de alta afinidad 2γ y 1α . La elipse fija la posición del sitio 1β de cometido aún sin aclarar.

1.5.3. Dominios proteicos de interacción con azúcares.

Las cadenas B de las RIPs de tipo 2 tienen unos dominios específicos de interacción con los azúcares que son los responsables del paso de la proteína a través del citoplasma (Svinth y cols., 1998). La cadena B de la ricina tiene dos dominios estructurales, cada dominio tiene tres subdominios denominados α , β y γ , lo que representa un total de 6 subdominios 1α , 1β , 1γ , 2α , 2β y 2γ . De estos subdominios los únicos que poseen capacidad contrastada por cristalografía de rayos X de fijar galactósidos son 1α y 2γ (Rutenber y cols., 1987). En la figura 9 se relacionan las secuencias de los dominios más importantes en la interacción con azúcares.

Se han propuesto tres criterios estructurales para la fijación de D-galactosa en la estructura de estos dos subdominios (Villafranca y Robertus, 1981):

- 1.- un residuo aromático para la interacción de apilamiento con la cara no polar del anillo de D-galactosa.
- 2.- un carboxilato para la formación de puentes de hidrógeno con los hidroxilos de las posiciones 3 y 4.
- 3.- un nicho o pliegue de tres residuos de aminoácido que interaccionan con la cara polar del anillo de D-galactosa.

Las diferencias de toxicidad celular e *in vivo* que existen entre la ricina y las RIPs de *S. nigra* y *S. ebulus*, justificaron el estudio de la estructura de la ebulina 1, obtenida a partir de la secuencia del gen correspondiente y se comparó con la estructura de la ricina (Rutenber y cols., 1987).

SUBDOMINIO 1 α

Ricina A	Asp22	Gln35	Trp37	Asn46	Gln47
Abrina A	Asp	Ile	Trp	Asn	Gln
Abrina C	Asp	Ile	Trp	Asn	Gln
Ebulina I	Asp	Gln	Trp	Asn	Gln
Nigrina b	Asp	Gln	Trp	Asn	Gln
Sieboldina b	Asp	Gln	Trp	Asn	Gln

SUBDOMINIO 1 β (nuevo sitio)

Ricina A	Tyr67	Tyr78
Abrina A	Tyr	Tyr
Abrina C	Glu	Tyr
Ebulina I	Asn	Thr
Nigrina b	Asn	Phe
Sieboldina b	Asn	Phe

SUBDOMINIO 2 γ

Ricina A	Asp234	Tyr248	Asn255	Gln256
Abrina A	Asp	Trp	Asn	Gln
Abrina C	Asp	His	Asn	Gln
Ebulina I	Asp	Phe	Asn	Gln
Nigrina b	Asp	Phe	Asn	Gln
Sieboldina b	Asp	Phe	Asn	Gln

Figura 9. Subdominios activos en fijación de galactosa presentes en las cadenas B de diversas RIPs de tipo 2.

Como se aprecia en la figura 10 que representa la estructura del subdominio más afin a la fijación de D-galactosa, la ebulina I presenta un resto de Fen en la posición 249 en el subdominio 2 γ y la ricina presenta una Tir. Esta sustitución de Tir por Fen en la estructura del subdominio se ha sugerido que es la responsable de la menor afinidad de la ebulina por la D-galactosa (Pascal y cols., 2001). La nigrina b y la sieboldina b también tienen Fen en la posición 249 y producen similar toxicidad que la ebulina.

Está comprobado que la ricina se fija 5,7 veces más que la nigrina a las células Hela (Battelli y cols., 1997; Battelli y cols., 2004).

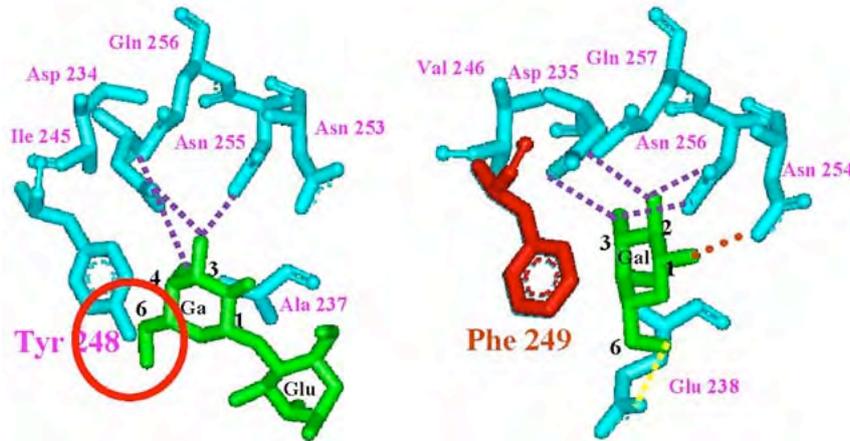


Figura 10. Comparación de la unión a galactosa en el subdominio 2 γ entre ricina (izquierda) y ebulina I (derecha).

El grupo carboxílico que presenta la ricina en el subdominio 2 γ es el responsable del establecimiento de la unión por puente de hidrógeno entre la proteína y el azúcar en el subdominio que determina la reducción de la afinidad por galactósicos (figura 10) y por lo tanto controla la capacidad de interacción con los receptores de tránsito de membrana que posibilitan el paso al retículo endoplasmático. Esta diferencia estructural parece ser la causa de la ausencia de toxicidad in vivo de la ebulina I y por extensión de la nigrina b ya que ambas tienen la misma estructura en este subdominio.

En el tercer sitio propuesto de fijación de D-galactosa (Steeves y cols., 1999), las RIPs más tóxicas como la ricina y la abrina en su posición 67 tienen una Tyr, mientras las RIPs no tóxicas como la ebulina I, la nigrina b y la sieboldina b tienen una Asn (figura 10), lo que supone un cambio importante.

1.6. Tránsito intracelular de las lectinas antirribosómicas vegetales de sambucus.

Existen proteínas como ricina, abrina, modicina, volkesina, viscumina, lanceolina y stenodactylina que forman el grupo a las lectinas antirribosómicas que son estremadamente tóxicas para las células ya que poseen la cadena B translocadora que las permite internalizar a la molécula dímica dentro del citosol para posteriormente disociarse y liberar a la cadena A, que es la especie activa (Sandvig y Van Deurs, 2002; Lord y cols., 1994; Stirpe y cols., 2007).

En el caso de la ebulina I su diferencia fundamental con la ricina está en la cadena B, que produce la interacción de estas RIPs con los receptores de la membrana plasmática y permite su internalización en el citosol (Svinth y cols., 1998; Pascal y cols., 2001). En los estudios realizados de toxicidad y de captación dependiente de fase fluida de la cadena A aislada de la ricina muestran como ambos procesos son iguales a los que permiten la intenalización de las RIPs monocatenarias sin actividad lectina (Svinth y cols., 1998). Las diferencias entre las cadenas B de la ricina y de la ebulina I son la causa de la falta de toxicidad de la ebulina, ya que disminuye en gran medida su afinidad por los galactósidos (Pascal y cols., 2001).

En la figura 11 se presenta un modelo hipotético de las primeras etapas del tráfico intracelular de la ebulina, la nigrina y la ricina, que como podemos comprobar siguen caminos diferentes.

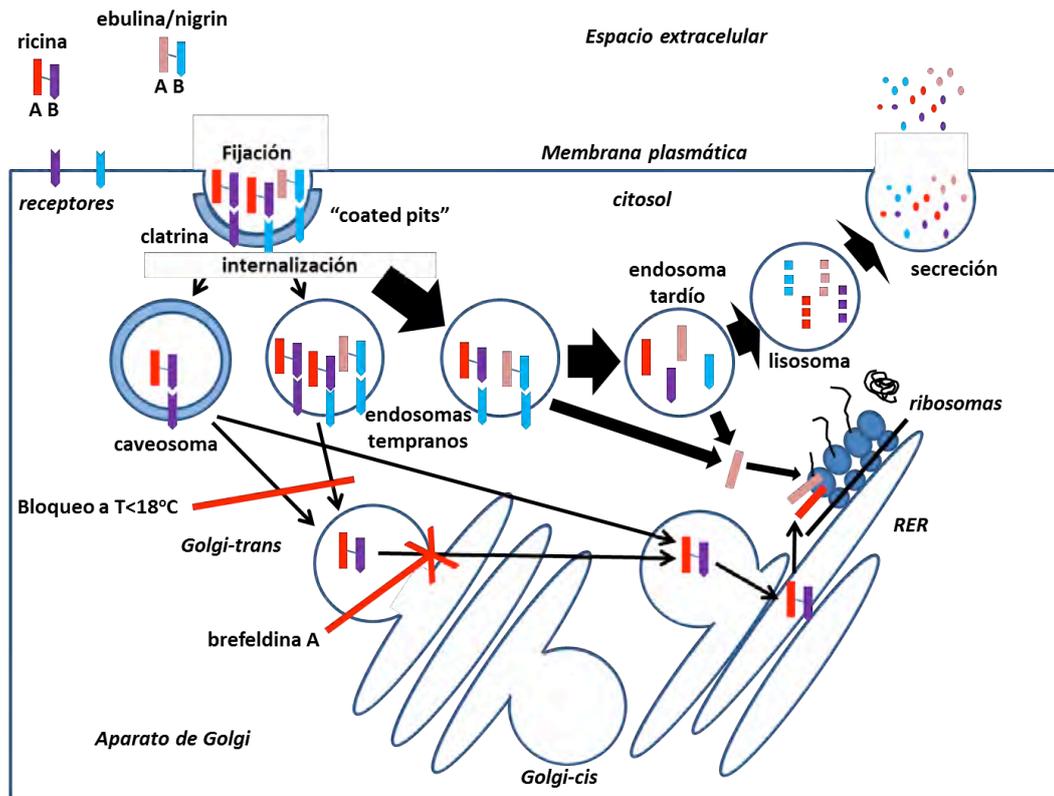


Figura 11. Rutas intracelulares seguidas por ebulina-nigrina y ricina.

La ruta seguida por las moléculas de ricina para alcanzar el citosol de las células se inicia con su internalización mediante receptores de membrana y su integración en compartimentos endosómicos sensibles al NH_4Cl , seguidamente pasa por compartimentos sensibles a la temperatura que se bloquean a 18°C y finalmente la ricina es translocada en el aparato de Golgi, este proceso es sensible a la brefeldina A que es una droga que tiene un efecto desorganizador del aparato de Golgi (Battelli y cols., 1997). Solo unas pocas moléculas de ricina alcanzan el citosol a través del aparato de Golgi y son eficaces para inactivar los ribosomas, ya que la mayor parte de la ricina internalizada es degradada completamente en los lisosomas.

La ruta seguida por la nigrina b es inicialmente la misma que la seguida por la ricina, cuando se internaliza pasa por endosomas sensibles a NH_4Cl y

continúa por lisosomas donde se degrada en su mayor parte, finalmente no logra alcanzar el aparato de Golgi (figura 11).

Desde los endosomas, las rutas de la nigrina b y la ricina son diferentes ya que los efectos antirribosómicos que se producen a altas concentraciones son independientes de la temperatura e insensibles a la brefeldina A. Prácticamente todas las moléculas de nigrina b son transportadas desde los endosomas hasta los lisosomas donde son degradadas (Battelli y cols., 1997; Battelli y cols., 2004).

Con concentraciones 4 ó 5 veces superior a la ricina se llegan a acumular suficientes moléculas de nigrina b en los endosomas como para forzar la translocación espontánea de la nigrina b desde los endosomas hasta el citosol. La diferencia entre las rutas intracelulares seguidas por la nigrina y la ricina puede estar en que los receptores de unión de ambas proteínas sobre la membrana plasmática, sean diferentes (Muñoz y cols., 2001).

Por otra parte, la diferente toxicidad de la ricina y la ebulina podría tener relación con el hecho de que la toxicidad de la ricina contribuya a una actividad lipasa inherente a las subunidades A-B (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta actividad ayudaría a que algunas moléculas de ricina pudieran alcanzar el retículo endoplasmático más fácilmente y finalmente el citosol. El lugar de actividad lipasa está conformado con residuos pertenecientes a las dos subunidades de la ricina. La ausencia de este sitio con actividad lipasa en sus moléculas podría ser la causa de la baja toxicidad de las lectinas antirribosómicas no tóxicas (Morlon-Guyot y cols., 2003). Esta ausencia de actividad lipasa obligaría a la ebulina y a la nigrina a continuar la ruta degradativa lisosómica inevitablemente.

1.7. Desarrollo de alergias alimentarias de origen vegetal.

La alergia tipo I llamada también hipersensibilidad inmediata o alergia atópica se desarrolla al producirse una reacción frente a alérgenos solubles en la que median anticuerpos del tipo IgE y como su nombre expresa es prácticamente inmediata. Un caso concreto de estas alergias atópicas son las alergias alimentarias se producen cuando el alérgeno forma parte alimentos vegetales consumidos directamente.

En los casos donde el alérgeno es de origen vegetal, la fase de sensibilización generalmente se produce la inhalación del polen que contiene el alérgeno o también por ingerir alimentos que contengan el alérgeno, pasando a ser una intoxicación alimentaria. Este alérgeno es captado por las células presentadoras de antígeno y lo transportan a los ganglios linfáticos, en donde se juntan con los linfocitos Th2 lo que produce una serie de señales que provoca la producción de IgE específica. Esta sensibilización inicial no presenta síntomas clínicos pero es efectiva. Por tanto si un individuo que previamente se ha sensibilizado a un alérgeno se expone al mismo, puede iniciar un proceso alérgico donde la IgE específica reconocerá al alérgeno y provocará la desgranulación de los mastocitos y que se desencadene una reacción inflamatoria inmediata.

El número conocido de alérgenos vegetales contenidos en el polen de las plantas está en continua evolución, lo que provoca el aumento de las alergias de tipo I que causan. La polinosis de primavera y verano que afecta a ciertas personas, generalmente produce la sensibilización a más de un alérgeno vegetal. Esta situación hace necesario desarrollar procedimientos analíticos que permitan en el laboratorio encontrar los alérgenos desencadenantes de la sensibilidad y también su presencia en los alimentos,

esto permitiría actuar en la prevención de las alergias alimentarias e investigar la estructura y las propiedades de los alérgenos, sobre todo las proteínas (Vieths y cols., 1998; Vieths y cols., 2002).

Para medir el potencial alergénico se ha propuesto la digestibilidad de las proteínas (Astwood y cols., 1996). Hay datos que indican que el uso de los antiácidos normales que aumentan el pH del estómago y dificultan por tanto la acción de la pepsina (Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2008; Pali-Schöll y Jensen-Jarolim, 2011). Ello puede incrementar la alergenidad de una proteína. La aparición de alergias alimentarias no es propia solo de niños y de jóvenes, sino también los ancianos, algunos ancianos padecen deficiencias en micronutrientes como zinc y hierro, provocadas por una mermada capacidad de secreción de pepsina causada entre otros motivos por el consumo de medicamentos antiulcerosos y antiácidos que hacen que las proteínas de los alimentos se degraden menos y más lentamente. Ello incrementa el tiempo de tránsito de las proteínas por el tracto gastrointestinal y aumenta la probabilidad de convertirse en alérgicas. Esta alergia en personas ancianas podría ser importante ya que estas personas son consumidoras de extractos de frutos de saúco en forma de jarabes, inmunoestimulantes y preparados antioxidantes, aunque se le preste poca atención (Diesner y cols., 2011).

La digestibilidad de las proteínas es menor en las dietas ricas en alimentos vegetales que en las menos ricas (Gilani y cols., 2005). Este efecto que ha de tenerse en cuenta, puede deberse a que estas dietas ricas en alimentos vegetales poseen muchos factores antinutricionales como inhibidores de tripsina, lectinas y taninos que fijan proteínas e inactivan las enzimas correspondientes y reducen su digestibilidad.

1.8. Alergia de tipo 1 al saúco y alérgeno Sam n1.

Las personas en contacto o que ingieren productos derivados de los frutos de *Sambucus nigra* L. pueden adquirir sensibilización inmunológica a sus alérgenos. Es en 2003 cuando se describe la sensibilidad inmonológica al saúco en un trabajo publicado que determina la causa de la alergia tipo I que habían desarrollado algunos pacientes con síntomas de rinitis, conjuntivitis, y/o disnea al haber inhalado o estado en contacto con flores o productos derivados del saúco (Förster-Waldl y cols., 2003). El estudio se realizó sobre el saúco común (*S. nigra* L.), que es actualmente utilizado como suplemento dietético. Como hecho más relevante se detectaron anticuerpos del tipo IgE en el plasma de los pacientes que eran reactivos con varias proteínas presentes en el polen, las flores y los frutos de *S. nigra*. El análisis de una de estas proteínas a nivel proteómico y molecular proporcionó una masa molecular de 33.2 kD y una colección de péptidos trípticos con mucha similitud secuencial con otras proteínas descubiertas en los saúcos, como la ebulina en las hojas de *Sambucus*.

1.8. Polifenoles del té verde.

El té contiene elevadas cantidades de diversos flavonoides, entre los que destacan las catequinas (Kandar y cols., 2012). El té verde procede de la planta *Camellia sinensis*, su preparación requiere el escaldado de hojas frescas para la inactivación de enzimas que impliquen la fermentación del producto, obteniéndose por lo tanto, un producto seco estable (Kandar y cols., 2012).

El té verde posee beneficios claros en particular sobre el cáncer de colon (Shimizu y cols., 2011). Por ello se ha producido un aumento notable

del consumo de té en varios formatos como infusiones y extractos concentrados de té verde (CTV).

Además de las hojas convencionales de té para infusión, hay un gran número de CTV comerciales disponibles de té verde enriquecidas con catequinas. Una de estas formas es el Polyphenon E, marca aplicada a una serie de CTV de alta calidad y estandarizado. El Polyphenon E es un CTV descafeinado, compuesto por una fracción total de catequinas del 89% siendo un 60% epigalo-catequina galato, 16,13% epicatequina, 16,33% epigalo-catequina, 7,48% epicatequingalato (Henning y cols., 2005).

2. OBJETIVOS DE LA TESIS.

2. Objetivos de la tesis.

El hecho de que los frutos de *S. ebulus* se han descrito como tóxicos capaces de provocar envenenamientos serios por ingestión oral y la ausencia de datos sobre la posible toxicidad de la ebulina nos llevó a estudiar la estructura y la toxicidad de la ebulina f que es la forma de la ebulina presente en los frutos (Citores y cols., 1998).

Los datos existentes en la literatura sugieren una relación entre las proteínas de *S. nigra* y el alérgeno Sam n1 aislado de polen de *S. nigra*. En particular se ha descrito que el alérgeno Sam n1 pudiera ser una proteína inactivadora de tipo II, equivalente a ebulina (Föster y Waldl, 2003). En base a los resultados conocidos se planteó la hipótesis de que la ebulina si bien pudiese compartir secuencias de aminoácidos, sería una proteína diferente del alérgeno Sam n1.

Los objetivos concretos de esta tesis fueron:

1. Obtener datos sobre la estructura de la ebulina f que permitieran relacionarla con el alérgeno Sam n1.
2. Estudiar los efectos de su administración a ratones por vía oral e intraperitoneal.
3. Determinar los tejidos que pudieran ser afectados por la administración de ebulina f.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales.

3.1.1. Reactivos.

Todos los reactivos que se emplearon son de la mayor pureza posible y de las marcas punteras del mercado en cada reactivo. La relación de reactivos y marcas es la siguiente:

REACTIVO	MARCA
Acetato sódico	Merck
Acido acético	Merck
Acrilamida	Amresco
Anhidrasa carbónica	Boehringer-M
Azul de Evans	Sigma
Bisulfito sódico	Merck
Bisacrilamida	Amresco
Cloruro de Sodio	Sigma
Coomasie Brilliant-blue R-250	Sigma
Dodecilsulfato sódico	Sigma
Etanol	Merck
Formaldehído	Sigma
Fosfatasa alcalina	Sigma
Fosfato Monosódico	Merck
Glicerol	Sigma
Glicina	Roche
Lactosa	Sigma
2-mercaptoetanol (2-ME)	Merck y Sigma
Metanol	Merck
Mucina porcina	Sigma

N, N-Dimetilformamida	Sigma
Persulfato amónico	Sigma
Seroalbúmina bovina (BSA)	Boehringer-M
TEMED	Sigma
Transferrina	Boehringer-M
Tris base	Boehringer-M.
Xileno	Panreac
Parafina	Panreac
Hematoxilina de Caracci	Panreac
Sulfato alumínico potásico	Panreac
Yoduro potásico	Panreac
Eosina Y	Panreac
Entellan	Merck

El agua empleada para las soluciones, lavados y diluciones es proporcionada por un equipo Helix de Millipore.

El material de uso general en el laboratorio, vidrio y porcelana, se seca en estufa de aire durante 12 horas a 120° C. Para el resto del material de laboratorio, el desechable (puntas de micropipeta, tubos Falcon, microtubos, filtros, jeringas, etc.,) se compra en forma estéril o en caso necesario se esteriliza en autoclave a 1 atmósfera de sobre presión durante 20 minutos.

3.1.2. Material vegetal.

El material vegetal empleado para obtención de las proteínas que se utilizó para la realización del trabajo de investigación fueron los frutos verdes de *Sambucus ebulus* recogidos durante los meses de junio y julio en la localidad de Barruelo del Valle (Valladolid).

3.1.3. Animales de experimentación.

Para los experimentos necesarios para la obtención del anticuerpo se emplearon conejos albinos tipo New Zealand con un peso corporal de 3,5-4 kg y alimentados con I.P.M. C-70 de Letica.

Para las pruebas de toxicidad y para la obtención de las muestras usadas en el estudio histológico se emplearon ratones Swiss a los que se administraron las proteínas tanto por vía oral como por vía intraperitoneal. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales a base de dieta de pellets Harlam 2014 y agua potable de acceso libre.

3.2. Purificación de proteínas de frutos de *Sambucus ebulus* L.

3.2.1. Material de partida y obtención de los extracto de *Sambucus*.

El material del que se parte en cada preparación fueron 200 g de frutos verdes congelados almacenados en un congelador a -24° C y recogidos durante los meses junio y julio en Barruelo del Valle (Valladolid). El procedimiento que se siguió es el siguiente: los frutos se trituran con mortero de porcelana en pequeñas cantidades y formando una pasta que se diluya fácilmente en tampón de extracción (NaCl 0,14M, fosfato monosódico 5 mM (pH=7,5)). En un vaso de precipitados se ponen en contacto la pasta formada en el mortero con 800 ml de tampón de extracción en agitación constante y a temperatura de 4° C durante un periodo de 12 horas. El extracto se filtra con una doble gasa de nailon y el filtrado obtenido se somete a una primera centrifugación de 45 min a 3.500 rpm en centrífuga Digicen-R de rotor basculante RT142 de 4 tubos de 50 ml cada uno a una temperatura de trabajo de aproximadamente de 2° C. Se recupera el sobre nadante y se somete a una segunda centrifugación de 30 min a 3.500 rpm y 2° C de temperatura.

El sobrenadante se recoge y filtra a través de un filtro de doble capa con pliegues hecho de papel (Anoia de 73 g/m²). El volumen recuperado en este proceso está alrededor 650 ml que es la base para la posterior purificación y denominaremos extracto crudo.

3.2.2. Preparación de AT-Sepharose 6B.

Tomamos 350 ml AT-Sepharose 6B producto comercial de Pharmacia GE que es una resina de Sepharosa 6B que se comercializa en suspensión de etanol. El procedimiento seguido es el siguiente: previamente a su tratamiento la resina se lava varias veces con 5 volúmenes de agua Helix-Millipore dejando decantar la resina, hasta eliminar el etanol. Se somete a tratamiento con HCl 0,1 N en baño de agua a 50° C durante 3 horas y a continuación se realizan varios lavados con 5 volúmenes de agua Helix-Millipore decantando la resina hasta que su pH esté entre 6-6,5. La resina se almacena en disolución acuosa a 4° C hasta su uso. Es recomendable realizar un solo uso de la resina ya que su efectividad baja bastante en su segundo uso.

3.2.3. Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose (6B).

Para obtener las lectinas a partir del extracto crudo se operó como sigue: el extracto se pasa por gravedad por una columna GE-Pharmacia KX50 (5 x 15 cm) con camisa de refrigeración conectada a un baño de agua-hielo a una temperatura aproximadamente de 2-4 ° C con recirculación mediante bomba peristáltica, cargada con 200 ml AT-Sepharosa 6B aproximadamente (Figura 12). A continuación se lava la columna con tampón salino (5 mM fosfato monosódico, 0,28 M NaCl (pH =7,5)) por gravedad hasta que la lectura de densidad óptica a 280 nm esté por debajo de

0,1 unidades. La proteína que se fija específicamente a la columna se eluye por gravedad con el mismo tampón conteniendo lactosa 0,2 M. El pico de la elución se recoge en fracciones de 10 ml que se juntaron y concentraron hasta un volumen de 5 ml en una celda de filtración Amicon, usando una membrana YM-10.

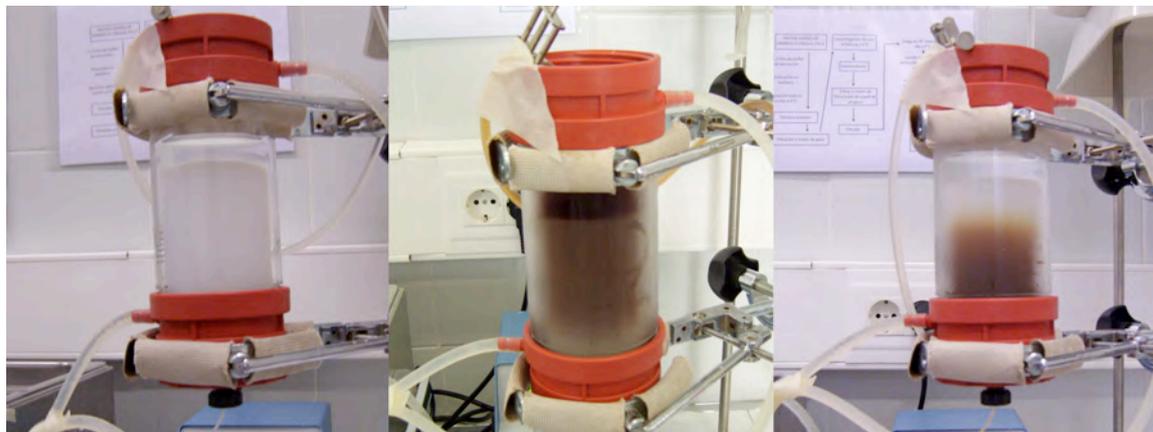


Figura 12. Cromatografía del extracto de *S. ebulus* en AT-Sepharose 6B. La figura de la izquierda muestra el montaje de la columna GE-Pharmacia KX50 (5 x 10 cm) cargada con AT-Sepharose 6B y conectada a un baño de refrigeración con bomba de recirculación de agua. La figura de la derecha muestra su lavado con tampón salino (5 mM fosfato monosódico, 0,28 M NaCl (pH =7,5)). El aspecto final de la resina tras el lavado ha de ser el inicial (figura derecha) si se ha tenido la precaución de eliminar el mucílago plástico del extracto que ensucia el material y estropea las columnas. Cualquier color en la resina de la columna es síntoma de falta de lavado en el proceso de filtrado.

3.2.4. Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75.

La muestra concentrada obtenida en el paso anterior, se cromatografía con columna Superdex 75 HiLoad 26/60 (preparative grade) de GE-Pharmacia que previamente ha sido equilibrada con tampón sódico 5 mM (pH 7,5) y NaCl 0,14 M a una velocidad de 2,5 ml/min. Descontando los primeros 60 ml se recogen fracciones de 5 ml donde aparecen dos picos de proteína que se dializan frente agua Helix-Millipore por separado para

eliminar la lactosa, realizando 4 cambios de un volumen de 4 litros en 48 horas. Posteriormente se concentran las muestras en una celda de filtración Amicon, usando una membrana YM-10.

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

Para obtener la concentración de proteínas que tienen las fracciones proteicas recogidas durante la fase de extracción y purificación, así como para realizar el cálculo de la concentración de RIPs puras y de los extractos crudos utilizamos la fórmula propuesta por Kalb y Bernlohr (1977) que está basada en mediciones realizadas por espectrofotometría. La formula tiene la siguiente expresión:

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

siendo A_{230} , A_{320} y A_{260} las medidas de la absorbancia obtenidas de la muestra a las respectivas longitudes de onda 230, 320 y 260 nm. Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro Helios α .

3.4. Detección de la actividad aglutinante de eritrocitos.

La hematoaglutinación se estudió como se indica a continuación. Se emplean placas de 96 pocillos con fondo en U (Nunc), donde se realizan diluciones seriadas de 50 μl de la proteína con posible actividad lectina en cada pocillo y se mezclan bien con 50 μl de una suspensión de eritrocitos humanos suministrados generosamente por la Dra. Rosario del Villar (Hospital Universitario Río Ortega del Valladolid) al 1% (v/v) en tampón (NaCl 0,14M, fosfato monosódico 5mM (pH=7,5)), se deja reposar durante

20 minutos a temperatura ambiente. La comprobación de los resultados de aglutinación se realiza visualmente detectando el botón que se forma con las células rojas no aglutinadas en el fondo del pocillo. Cuando las células rojas se aglutinan se mantienen en suspensión.

3.5. Toxicidad en ratones.

La determinación de la actividad de las proteínas aisladas se realizó comprobando su toxicidad en ratones Swiss. Para ello se inyectó una dosis de 5 mg/kg de peso corporal en solución acuosa de ebulina f por vía intraperitoneal en tres ratones. Los animales antes y después del tratamiento se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso a comida (dieta de pellets Harlam 2014) y agua potable. Este mismo procedimiento se empleó para estudiar la posible toxicidad de la lectina SELfd.

3.6. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

El método empleado para realizar la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (EGPA-SDS) fue el tradicional de Laemmli (1970), como sigue. Se emplea un aparato Mighty-Small II de Hoefer con minigeles de 70 x 80 x 0,75, realizados con dos fases de concentración distinta de poliacrilamida. Para geles del 15% el gel separador se realiza con una mezcla de un 14,6%(p/v) de acrilamida y un 0,4% de bis-acrilamida, Tris-HCl 375 mM (pH=8,8), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,07 % (v/v). Para el gel de apilamiento se emplea 3,9 % (p/v) de acrilamida 0,1 % (p/v) bis-acrilamida, Tris-HCl 125 mM (pH=6,8), SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,08 % (p/v) y TEMED 0,08 % (v/v). Previo a la carga las muestras se incuban a 100° C durante 5 minutos 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. Una vez depositadas las muestras en los pocillos, se llenan con tampón de electroforesis los dos compartimentos de la cubeta y se establece una corriente de 25 mA de intensidad por gel, para tampón Tris-HCl 25 mM (pH=8,3), glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v). El proceso se realiza a 20° C de temperatura y concluye cuando el azul de bromofenol alcanza el borde inferior del gel.

Para la detección de las proteínas se emplea la tinción con colorante azul de Coomassie Brilliant Blue R-250. Esto se realiza sumergiendo el gel en una cubeta con una solución de 1% colorante en 50% metanol y 10% ácido acético filtrada previamente con dos capas de papel de filtro. Se dispone la cubeta en un agitador basculante Rocker 25 (Labnet) durante 14 horas a una agitación de 40 rpm y posteriormente se lava el gel con solución de desteñido preparado con 5% metanol y 7% ácido acético glacial. El gel se destiñe en el mismo agitador con cambios periodicos de la solución de desteñido hasta que la decoloración permita distinguir perfectamente las distintas bandas de las proteínas teñidas.

3.7. Digestión in vitro con pepsina.

La digestión con pepsina se realizó según el procedimiento que se indica a continuación. Las mezclas para la reacción se preparan con pepsina y las diferentes muestras de proteína en 0,075 ml de solución 0,02 N HCl y 6 mM NaCl, ajustando la relación substrato/pepsina a 0,3. Se realiza la digestión a 37° C en los tiempos marcados 30, 60 y 90 minutos. Se detiene la digestión mediante la adición de 0,027 ml de 200 mM carbonato sódico (pH final cercano a 11) e inmediatamente se agita. Se toma 0,018 ml de cada muestra que se mezcla con 0,006 ml de tampón de electroforesis

(concentrado 5 veces, conteniendo 40% glicerol, 20% dodecilsulfato sódico (SDS), 0.33 M Tris-HCl (pH 6.8) y 0.05% azul de bromofenol. Se hierven las muestras durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y se recogen 0,015 ml de muestra que se utiliza para análisis electroforético inmediato.

3.8. Determinación de la masa molecular de ebulina f y SELfd por espectrofotometría de masas.

La determinación de las masas moleculares de la ebulina f y la SELfd, se realizó tomando 1µl de muestra (3,8 µg/µl) y colocándolo sobre la placa de muestra blanco donde se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se coloca sobre la mancha de la muestra seca 0,5 µl de una solución saturada de ácido sinapínico en 30% acetonitrilo y 0,3% trifluoroacético, y se vuelve a dejar secar a temperatura ambiente. Se obtienen los espectros de masas de la muestra usando como estándar externo albúmina sérica bovina (BSA) con un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Farmacia-UCM) operado en modo linear positivo a un voltaje de aceleración de 20.000 V y una intensidad de disparo laser entre 20.000 y 150.000.

3.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masas y análisis de secuencias de péptidos trópicos.

La identificación de proteínas se realizó mediante péptidos trópicos. El tratamiento de las muestras para su análisis consistió en su reducción con 10 mM ditioneitol (DTT) en 24 mM bicarbonato amónico durante 30 minutos a una temperatura de 37 ° C. Posteriormente se someten a alquilación con 55 mM iodoacetamida en 25 mM bicarbonato durante 15 minutos en oscuridad. Por último las muestras se digieren con tripsina de

grado de secuencia (Roche Molecular Biochemicals) a una disolución de 1:20 en 25 mM bicarbonato amónico (pH= 8,5) durante toda la noche a una temperatura de 37° C. Terminada la digestión se coloca 1µl de la muestra digerida sobre la placa blanco MALDI y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación se añade 0,5 µl de una matriz de 3 mg/ml de ácido α -cyano-4-hidroxi-trans-cinámico (Sigma) a las manchas de péptidos de la muestra digerida y se deja secar a temperatura ambiente. Los análisis MALDI-TOF de espectrometría de masas se realizaron con un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems MDS Sciex, Toronto, Canada). Para la calibración interna de los espectros de masas se usaron péptidos de la auto-digestión de la tripsina. Aquellos péptidos de las huellas trípticas con un cociente señal/ruido mayor a 20 fueron capturados y se representaron en forma de lista, similar a una lista de pesos moleculares monoisotópicos.

La identificación de las proteínas se realizó usando la base de datos NCBI Viridiplantae (Green Plants, que contiene 1.716.557 secuencias), buscando homologías con MASCOT 2.3 a través de Global Protein Server v3.6 de Applied Biosystems. Los parámetros para la búsqueda fueron los estándar utilizados en el Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid:

- 1°.- Metionina oxidada como modificación variable.
- 2°.- Carbamidomethyl cisteína como modificación fija.
- 3°.- Tolerancia de masa peptídica 150 ppm (MS/MS).
- 4°.- Un sitio de rotura peptídica perdido.
- 5°.- Un estado de carga peptídica de +1.
- 6°.- Una tolerancia de fragmentos MS/MS de 0,4 Da.

Para todas las identificaciones de proteínas su cálculo de probabilidad fue mayor que las fijadas por MASCOT con una significación $p < 0,5$.

3.10. Obtención de nuestras para análisis histológico.

3.10.1. Perfusión de ratones Swiss.

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

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

3.10.2. Selección de piezas y toma de muestras.

Tomamos el animal fijado en la solución de paraformaldehído y lo lavamos bien con PBS, con tijeras y unas pinzas procedemos a separar y

cortar las diversas piezas que vamos a analizar que en este trabajo serán el pulmón, riñón, corazón, hígado, intestino delgado, intestino grueso y estómago. Con las piezas separadas se cortan los fragmentos que se incluirán en parafina colocándola en sus correspondientes *cassettes* de histología.

3.10.3. Inclusión en parafina.

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

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

3.10.4. Realización de cortes.

Para realizar los cortes de los tejidos incluidos en parafina partimos de los bloques formados con las piezas a los que hay que desbastar y aproximar a una forma de trapecio adecuada para poder trabajarlos con el microtomo. Los primeros cortes se realizan para aproximar la cuchilla a la zona de corte

del tejido y posteriormente se afina el grosor para sacar las muestras que se van analizar. Los cortes obtenidos son recogidos con un pincel y unas pinzas y se depositan durante 1 minuto en EtOH al 30 %, para luego pasarlos a un baño de agua caliente con gelatina al 1% que permitirá fijar las muestras en los portaobjetos. Se deja secar y se colocan en las gradillas de tinción.

3.10.5. Tinción con hematoxilina/eosina.

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

3.10.6. Análisis de los cortes por microscopía óptica.

Para realizar el análisis histológico de las muestras recibimos la inestimable ayuda del Prof. Gayoso del Departamento Biología Celular,

Farmacología e Histología (Universidad de Valladolid). Se utilizó un microscopio óptico Axiophot cam HRc Zeiss conectado a un ordenador Acer Aspire AMD 64, con el cual se realizó el estudio histológico y se obtuvieron gran número de fotografías que se incluyen en esta tesis. Los aumentos empleados fueron de 5, 10, 20 y 40 aumentos.

4. RESULTADOS.

4.1. Frutos de *S. ebulus* utilizados.

Las muestras de *S. ebulus* se recogieron en dos estadios de desarrollo, que aquí los denominaremos frutos pequeños y frutos grandes (figura 13b). En un gramo de frutos pequeños hay aproximadamente 90 unidades, mientras que en un gramo de frutos grandes hay 28 unidades.

Los primeros experimentos que se realizaron con frutos de *S. ebulus* demostraron que la presencia de ebulina f es dependiente del estadio de desarrollo (Citores y cols, 1998). En este trabajo hemos tratado de concretar la presencia tanto de ebulina f como de la lectina dimérica SELFd dependiendo del estado vegetativo de la planta. Dado el carácter arbustivo de la planta es probable encontrar en ejemplares cercanos e incluso en el mismo ejemplar una dispersión del tamaño de los frutos, por lo que, se establecieron como frutos grandes aquellos cuyos diámetros menores eran de 2,5-3 mm y diámetros mayores de 3,5-4 mm, para los frutos pequeños los diámetros menores eran de 1,5-2 mm y los mayores de 2,5-3 mm.

La obtención de ebulina f y de SELFd se realizó por cromatografía de afinidad (apartado 3.2.2.). Un factor muy importante es la eliminación del mucílago plástico muy pegajoso que se adhiere fuertemente a la superficie de los materiales empleados en la extracción y que está presente en todas las preparaciones de *S. ebulus*. Su eliminación se realiza en una primera fase durante la centrifugación del extracto, donde se deposita la mayor parte en el fondo de los tubos de centrifugación. El resto se adhiere al papel (Anoia de 73 g/m²) del filtro de doble capa que se utiliza para filtrar el sobrenadante de la centrifugación del extracto crudo.

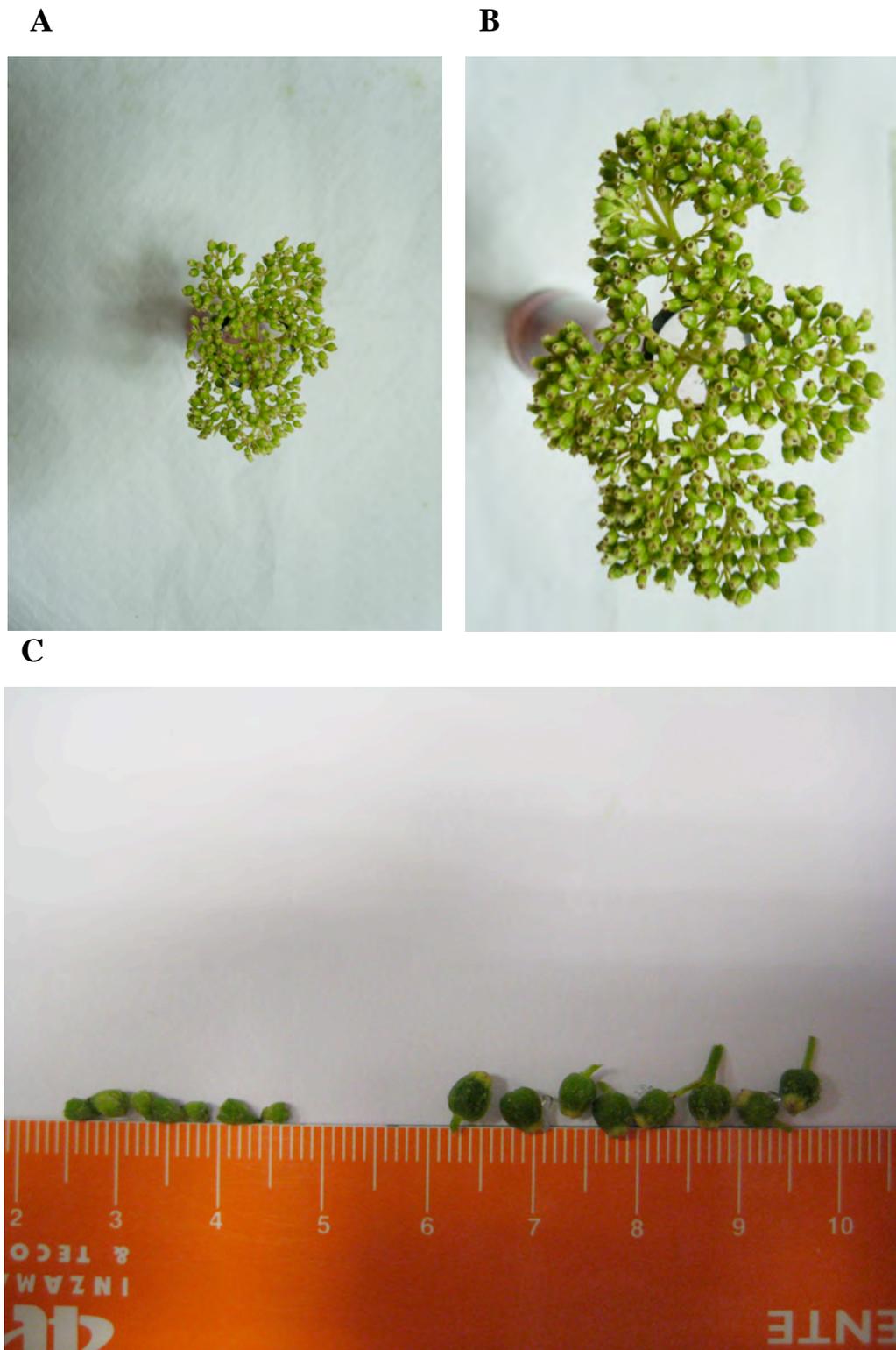


Figura 13. Frutos verdes de *Sambucus ebulus* L. En el panel A se muestran frutos verdes pequeños recogidos a principios de julio y en el panel B frutos verdes grandes recogidos a finales de julio ambos en Barruelo del Valle (Valladolid). En el panel C se comparan los frutos verdes grandes y pequeños.

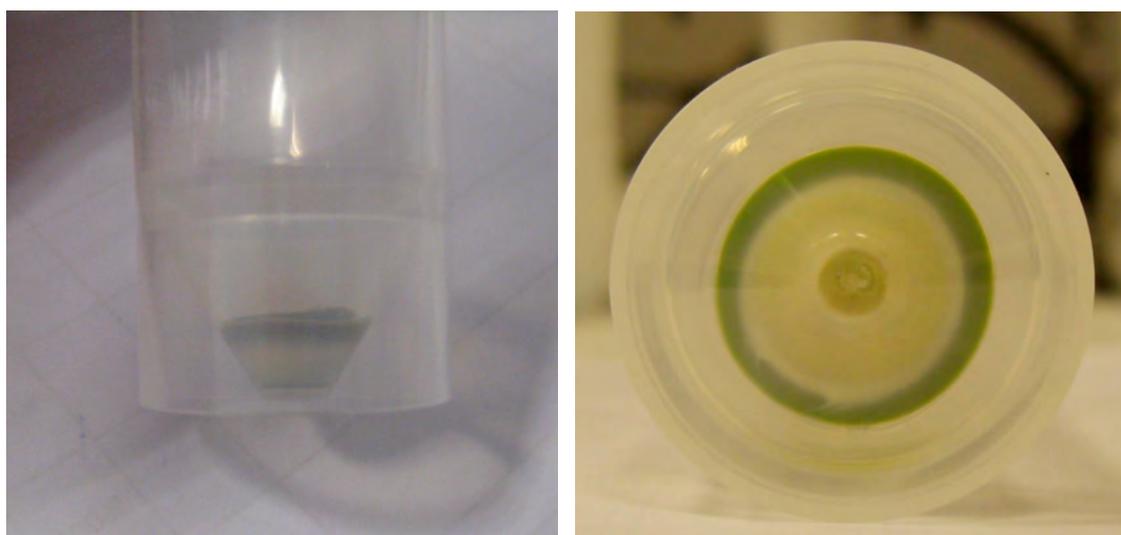


Figura 14. Sedimento obtenido en la 1ª centrifugación del extracto de frutos verdes de *S. ebulus* L. En el sedimento obtenido de la primera centrifugación se observan varias capas de distinto color. El fondo de color verde oscuro está constituido por partículas no retenidas por la grasa de filtrado. La capa central de color blanco constituida por un mucílago plástico muy pegajoso que se adhiere fuertemente a la superficie de los materiales empleados para la extracción y que está presente en todas las preparaciones de *S. ebulus* L., lo que hace necesario su eliminación previa del extracto.

Como se puede observar en las figuras 15A (frutos grandes) y la 15B (frutos pequeños) la única diferencia importante en ambos casos, fue la cantidad total de proteína por unidad de peso (200 gr de peso húmedo) en cada caso, que fue prácticamente el 39% más en los frutos pequeños que en los grandes.

La separación de las dos proteínas por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superdex 75, permitió su separación (apartado 3.2.3.), figura 16A (frutos grandes) y figura 16B (frutos pequeños). El rendimiento de ebulina en frutos pequeños fue de 59,33 $\mu\text{g}/\text{gr}$ y de 42,71 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en frutos grandes. El rendimiento de la lectinas SELfd en frutos pequeños fue de 161,15 $\mu\text{g}/\text{gr}$ y de 46,15 $\mu\text{g}/\text{gr}$ en frutos grandes.

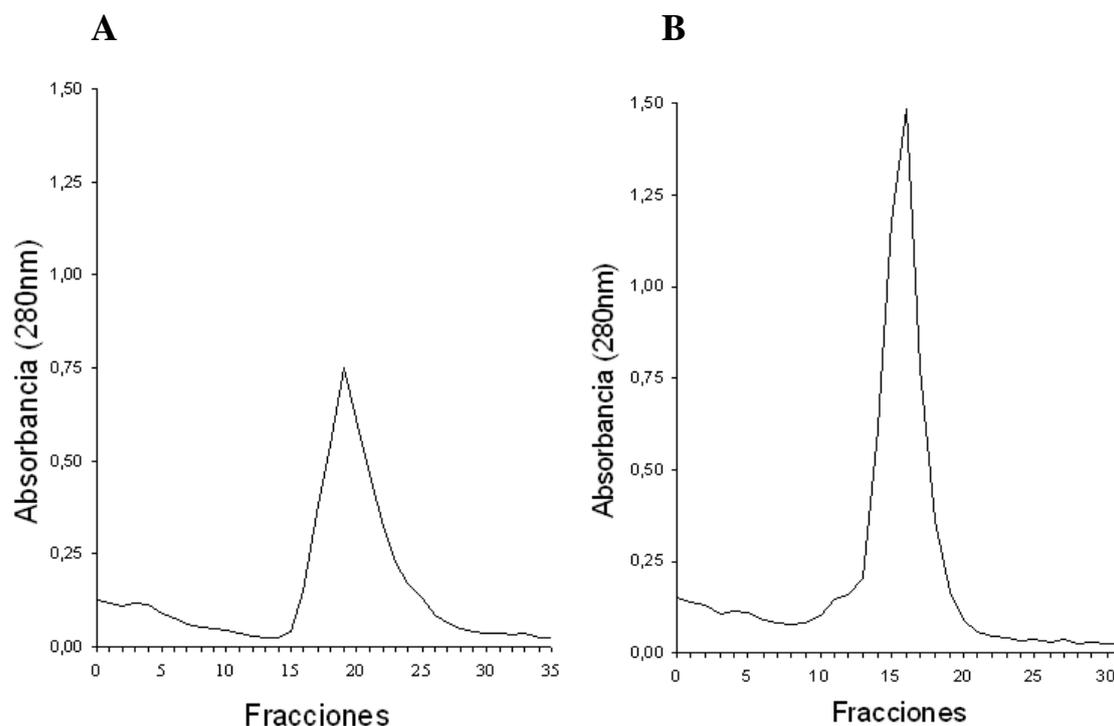


Figura 15. Comparación de perfiles de absorción de lectinas totales obtenido por cromatografía de afinidad en Sepharose 6B tratada con ácido (AT-Sepharose 6B) de extracto de frutos verdes. Partiendo de extracto crudo previamente filtrado con doble gasa para eliminar los restos de tejido vegetal y realizada una doble centrifugación, y filtrado a través de doble capa de papel de filtro para eliminar el mucílago contaminante, se aplica a una columna de cromatografía GE XK50 (5 x 10 cm) con 200 ml de gel AT-Sepharose 6B. Se lava la columna con tampón salino (5mM fosfato monosódico, 0,28 M NaCl (pH =7,5)) y se eluye la proteína retenida con el mismo tampón conteniendo 0,2 M de lactosa, recogiendo fracciones de 10 ml hasta que la absorbancia a 280 nm se estabiliza entorno a 0. Panel (a) frutos grandes y Panel (b) frutos pequeños.

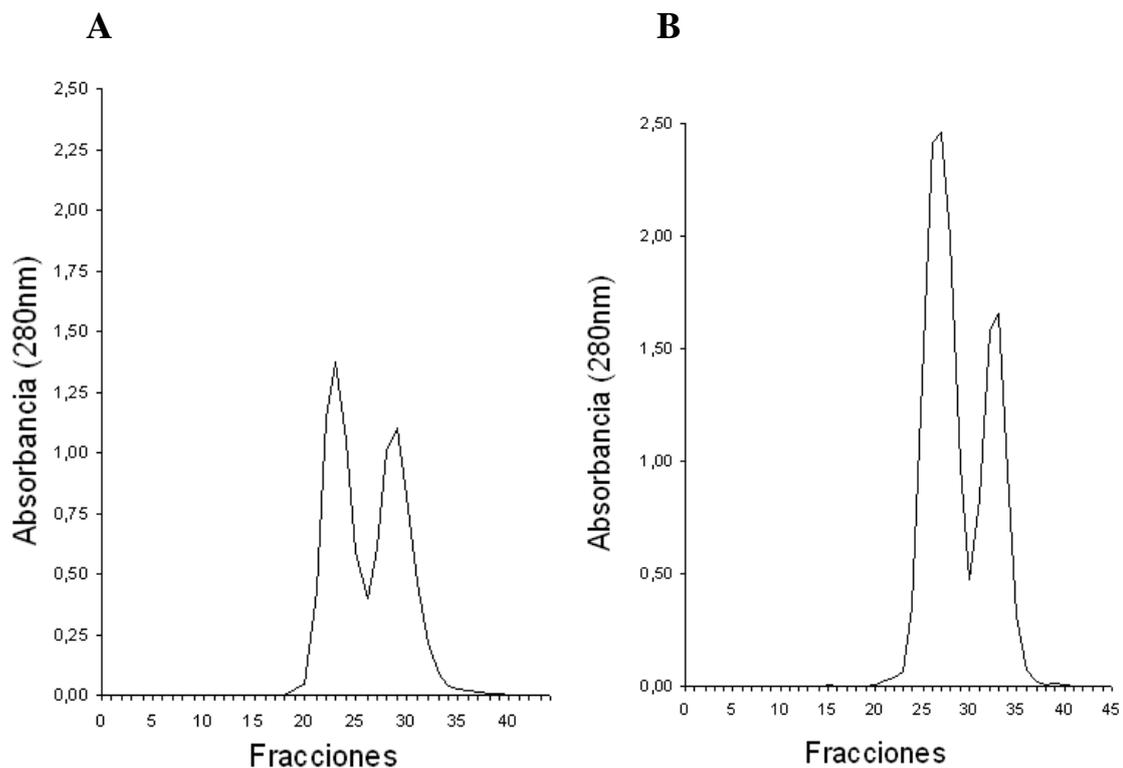


Figura 16. Comparación de perfiles de Cromatografía en Superdex 75 de las lectinas totales de *S. ebulus* L. aisladas por cromatografía de afinidad en frutos verdes. La proteína total extraída en la columna de afinidad es concentrada a un volumen de 5 ml y aplicada a una columna de cromatografía de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 (preparative grade) que se resolvió con tampón de elución (NaCl 0,14 M en 5 mM (pH 7,5)) a un flujo de 2,5 ml/min. Se descontaron los primeros 70 ml y se tomaron fracciones de 2,5 ml a las que se midió su absorbancia a 280 nm. Se juntaron las fracciones de cada lectina, y la mezcla se dializaron frente H₂O.

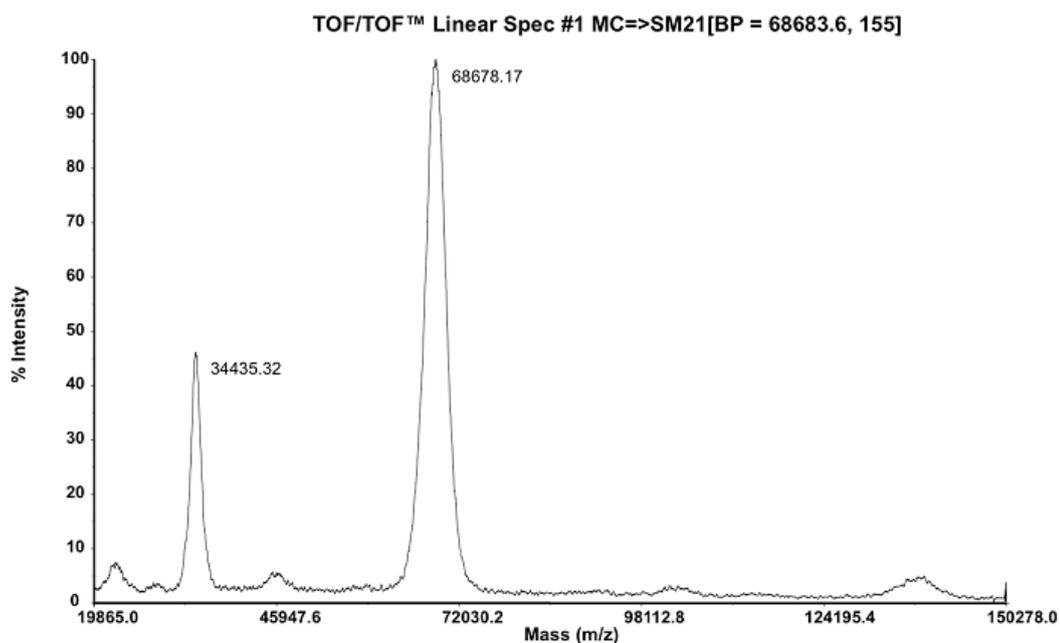
El comportamiento cromatográfico de ambas proteínas con las resinas utilizadas en las condiciones presentes de este trabajo es equivalente al descrito previamente utilizando frutos de *S. ebulus* menos caracterizados recogidos en el mes de septiembre (Citores y cols, 1998) .

El análisis de los perfiles cromatográficos de exclusión molecular indica que la poliebulina descrita previamente de frutos recogidos en septiembre (Citores y cols, 1998) no está presente en frutos grandes o pequeños recogidos en julio, y por otro lado, indica que las cantidades de ebulina f y SELfd son relativamente similares en contraste con lo que se obtiene en los frutos de septiembre, en donde, la relación lectina-ebulina es cercana a 9 (Citores y cols, 1998).

4.2. Determinación de masas moleculares de ebulina f y SELfd.

Para determinar la masa molecular absoluta se utilizó la espectrometría de masas, mediante el procedimiento MALDI-TOF. Como se indica en la figura 17A, la masa molecular de la SELfd es 68.678,17 un valor muy cercano al obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS en condiciones no reductoras (Citores y cols, 1998). Por otro lado, se obtuvo una masa molecular de 58.904,58 para la ebulina f, figura 17B, en condiciones no reductoras muy cercana a la obtenida por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS en condiciones no reductoras.

A) SELfd



B) ebulina f

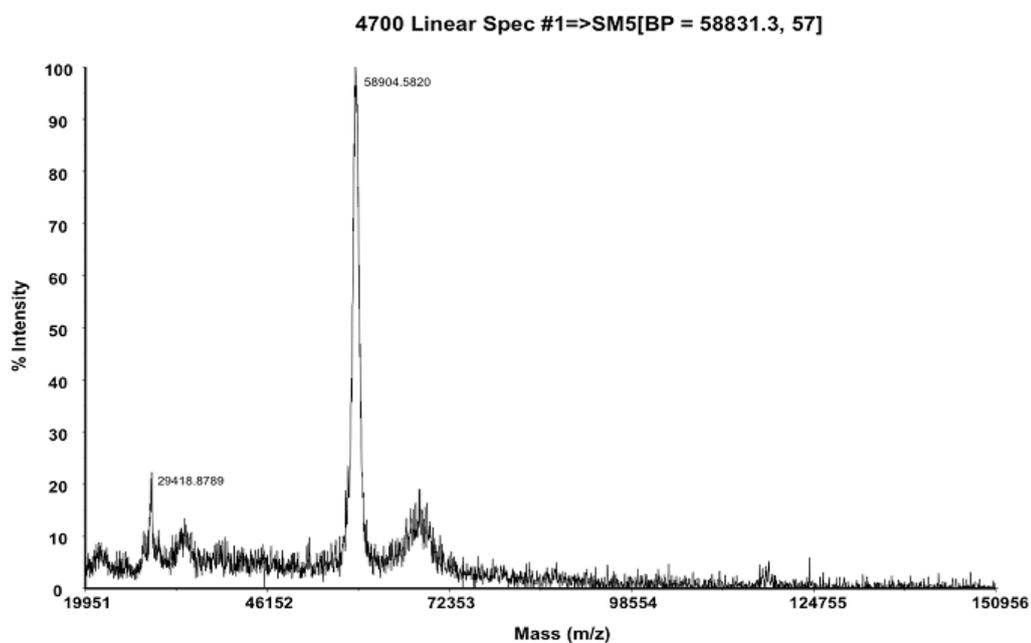
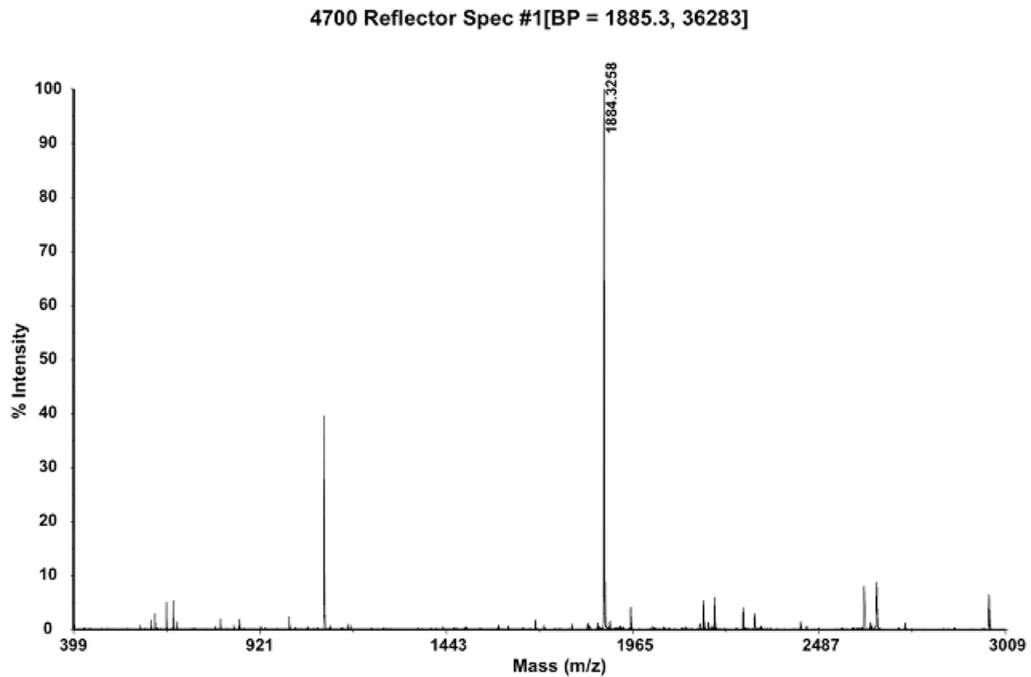


Figura 17. Espectros MALDI- TOF/TOF de SELfd (A) y ebulina f (B). Para realizar la espectrometría de masas se empleó el procedimiento MALDI-TOF/TOF que fue operado en modo linear positivo a un voltaje de 20.000 V y una intensidad de disparo laser de entre 20.000 y 150.000. Para el estandar se empleó albumina sérica bovina.

4.3. Determinación de péptidos trípticos de ebulina f y SELfd.

Para una mejor caracterización de ambas proteínas se procedió a determinar la huella peptídica mediante la obtención de péptidos mediante digestión tríptica. En las paneles 18A y 18B se muestran los péptidos trípticos de la SELfd y de la ebulina f. Como puede observarse son claramente diferentes. Los dos péptidos más abundantes en la SELfd son de 1.884,3258 y 1.100,4993 respectivamente y los péptidos más abundantes de la ebulina f a destacar son 1.434,6665 / 2.016,0496 / 1.588,8638 / 1.513,8033 / 1.456,6393.

A) SELfd



B) ebulina f

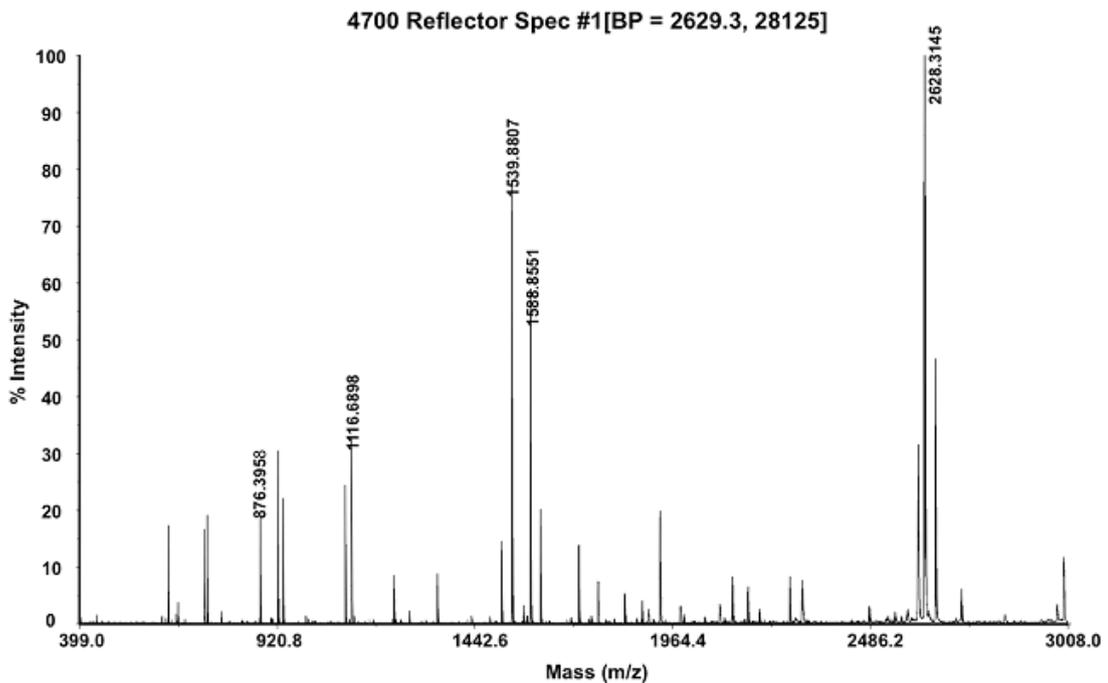


Figura 18. Huellas tríplicas de SELfd (A) y ebulina f (B). Para obtención de las huellas tríplicas de las dos lectinas se realizó su digestión con tripsina a una dilución de 1:20 en 25 mM bicarbonato amónico (pH = 8,5) durante toda una noche a temperatura de 37° C. La espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó con material digerido en una matriz de α -cyano-4-hidroxi-trans-cinamico.

4.4. Secuenciación de péptidos trípticos y comparación con secuencias de base de datos NCBI Viridiplantae (Green Plants).

Para poder comparar nuestras proteínas con secuencias de las bases de datos se procedió a secuenciar diversos péptidos trípticos de ebulina f y SELFd mediante espectrometría de masas en el servicio de secuenciación de la unidad de proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Como se indica en la figura 19A, se secuenciaron los péptidos 2.628 / 1.539 / 1.588 / 876 y 1.116 de la digestión tríptica de la ebulina f. De la SELFd se secuenció el péptidos 1.584, figura 19B.

A) ebulina f

Masa	Secuencia
2.628,2944	ESDVSLQEVIIFPATGNPNQQWR
1.539,88	SLLVLIQMVPEAAR
1.588,8633	VATGTYEVNGLPVL
876,39	DGLCVDVR
1.116,6975	ITGIAILLFR

B) SELFd

Masa	Secuencia
1.884,32	EIIFPATGNPNQKWR

Figura 19. Masas moleculares y secuencias de algunos péptidos trípticos aislados de SELFd y ebulina f. Se muestra la secuenciación obtenida por espectrometría de masas de algunos péptidos trípticos de SELFd en la figura 21 y ebulina f que en la figura 20.

En todos los casos, se introdujeron las secuencias en la base de datos NCBI BLAST. Los resultados de la búsqueda para la ebulina f se muestran en la figura 20. Ebulina f encaja con la secuencia de ebulina l de brotes y hojas maduras de *S. ebulus* con número de secuencia gi-13171073. Los péptidos de SELfd (figura 21) encajan con la proteína SNAIm de las hojas de *Sambucus nigra* con secuencia gi-26793998.

```

1 MRVVKAAMLY LHIVVLAIYS VGIQGIDYPS VSFNLAGAKS TTYRDFLKNL

51 RDRVATGTYE VNGLPVLRR E SEVQVKNR FV LVRLTNYNGD TVTSAVDVTN
101 LYLVAFSANG NSYFFKDATE LQKSNLFLGT TQHTLSFTGN YDNLETAAGT
151 RRESIELGPN PLDGAITSLW YDGGVARSL L VLIQMVPEAA RFRYIEQEV R
201 RSLQQLTSFT PNALMLSMEN NWSMSLE VQ LSGDNVSPFS GTVQLQNYDH
251 TPLVDNFEE LYKITGIAIL LFRCVATKT T HNAIRMPHVL VGEDNKFNDG
301 ETCAIPAPFT RRIVGRDGL C VDVRNGYD T D GTPIQLWPCG TQRNQQWTFY
351 NDKTIRSMGK CMTANGLNSG SYIMITDC ST AAEDATKWEV LIDGSIINPS
401 SGLVMTAPSG ASRTTLLEN NIHAASQGW T VSNDVQPIAT LIVGYNEMCL
451 QANGENNVW MEDCDVTSVQ QQWALFDD RT IRVNNRGLC VTSNGYVSKD
501 LIVIRKCQGL ATQRWFFNSD GSVVNLKSTR VMDVKESDVS LQEVIIIPAT
551 GNPNQWR TQ VPQI

```

Figura 20. Alineación de las secuencias de los péptidos de ebulina f con ebulina l. Para la alineación de los péptidos trípticos de ebulina f se empleó la secuencia de la lectina ebulina l presente en las hojas de *S. ebulus* L., que se encuentra depositada en la base de datos NCBI Viridiplantae (Green Plants), buscando con MASCOT 2.3 homologías a través de Global Protein Server v3.6 de Applied Biosystems. Marcamos en rojo las secuencias de los péptidos secuenciados.

```

1 MRVVAAAMLC LYIVVLAICS VGIQGIDYPS VSFKFNAIRM PHDLVGEDNK

51 FNDGEPFTRH IIGRDGLCVD ARTGCDIQLW PCGSQTSQQW TFYEDGTIRS
101 MGKCM TANGF NSGSYIMIFD CSSATEDATK WDV TIDGSII NLSSVLVMTS
151 PSRASGTALV LDNNILAASQ GWTVSNGVQP NVT LIVGYNN MCLKANGENN
201 KVWMENCVST SVQQQWVLF G DRTIRVNSNR DLCLTSSGHV SKDIIISFKC
251 QGLLTQRWFF KSDGSIVNPN TTLVMDVKGS DVSLREIIIF PATGNPNQKW
301 RTEVLPS

```

Figura 21. Alineación de las secuencias de los péptidos de SELfd con SNAId. Para la alineación de los péptidos trípticos de SELfd se empleó la secuencia de la lectina SNA1d presente en las hojas de *S. nigra* L., que se encuentra depositada en la base de datos NCBI Viridiplantae (Green Plants), buscando con MASCOT 2.3 homologías a través de Global Protein Server v3.6 de Applied Biosystems. Marcamos en rojo las secuencias de los péptidos secuenciados.

4.5. Actividades biológicas.

4.5.1. Hemoaglutinación.

La obtención de ebulina f y SELfd por cromatografía de afinidad permite que el producto final (las proteínas purificadas) sean aquellas que presentan afinidad por D-galactosa mientras que las que no poseen actividad no se aíslan. La actividad biológica característica de la ebulina f es la inhibición de la síntesis de proteínas y la depurinación de ácidos nucleicos. Otra actividad característica compartida con la SELfd es la interacción con D-galactosa. Dado que la inhibición de síntesis de proteínas y la depurinación de ácidos nucleicos son procesos complejos y caros, se determinó la actividad biológica de ambas proteínas por la aglutinación de eritrocitos humanos O⁺, como se muestra en la figura 22, y por toxicidad como se verá más adelante.

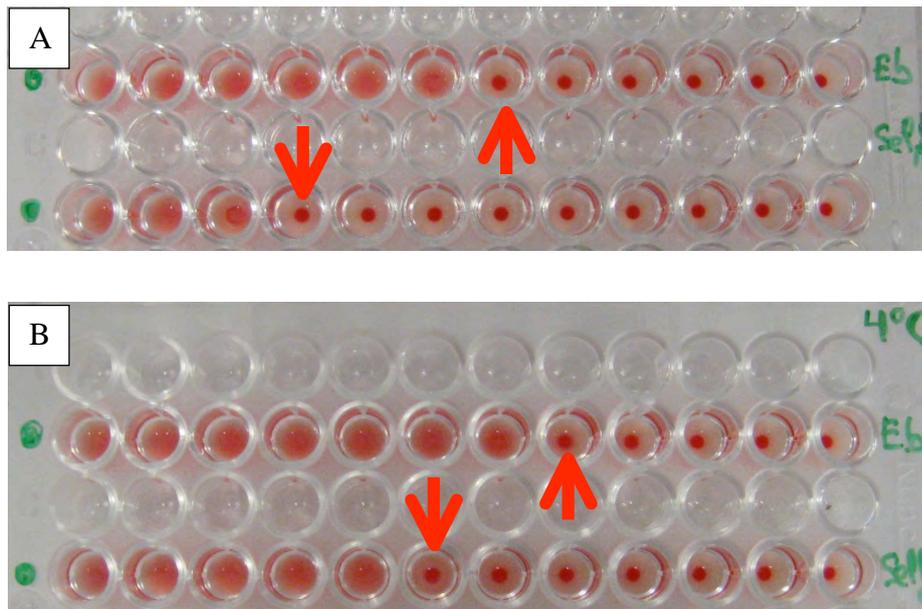


Figura 22. Actividad aglutinante de las lectinas de frutos de *S. ebulus* L. Para la determinación de la actividad hemoaglutinante de las lectinas de los frutos verdes de *S. ebulus* L. se emplearon eritrocitos humanos O⁺ siguiendo el procedimiento de las diluciones, a las temperaturas de 22° C (A) y 4° C (B). La aglutinación total queda indicada por las flechas.

La ebulina f promueve la aglutinación total a 0,0222 mg/ml y SELfd lo hace a 0,1780 mg/ml en ambos casos a temperatura ambiente. Citores y cols, (2008) describieron que la interacción de las lectinas de hojas de *S. ebulus* con una matriz densa de D-galactosa como la presente en la AT-Sepharose 6B estaba influida por la temperatura siendo máxima a temperatura de 0°C y mínima a 20°C. Nosotros ensayamos la aglutinación a 4°C y encontramos que ebulina aglutina a 0,0111mg/ml y la lectina a 0,223 mg/ml, lo que demuestra que la dependencia de la interacción de estas proteínas con matrices densas de D-galactosa se observa también cuando se utilizan células de la sangre, y por lo tanto estas proteínas interaccionan con los galactósidos de membrana en una forma que es dependiente de la temperatura.

4.5.2. Sensibilidad a pepsina de ebulina f y SELfd.

Como se ha indicado en la introducción las lectinas de *S. ebulus* poseen homología secuencial con el alérgeno Sam n1 (Förster-Waldl, 2003), por lo tanto, si estas lectinas tuviesen actividad alérgica al ingerirse podrían considerarse como alérgenos alimentarios. Para determinar si estas lectinas son capaces de atravesar el tracto gástrico se determinó su digestibilidad con pepsina en medio ácido. Como se indica en la figura 23, la SELfd presenta una resistencia notable a la acción de la pepsina en medio ácido en condiciones (hasta 90 minutos) en las cuales, la albúmina sérica bovina utilizada como control de la actividad enzimática, se degrada totalmente. En contraste la ebulina f (figura 24), es sensible a la pepsina mostrando una degradación importante ya a los 30 minutos.

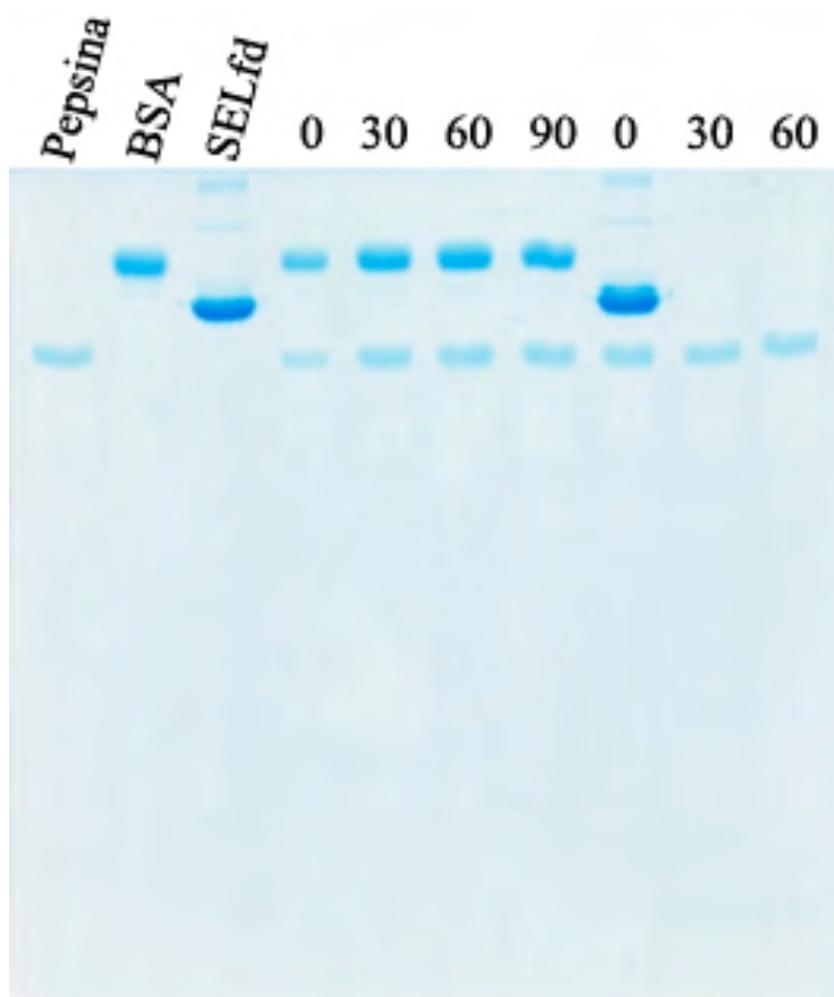


Figura 23. Pepsinólisis de SELfd. Las mezclas de reacción con SELfd se incubaron a 37° C con pepsina en medio ácido y salino simulando fluido gástrico. Se utilizó albúmina sérica bovina como control durante los tiempos indicados en la figura. La reacción se detuvo mediante neutralización con carbonato sódico, y los productos de reacción resultantes se analizaron mediante electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS.

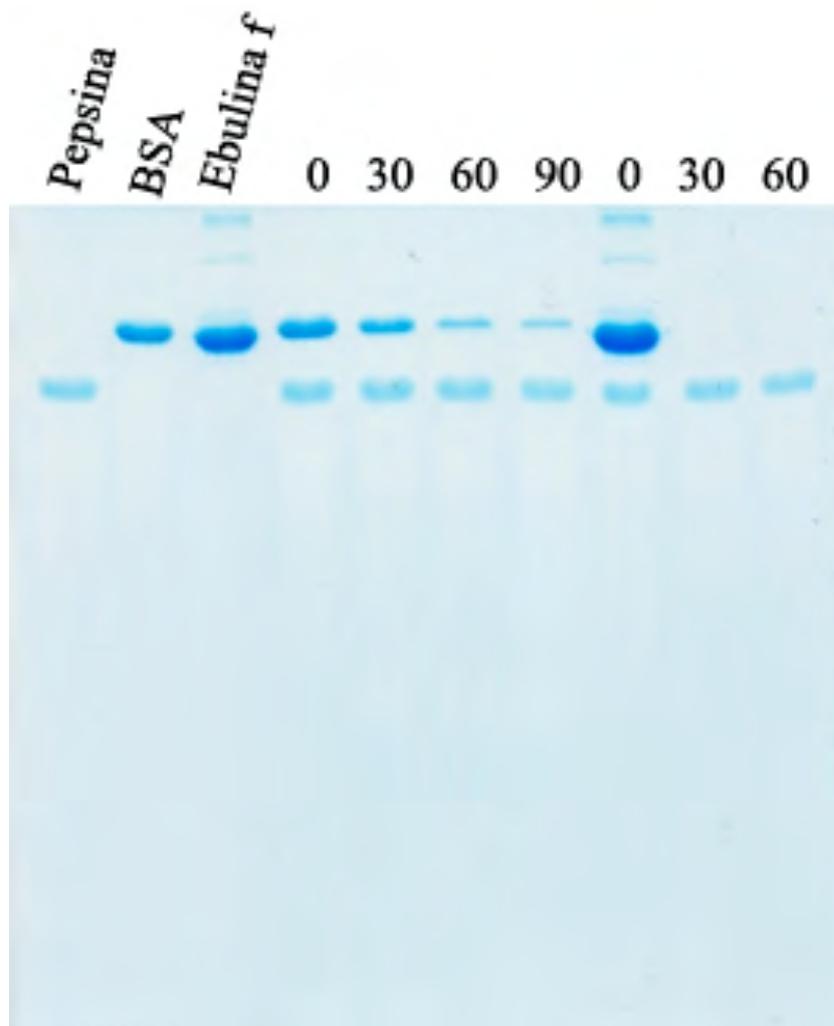


Figura 24. Pepsinolisis de ebulina f. Las mezclas de reacción con ebulina f se incubaron a 37° C con pepsina en medio ácido y salino simulando fluido gástrico. Se utilizó albúmina sérica bovina como control durante los tiempos indicados en la figura. La reacción se detuvo mediante neutralización con carbonato sódico, y los productos de reacción resultantes se analizaron mediante electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS.

Estos resultados indican que si bien la ebulina f pudiera degradarse en los tiempos normales de digestión, SELfd no lo haría y en estas circunstancias la ebulina f no podría considerarse como alérgeno alimentario suficientemente activo como para desencadenar el cuadro descrito para las alergias a *S. nigra* (Förster-Waldl, 2003), mientras que SELfd si podría serlo.

4.6. Toxicidad de ebulina f y SEL_{fd} en ratones Swiss.

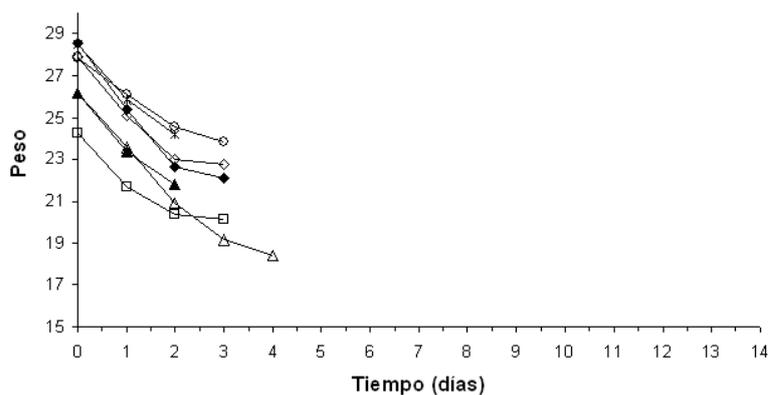
4.6.1. Supervivencia de ratones a la administración intraperitoneal de ebulina f.

Los frutos de *S. ebulus* se han considerado tradicionalmente como tóxicos y han llegado a observarse intoxicaciones fatales sobretodo en niños (Font-Quer, 1998; y el presente trabajo). Se ha especulado que la causa de la toxicidad pudiera ser debida a la lectina antirribosómica presente en los mismos, y que se encuentra en su máxima concentración en frutos verdes (Cítores y cols, 1998). Para determinar la toxicidad de ebulina f en ratones Swiss se procedió a la administración intraperitoneal a una serie de ratones a diferentes concentraciones. Como se indica en la figura 25, la administración de 5 mg/kg de peso corporal de ebulina f, provoca un efecto tóxico agudo que provoca la muerte de los ratones ya al segundo día y los mata a todos al 4º día. La reducción de peso (30% de pérdida) es muy notable y se produce de manera continua hasta la muerte de los ratones.

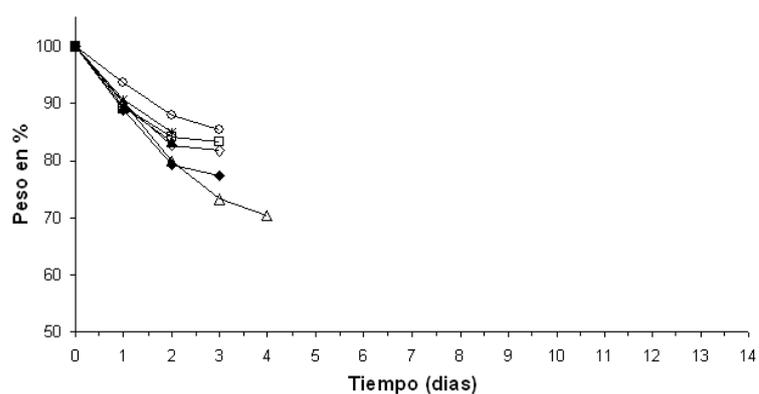
La administración de 3,12 mg/kg de peso corporal de ebulina f (figura 26), empieza a matar a los ratones a los 3 días y concluye a los 9, con una pérdida de peso continua hasta los 7 días, a partir de los cuales, desciende bruscamente hasta la muerte de los ratones.

En la figura 27 se muestran los resultados obtenidos con la administración de 2,81 mg/kg de peso corporal de ebulina f con resultados similares.

A



B



C

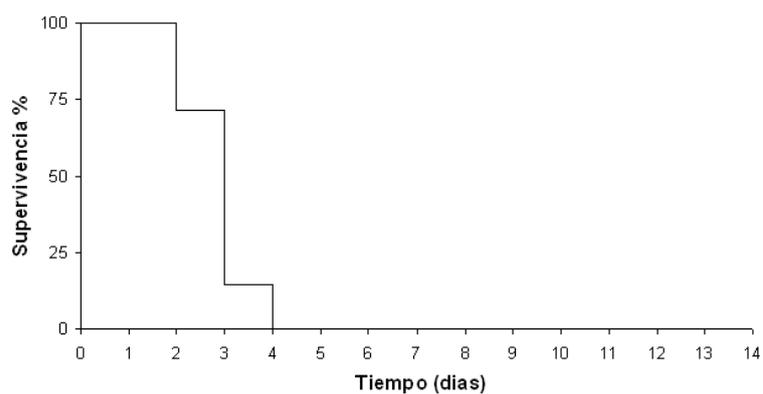


Figura 25. Variación de peso (A-B) y supervivencia (C) de ratones Swiss hembra después de la administración de 5,0 mg/kg de ebulina f por vía intraperitoneal. A: peso (g) de una serie de 7 ratones; B: las variaciones de peso en (%); C: representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de la serie de ratones.

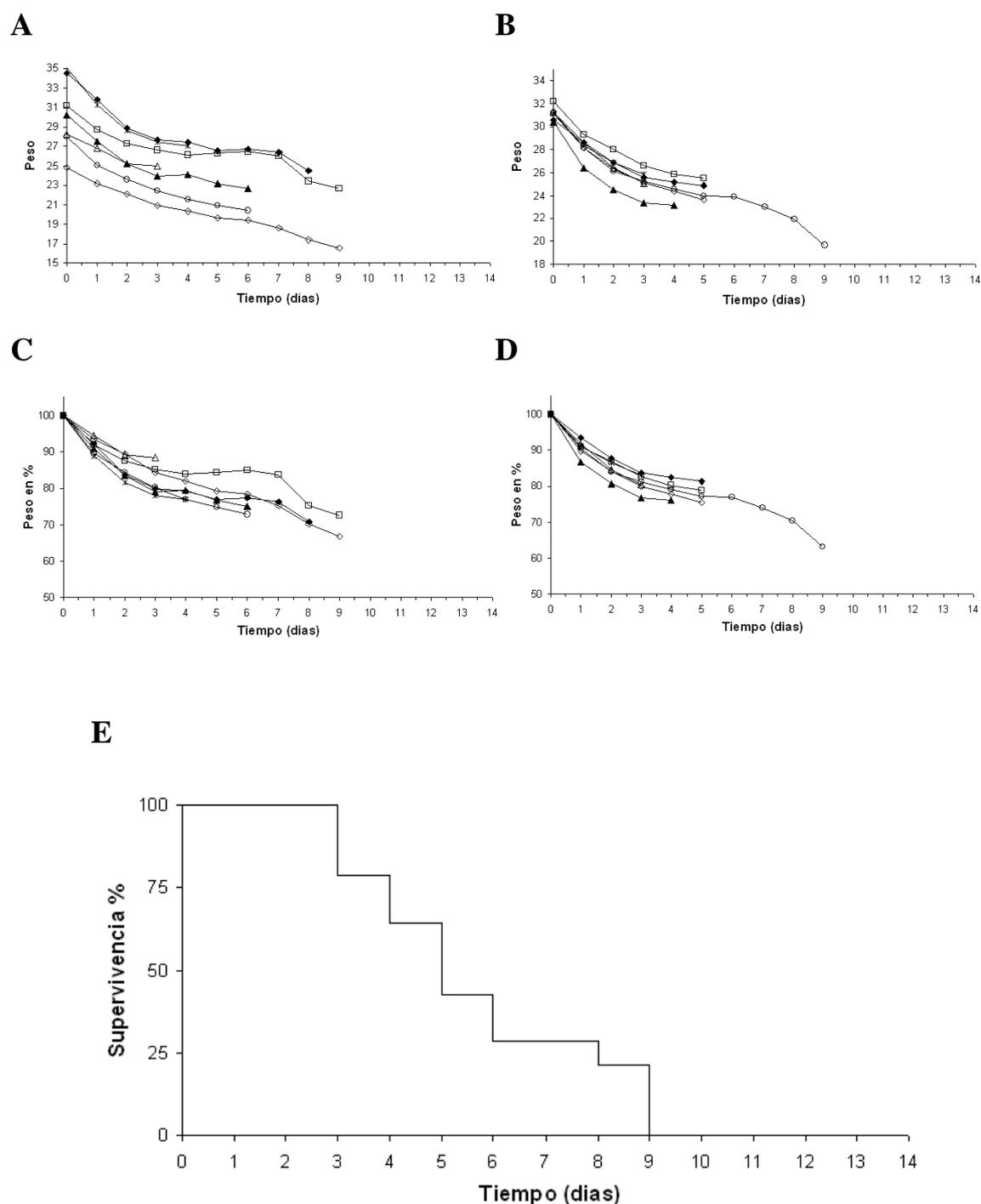
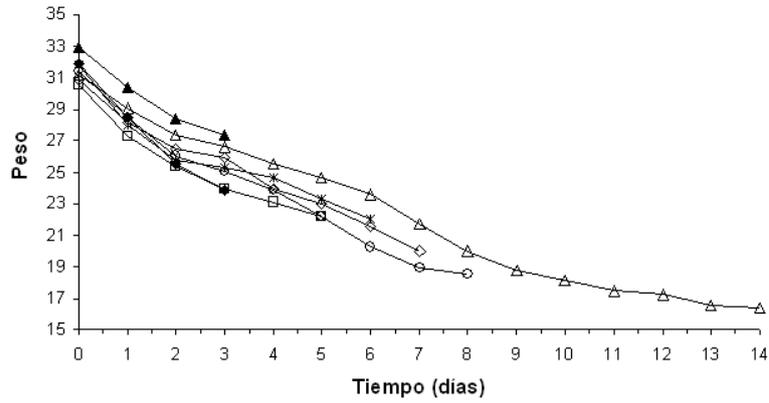
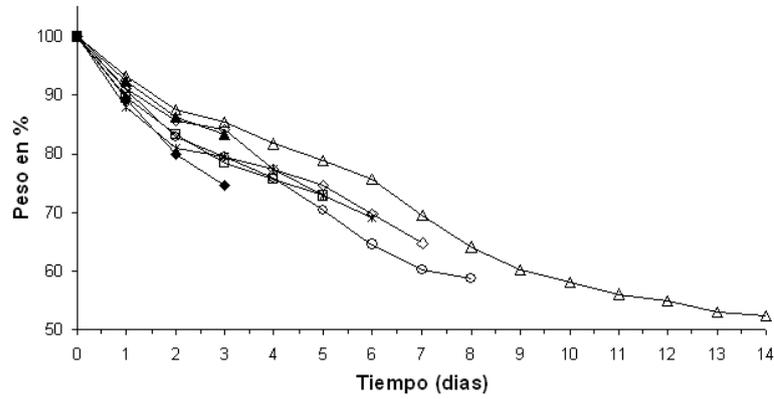


Figura 26. Variación de peso (A-D) y supervivencia (E) de ratones Swiss hembra después de la administración de 3,12 mg/kg de ebullina f por vía intraperitoneal. A: y B: peso (g) de dos series de 7 ratones cada una; C: y D: las variaciones de peso en (%); E: representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de las dos series de ratones.

A



B



C

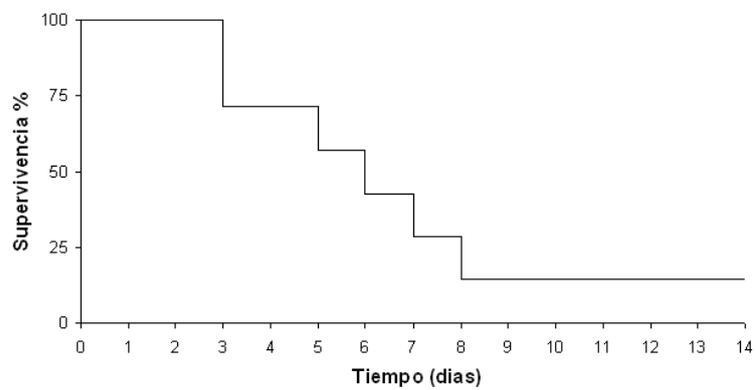


Figura 27. Variación de peso (A-B) y supervivencia (C) de ratones Swiss hembra después de la administración de 2,81 mg/kg de ebulina f por vía intraperitoneal. A: peso (g) de una serie de 7 ratones; B: las variaciones de peso en (%); C: representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de la serie de ratones.

Finalmente, en la serie de ratones que se les administró 2,5 mg/kg de ebulina f sólo murió uno a los 11 días (figura 28). No obstante se observó también una reducción de peso rápida en los dos primeros días, que llega a un *plateau* para después descender bruscamente, y tender a la recuperación.

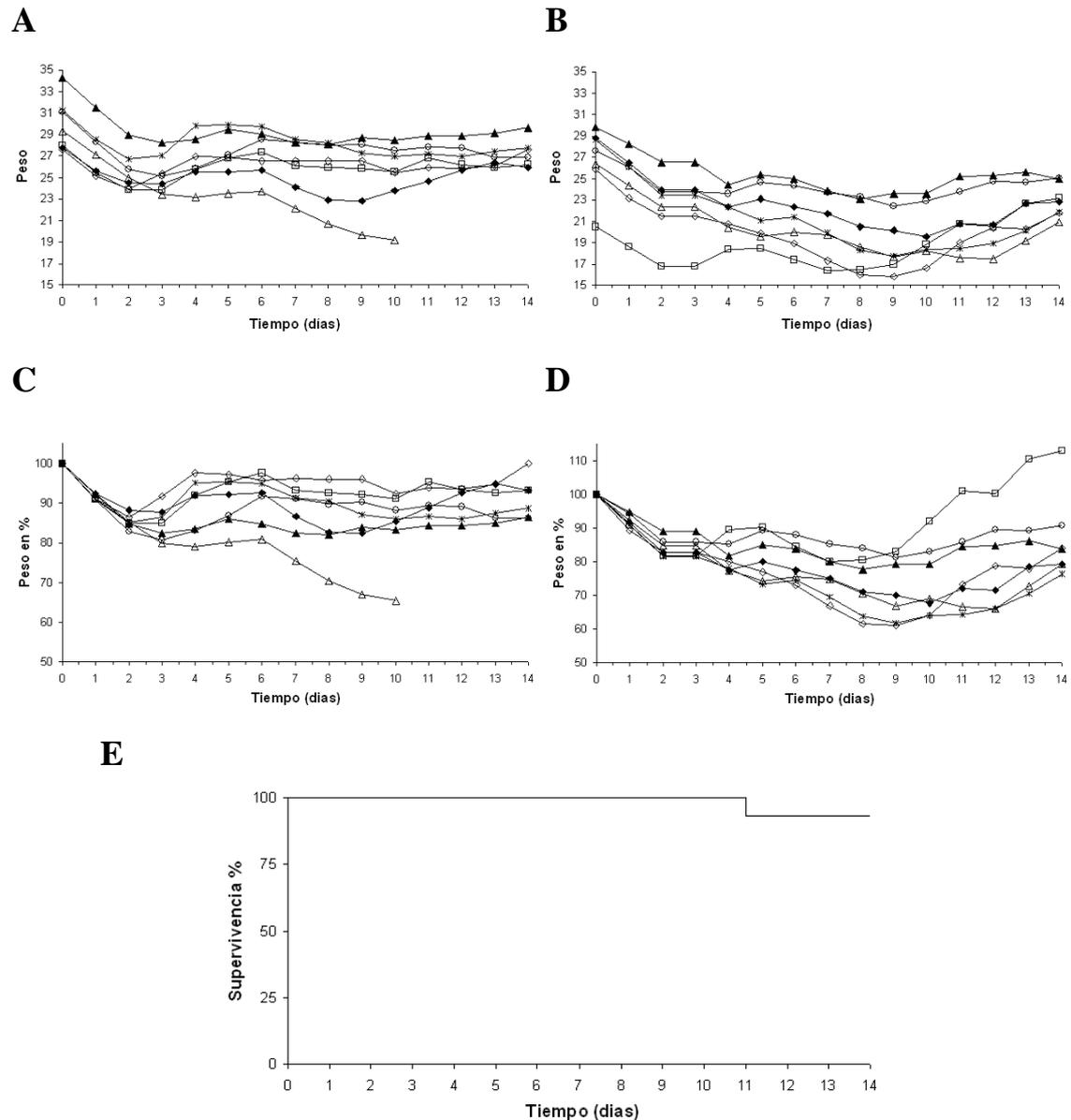


Figura 28. Variación de peso (A-D) y supervivencia (E) de ratones Swiss hembra después de la administración de 3,12 mg/kg de ebulina f por vía intraperitoneal. A: y B: peso (g) de dos series de 7 ratones cada una; C: y D: las variaciones de peso en (%); E: representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de las dos series de ratones.

4.6.2. Supervivencia de los ratones a la administración por vía oral de ebulina f.

Se estudió también el efecto de la ebulina f por vía oral en ratones. Los resultados preliminares nos indicaron que pudiera haber diferencias de sensibilidad a la ebulina f entre machos y hembras, por ello, se estudiaron series de ratones, en este caso de 21 hembras y 23 machos, para determinar con mayor claridad los efectos potencialmente tóxicos de ebulina f en relación con la administración intraperitoneal, dónde en general se han realizado series de 7 ratones. Como se muestra en la figura 29, la administración oral de ebulina f provoca la muerte del 50% de los ratones hembra entre los 3 y 9 días, con una fuerte reducción del peso desde el mismo momento de la administración de la ebulina f y con un descenso continuo durante los 10 primeros días.

Como se muestra en la figura 30, el resultado con machos fue ligeramente diferente, mostrando mayor resistencia a ebulina f de manera que murieron sólo el 40% de los ratones entre los 4 y los 8 días, con una reducción de peso continua desde el inicio hasta los 8 días. Finalmente en la figura 31 representamos la supervivencia a la administración vía oral de 5 mg/kg de ebulina f en machos y hembras, así como los pesos acumulados de todos los ratones.

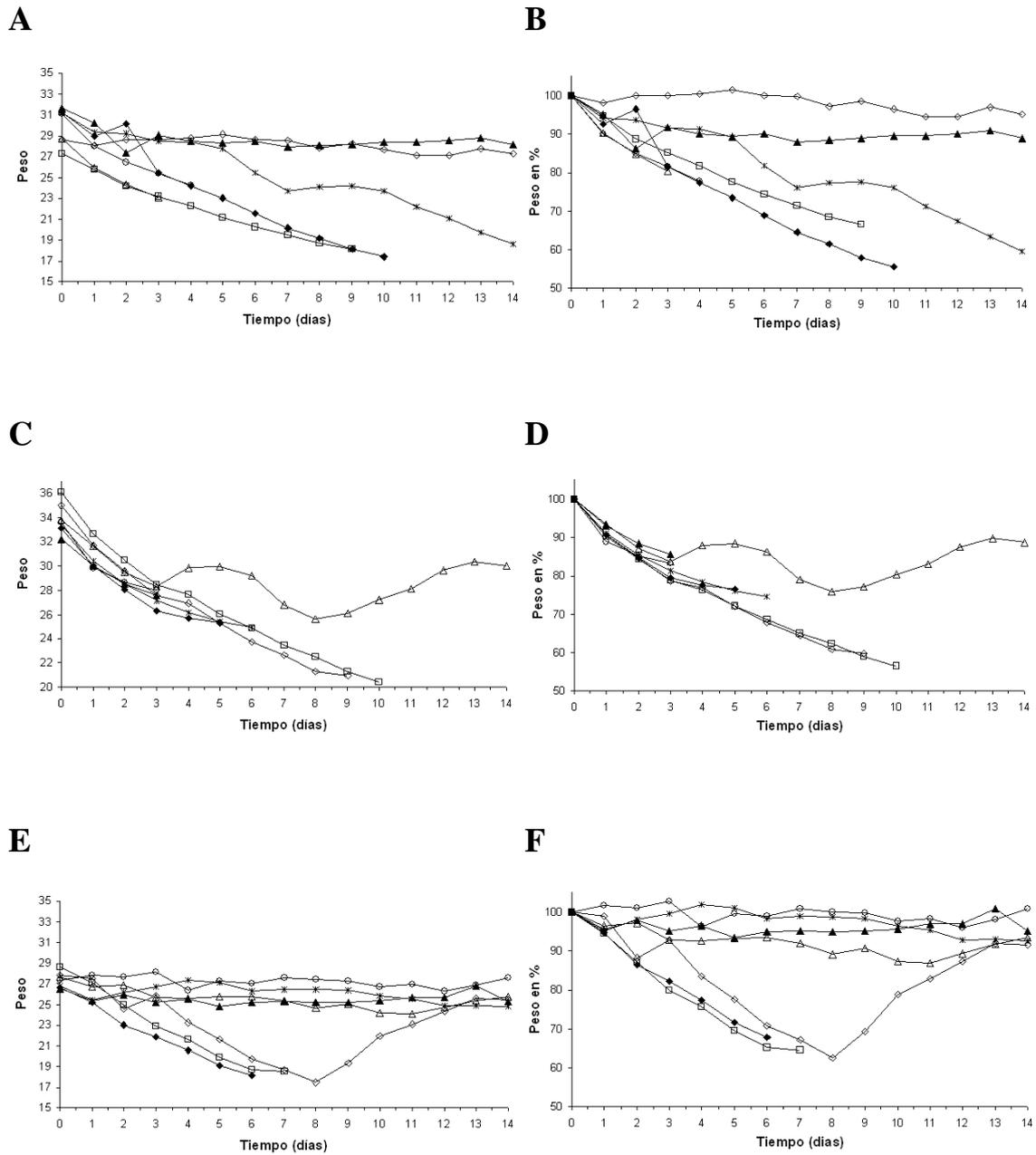


Figura 29. Variación de peso de ratones Swiss hembra después de la administración de 5,0 mg/kg de ebullina f por vía Oral. A, C y E: peso (g) de tres series de 7 ratones cada una; B, D y F: las variaciones de peso en (%).

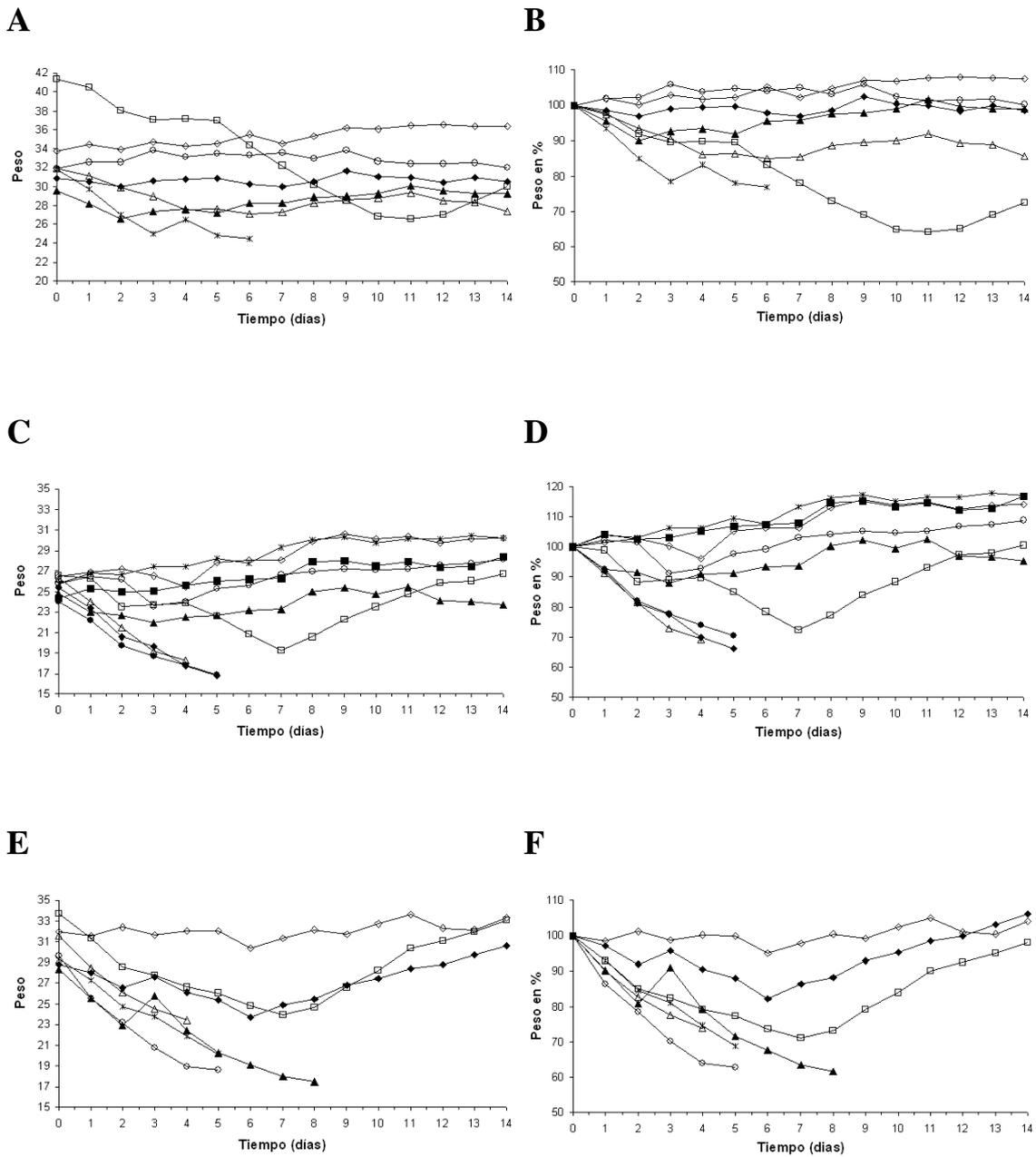


Figura 30. Variación de peso de ratones Swiss macho después de la administración de 5,0 mg/kg de ebulina f por vía Oral. A., C. y E: peso (g) de dos series de 7 ratones y una de 9; B., D. y F: las variaciones de peso en (%).

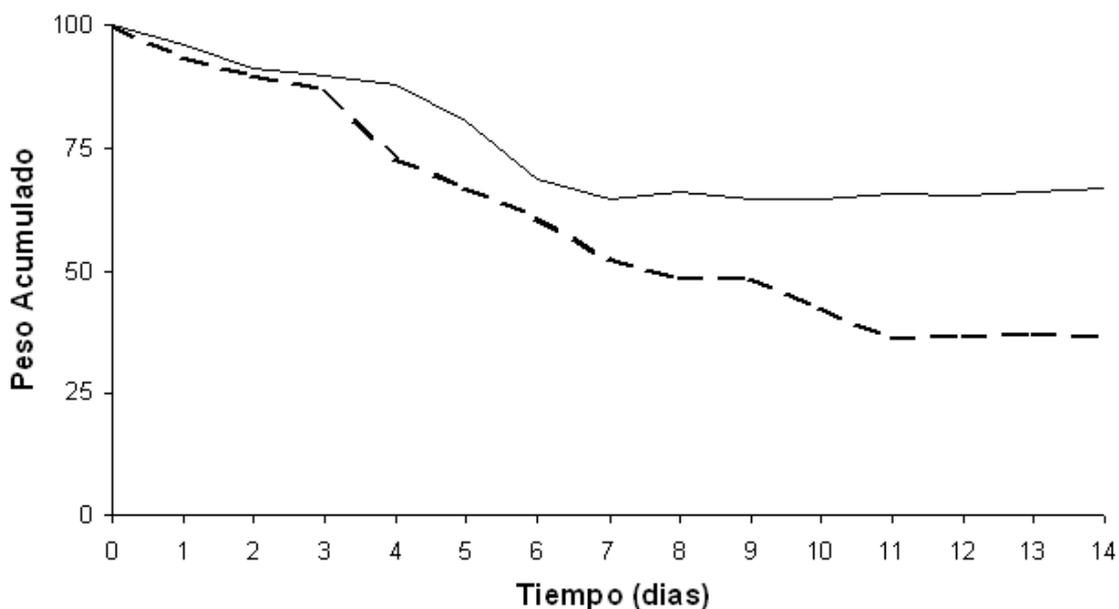
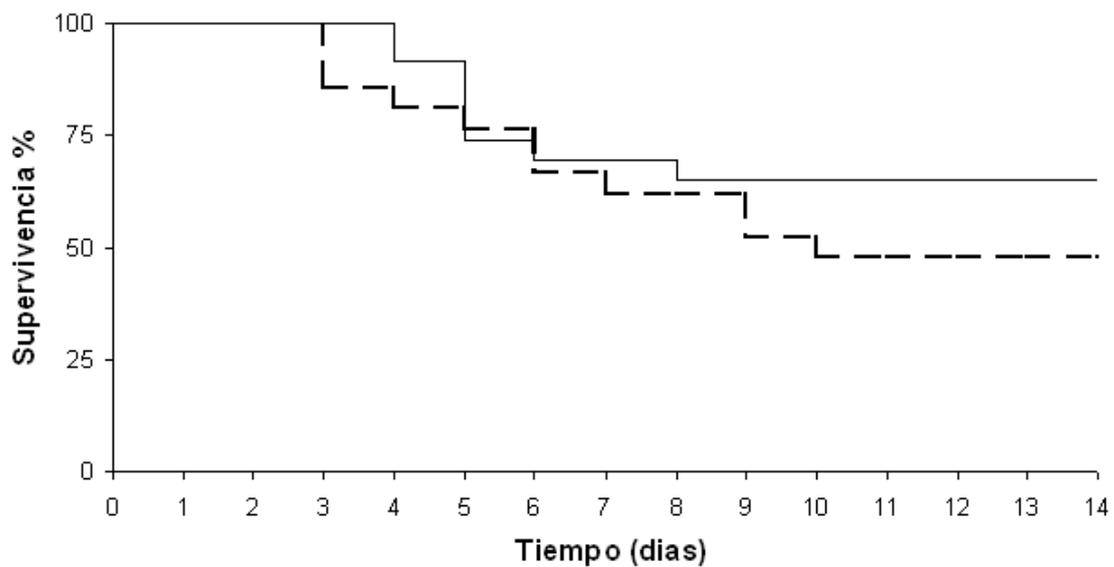
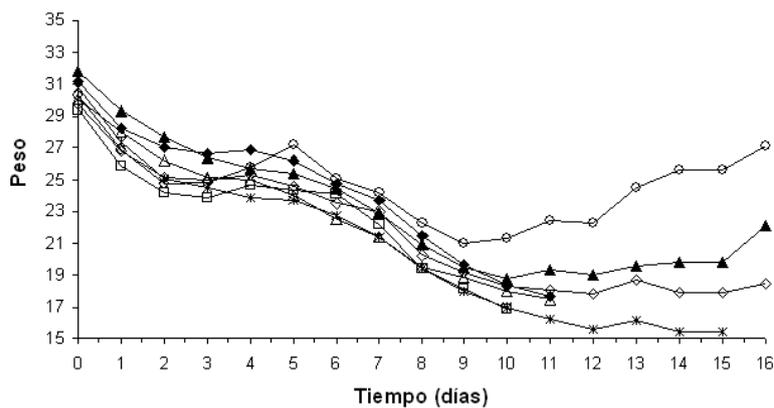


Figura 31. Gráficas del seguimiento de supervivencia y pesos acumulados totales del estudio realizado en series de ratones Swiss machos y hembras tras la administración de 5,0 mg/kg de ebulina f por vía oral. Machos línea continua y hembras línea discontinua. El contraste t de Student de los pesos de hembras y de machos rechaza la igualdad de medias, tanto para el contraste de una cola como para el contraste de dos colas. Por lo tanto las diferencias entre machos y hembras no parecen ser significativas.

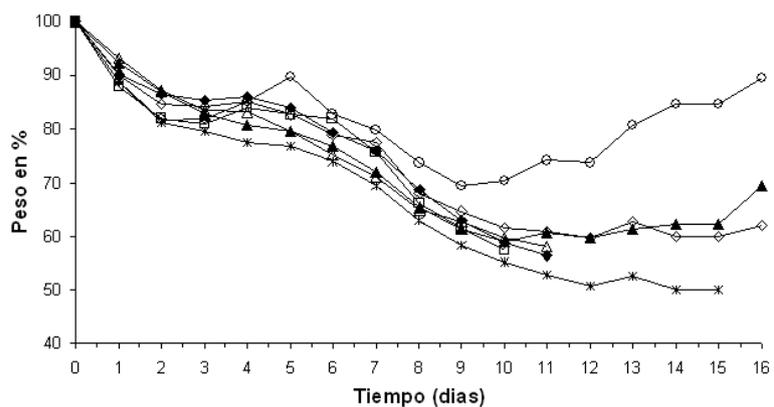
4.6.3. Efecto de la administración conjunta de Polyphenon E por vía oral y ebulina f por vía intraperitoneal.

Como hemos comentado en la Introducción la administración de cantidades elevadas de polifenoles produce cierta toxicidad que en algunos casos puede ser de importancia especialmente en el hígado, además de interferir con la farmacocinética y biodisponibilidad de determinados fármacos (Schönthal, 2011). Los estudios de histología que presentamos en el siguiente apartado, indican que ebulina f promueve la apoptosis de las criptas del intestino delgado, tanto mayor cuanto mayor sea la concentración, por ello, estudiamos los efectos de la administración simultánea de 2,5 mg/kg de ebulina f por vía intraperitoneal (dosis subletal) y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. Como se indica en la figura 32, la administración simultánea produce una reducción mayor en el peso corporal que la administración de la ebulina f sola. En estas condiciones la administración del Polyphenon E produce la mortalidad del 60% entre los 10 y los 15 días. En la figura 33 se muestra uno de los ratones del experimento anterior, dónde puede observarse el ennegrecimiento de los órganos internos probablemente debido a hemorragia y/o necrosis. Este efecto se observó en todos los ratones muertos por la acción combinada de ebulina f y Polyphenon E.

A



B



C

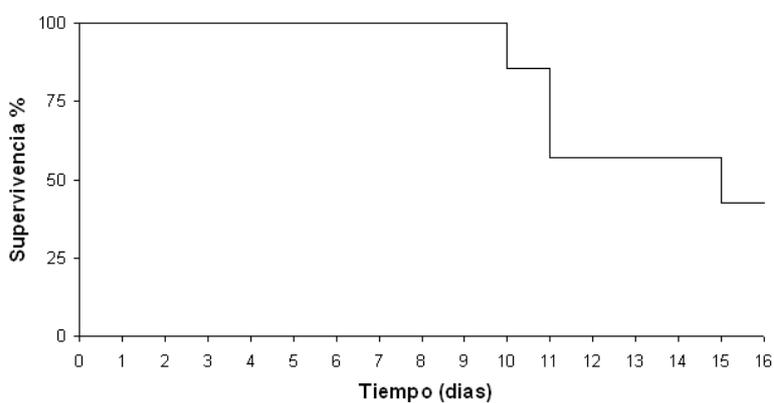


Figura 32. Variación de peso (A-B) y supervivencia (C) de ratones Swiss hembra después de la administración de 2,50 mg/kg de ebulina f por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral. A: peso (g) de una serie de 7 ratones; B: las variaciones de peso en (%); C: representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de la serie de ratones.

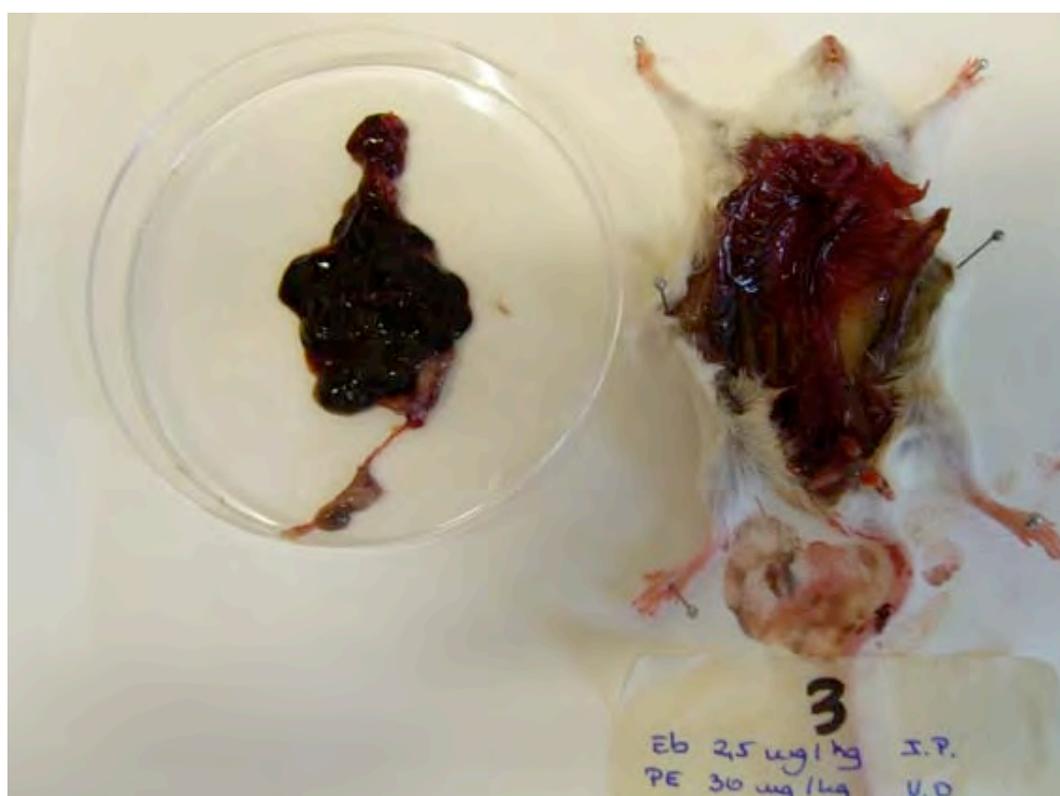


Figura 33. Fotografías de abdomen e intestinos de un ratón Swiss hembra tras la administración de 2,50 mg/kg de ebulina f por vía intraperitoneal y 30 mg/kg de Polyphenon E por vía oral.

4.6.4. Efecto de la administración intraperitoneal de 5 mg/kg de SELfd a ratones.

Como se indica en la figura 34, la administración de SELfd no provoca un efecto importante sobre el peso corporal y ni provoca la muerte de ningún animal.

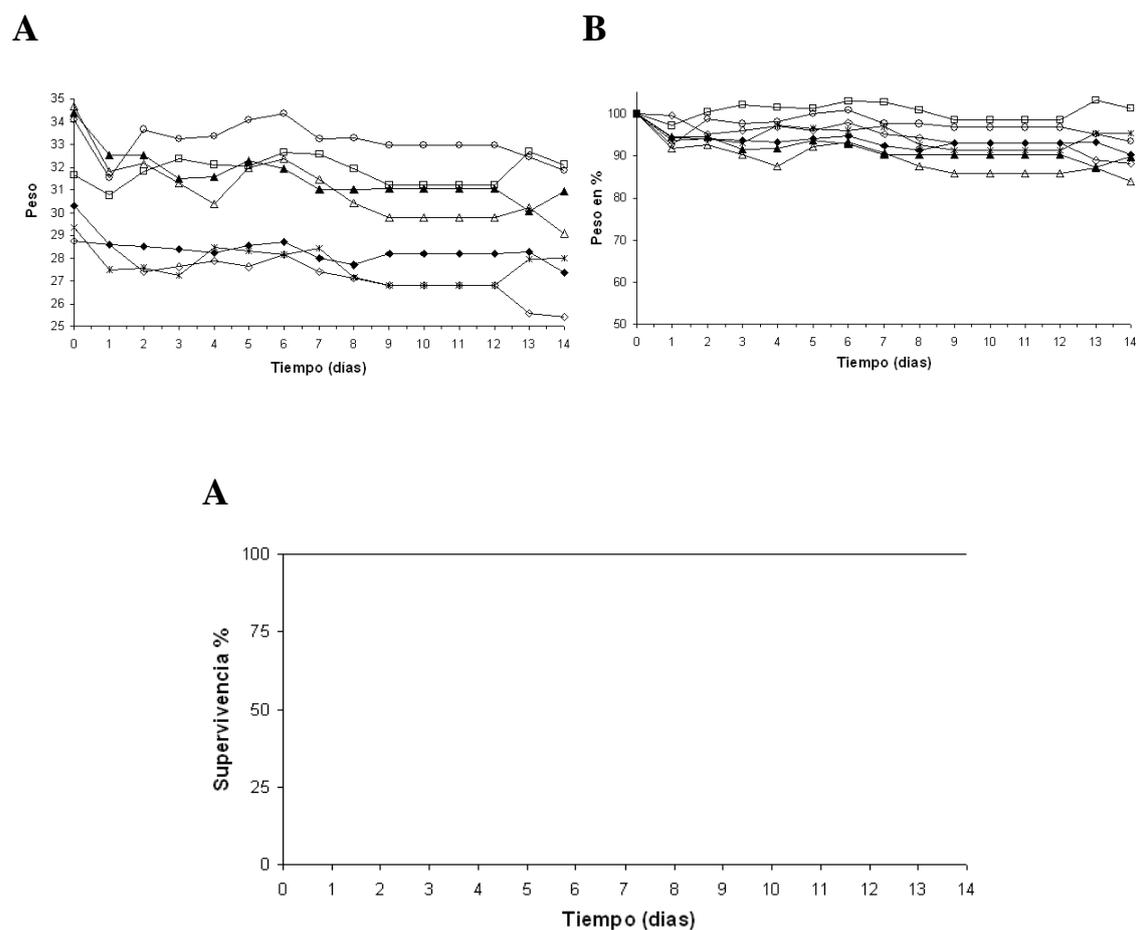


Figura 34. Variación de peso (A-B) y supervivencia (C) de ratones Swiss hembra después de la administración de 5,0 mg/kg de SELfd por vía intraperitoneal. A: peso (g) de una serie de 7 ratones; B: las variaciones de peso en (%); C: representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de la serie de ratones.

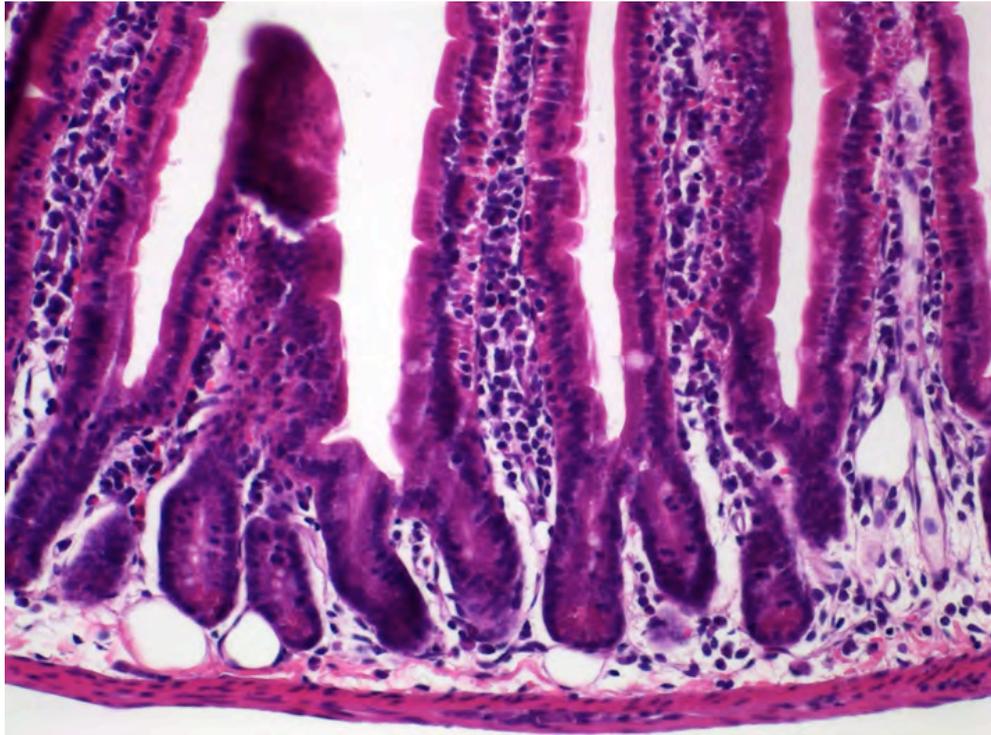
4.7. Análisis histológico de los intestinos de ratones Swiss.

Para tener una idea precisa de la arquitectura de la mucosa intestinal en ratones control, no sometidos a tratamiento experimental alguno, en las condiciones en las que se han llevado a cabo los experimentos se obtuvieron muestras de intestino delgado y de intestino grueso, que se tiñeron en hematoxilina-eosina y se analizaron con microscopía óptica (figura 35).

Como se indica en la figura 35 los ratones control presentan una arquitectura clásica donde se aprecian las criptas Lieberkühn y los *villi*. La ampliación de las imágenes de las criptas permite observar las células de Paneth al fondo en las células del compartimento TAC (*transit amplifying compartment*) en el tercio medio y células en diferenciación en la base del *villi*. Los *villi* presentan una estructura característica constituida por enterocitos y células *goblet*. Se observan también distintos vasos entre la capa *muscularis mucosae* y las criptas.

En cuanto al intestino grueso se observa la mucosa con las criptas y numerosas células productoras de mucus (formaciones más claras en la figura 36).

A



B

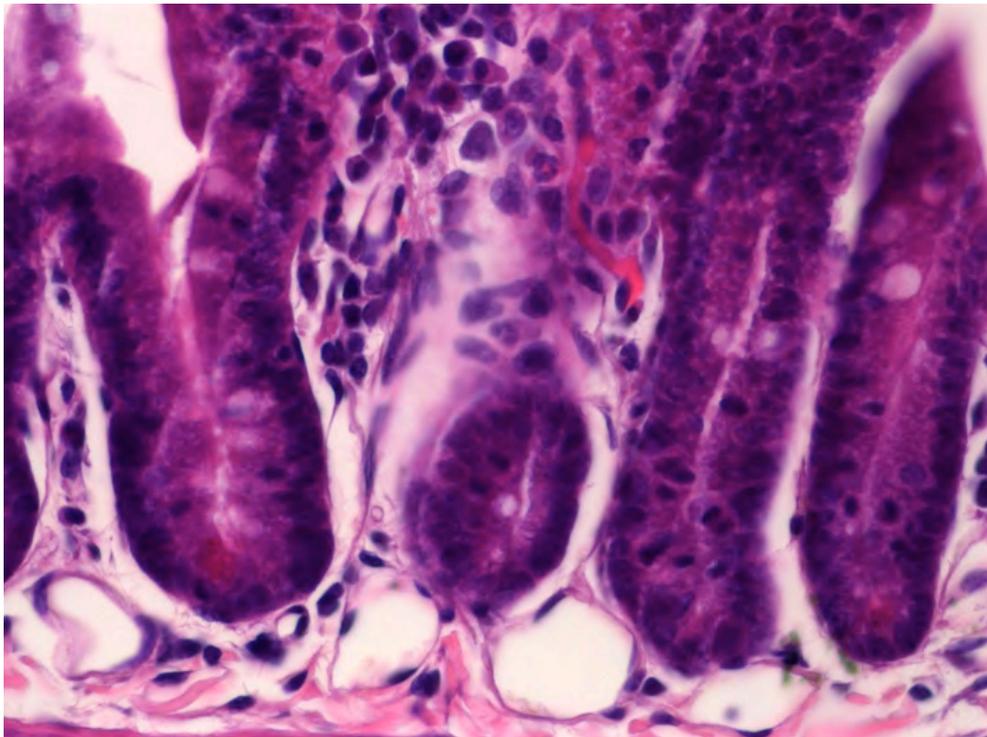


Figura 35. Análisis histológico de tejidos control en ratones Swiss. Micrografías del intestino delgado teñidas con hematoxilina/eosina. Panel (A) a 20 y panel (B) a 40 aumentos respectivamente.

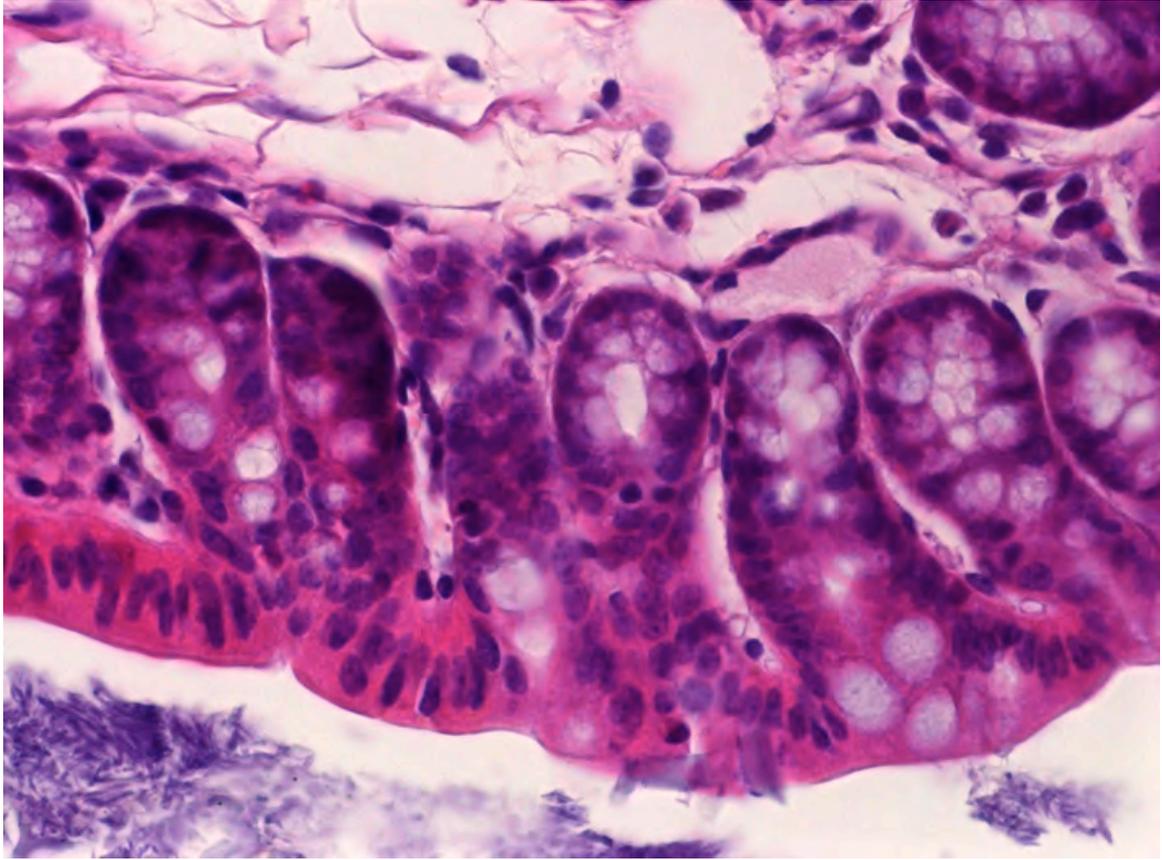


Figura 36. Análisis histológico de tejidos control en ratones Swiss. Micrografía del intestino grueso teñidas con hematoxilina/eosina y realizadas a 40 aumentos.

4.7.1. Análisis histológico de los efectos de la administración intraperitoneal de 5 mg/kg peso de ebulina f en ratones Swiss.

Como vimos anteriormente la administración intraperitoneal de 5 mg/kg peso de ebulina f produce unos efectos tóxicos que producen la muerte de todos los animales entre 2 y 4 días. La apariencia externa de los ratones tratados revela una profunda depresión física y encogimiento.

El análisis histológico de estos animales demuestra claros síntomas de destrucción intestinal caracterizada por atrofia de la mucosa del intestino delgado y del intestino grueso.

Como se observa en la figura 37 en la que se analiza un segmento del duodeno tomado a 1 cm del píloro, la arquitectura general de la mucosa muestra una profunda alteración con lesiones muy importantes en las criptas lieberkühn que prácticamente pierden su estructura característica observada en la figura 35 panel A.

El material remanente en las criptas está constituido por restos celulares de células muertas con una morfología de células en apoptosis. Estos restos de células muertas (figura 38) se liberan en el interior de la cripta del lumen intestinal.

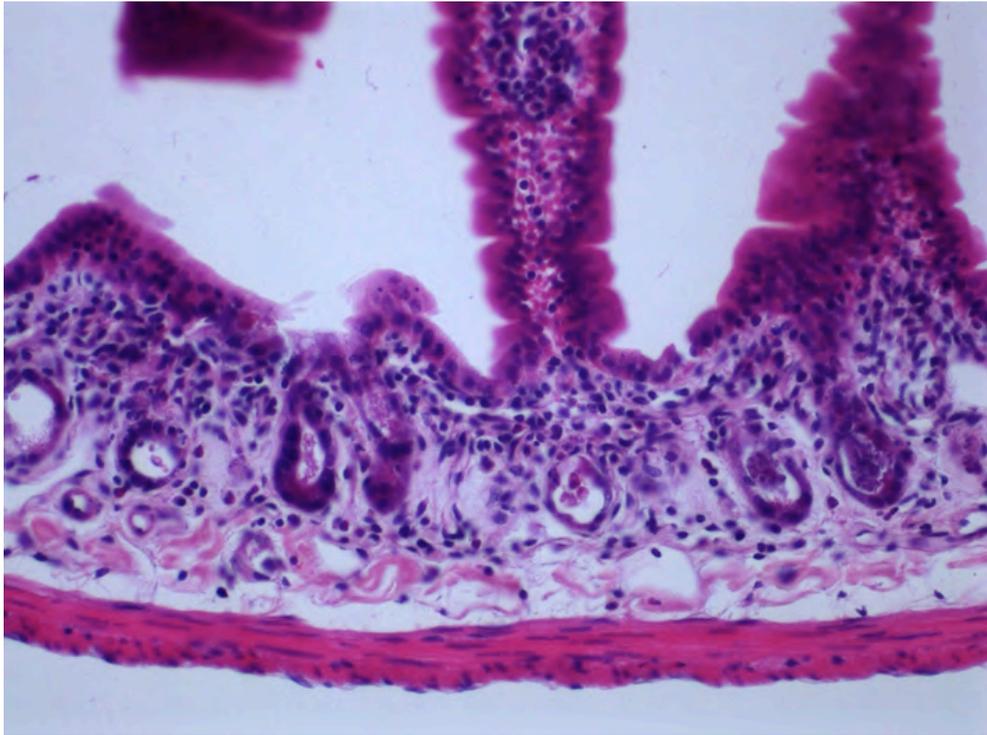
Los *villi* resultaban también afectados desapareciendo parte de ellos y presenta células epiteliales que recubren el tejido conectivo remanente de las estructuras normales de la mucosa después de la acción de la ebulina f. En definitiva la *lámina propia* pierde su organización y se convierte en un amasijo de células epiteliales y tejido conectivo que conlleva la producción de hemorragias, y es muy probablemente que sea la causa de la muerte de los animales.

Respecto al intestino grueso se observan menos apoptosis tanto en un corte en sección como en un corte longitudinal (figura 39). La destrucción de la mucosa se aprecia también y aunque parece conservar la estructura general las criptas contienen numerosas células muertas y restos celulares.



Figura 37. Análisis histológico a las 24 horas de la administración de 5 mg/kg por vía intraperitoneal de ebulina f en ratones Swiss. Micrografía del intestino delgado teñidas con hematoxilina/eosina. Realizadas a 5 aumentos.

A



B

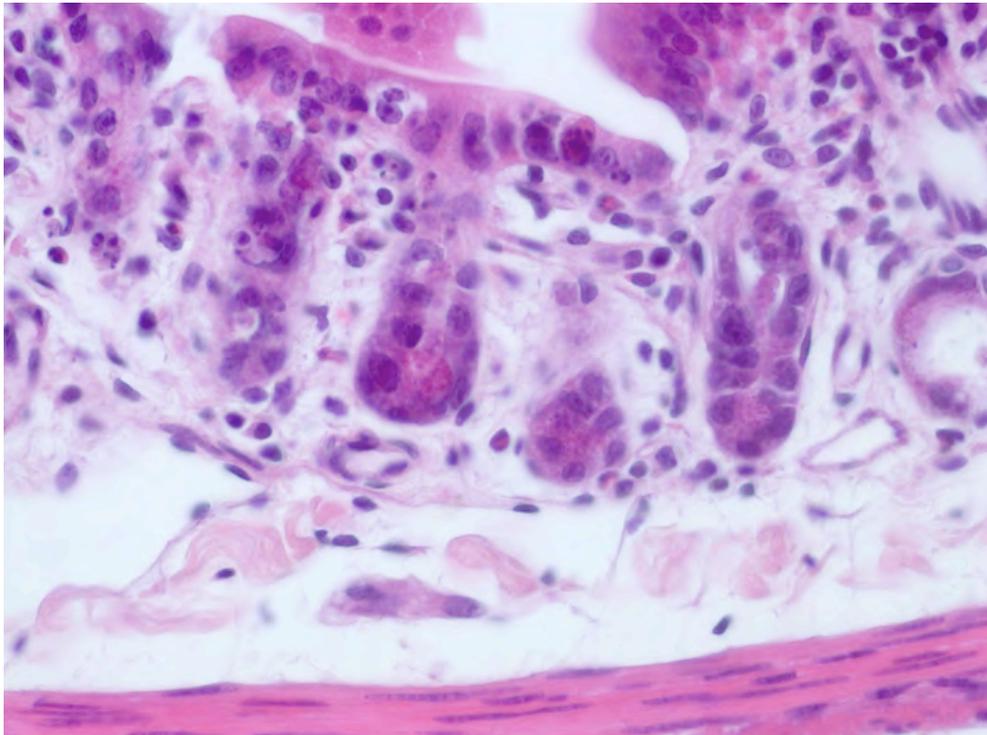
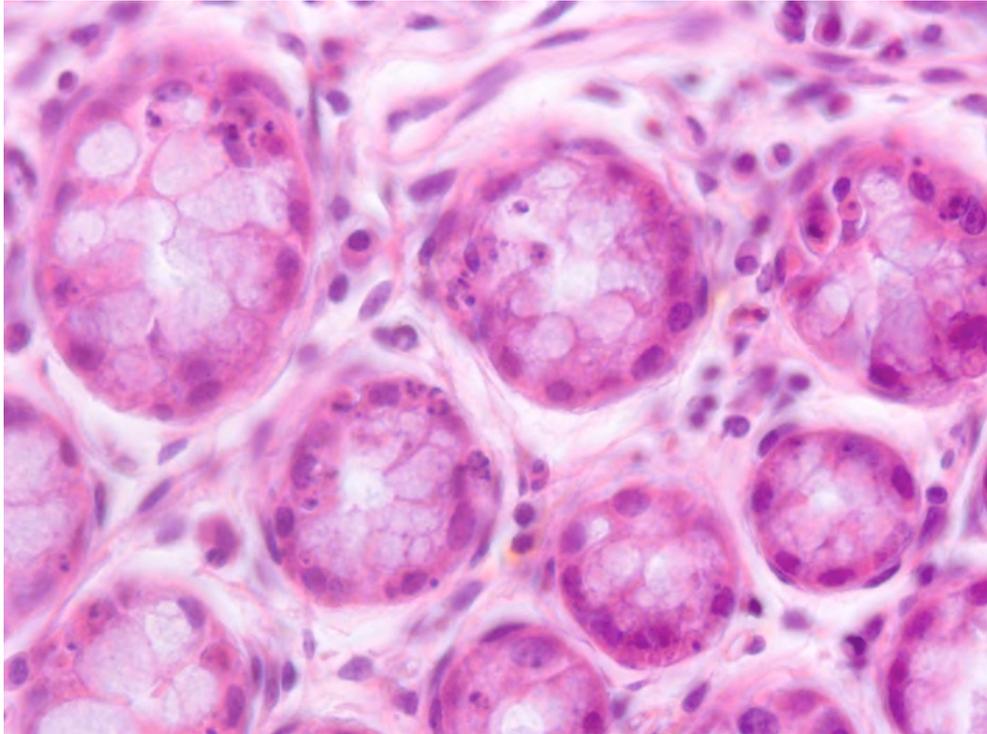


Figura 38. Análisis histológico a las 24 horas de la administración de 5 mg/kg por vía intraperitoneal de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías del intestino delgado teñidas con hematoxilina/eosina. Panel (A) a 20 y panel (B) a 40 aumentos.

A



B

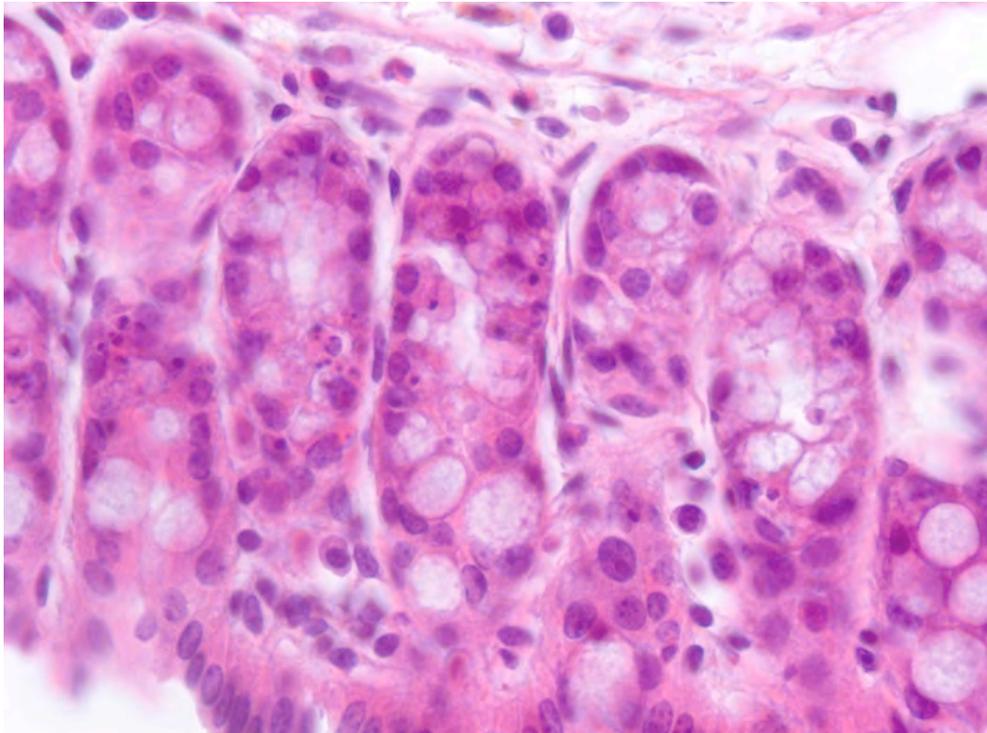


Figura 39. Análisis histológico a las 24 horas de la administración de 5 mg/kg por vía intraperitoneal de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías del intestino grueso teñidas con hematoxilina/eosina. Realizadas a 40 aumentos.

Como se observa en la figura 40 la administración vía intraperitoneal de 5 mg/kg peso de ebulina f produce efectos deletéreos en los pulmones que consisten en una congestión notable de determinadas zonas de los pulmones donde se observan vasos llenos de sangre, junto con otros aparentemente normales. Este encharcamiento de los pulmones podía ser la causa de la profunda depresión física que sufren los animales poco antes de morir al ser tratados con ebulina f a esta concentración.

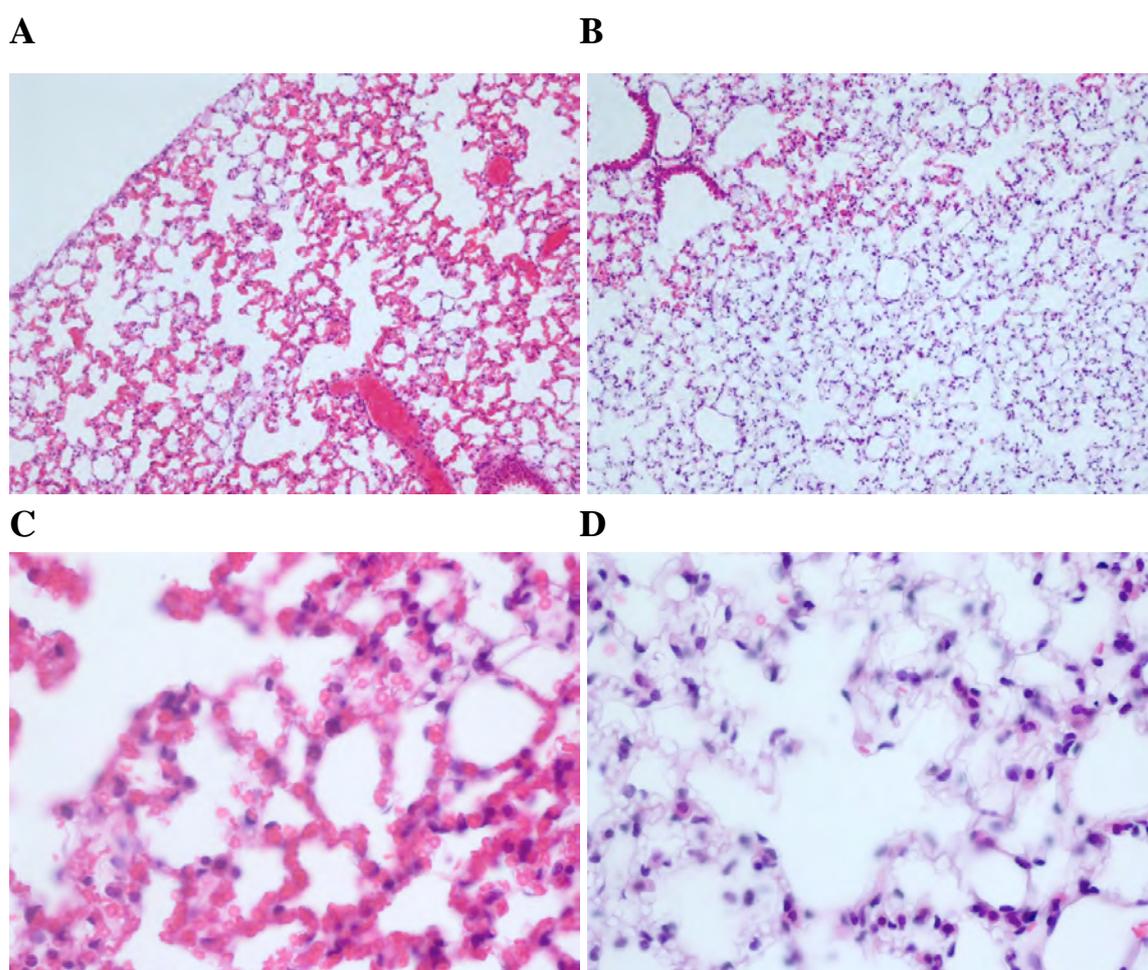


Figura 40. Análisis histológico a las 24 horas de la administración de 5 mg/kg por vía intraperitoneal de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de tejido pulmonar teñidas con hematoxilina/eosina. Paneles (A) y (B) a 10 aumentos, paneles (C) y (D) a 40 aumentos.

4.7.2. Efecto de la administración vía oral de 5 mg/kg peso de ebulina f en ratones Swiss.

Como vimos en la figura 31 la administración vía oral de 5 mg/kg peso de ebulina f mata a la mitad de los animales entre 3 y los 9 días. Por ello se realizó un estudio su histológico analizando sus efectos. Dado que el proceso digestivo puede durar entre 1 y 2 horas y dado que esta proteína se degrada *in vitro* en presencia de pepsina ácida casi totalmente en 90 minutos, estudiamos sus efectos a las dos horas de su administración.

Como se observa en las figuras 41 y 42 después de las 2 horas de administración la estructura de la mucosa del intestino delgado presentó criptas en buen estado con pocas células en apoptosis, así como *villi* bien conformados con su característica estructura de columna.

Por otro lado, examinamos la mucosa del intestino grueso y como es indica en la figura 43 las criptas conservan su estructura general y una buena apariencia de las células llenas de mucus.

Se analizó también la apariencia de la zona glandular del estómago y se observó cierto deterioro que podría estar relacionado con la ingestión oral de ebulina f (figura 44).

Se analizó también la estructura pulmonar y los corte indican la congestión de los alvéolos con acumulación de sangre (figura 45).

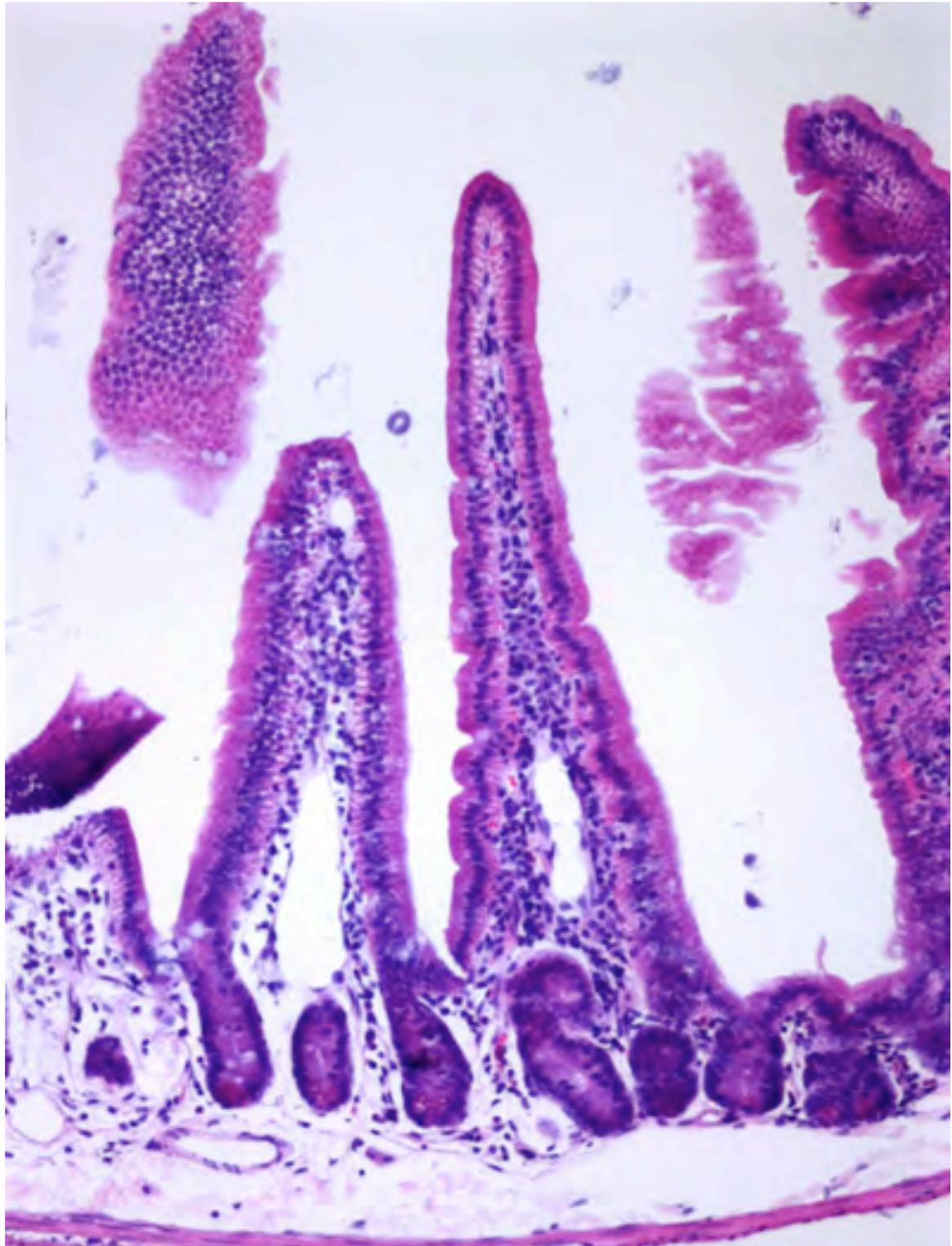


Figura 41. Análisis histológico a las 2 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografía de intestino delgado teñida con hematoxilina/eosina y realizada a 10 aumentos.

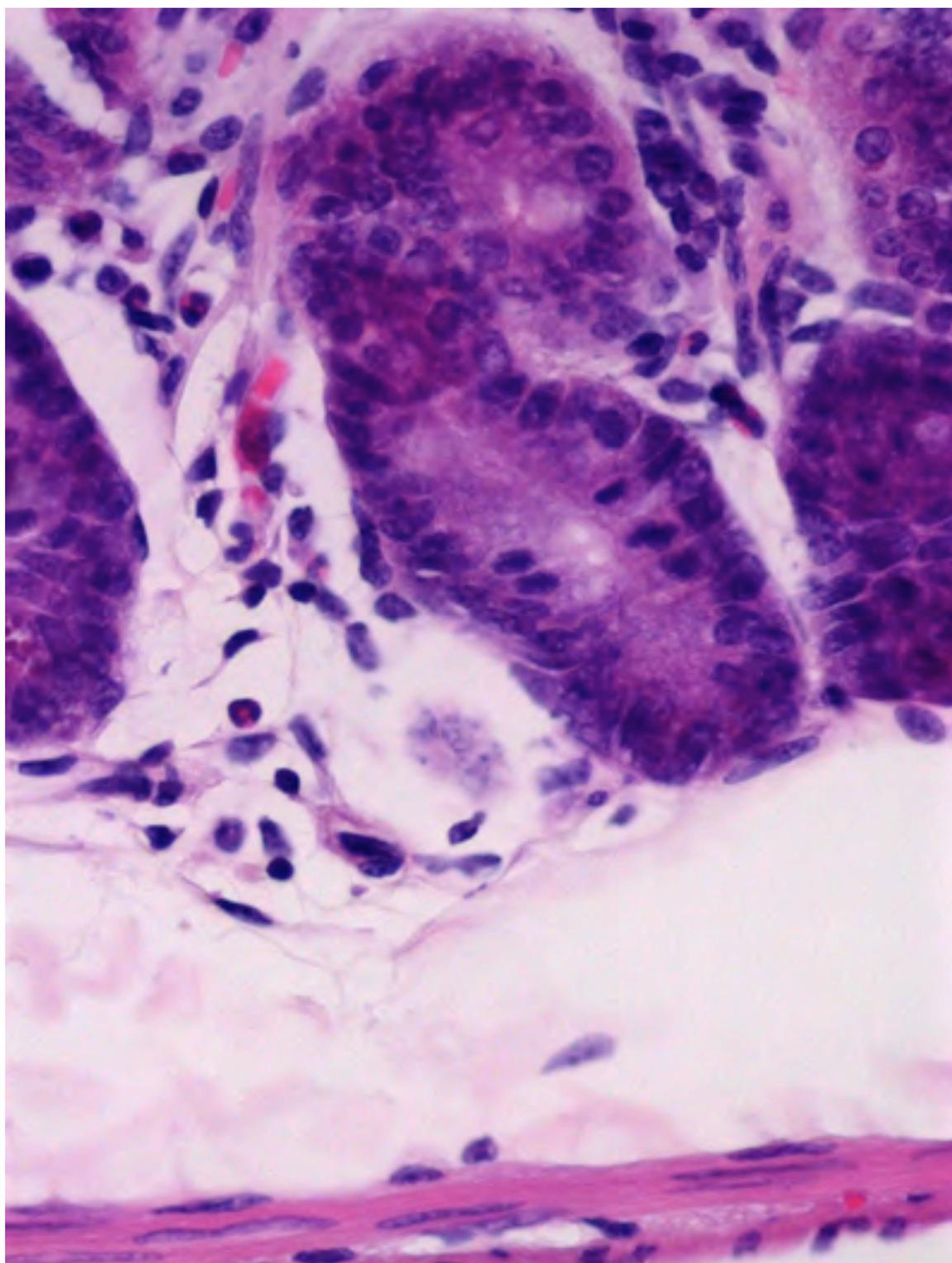


Figura 42. Análisis histológico a las 2 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografía de intestino delgado teñida con hematoxilina/eosina y realizada a 40 aumentos.

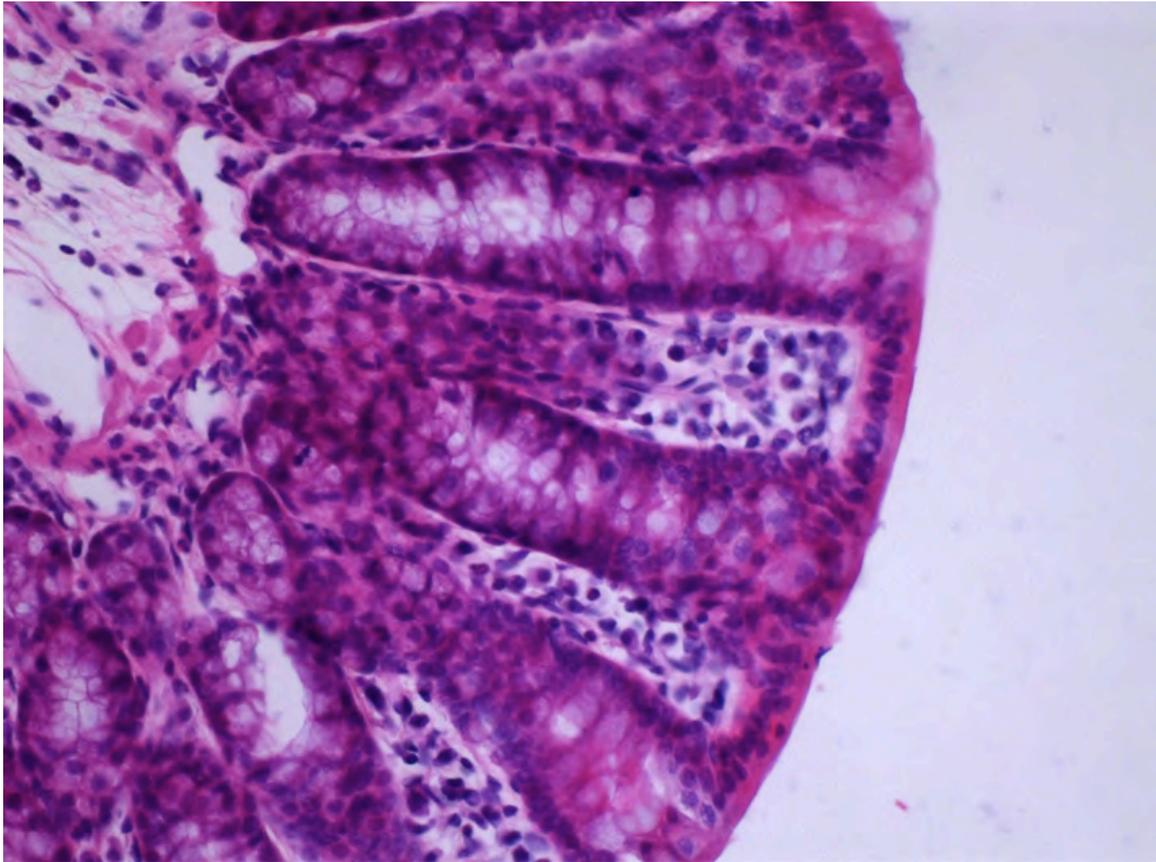


Figura 43. Análisis histológico a las 2 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografía de intestino grueso teñido con hematoxilina/eosina y realizada a 20 aumentos.

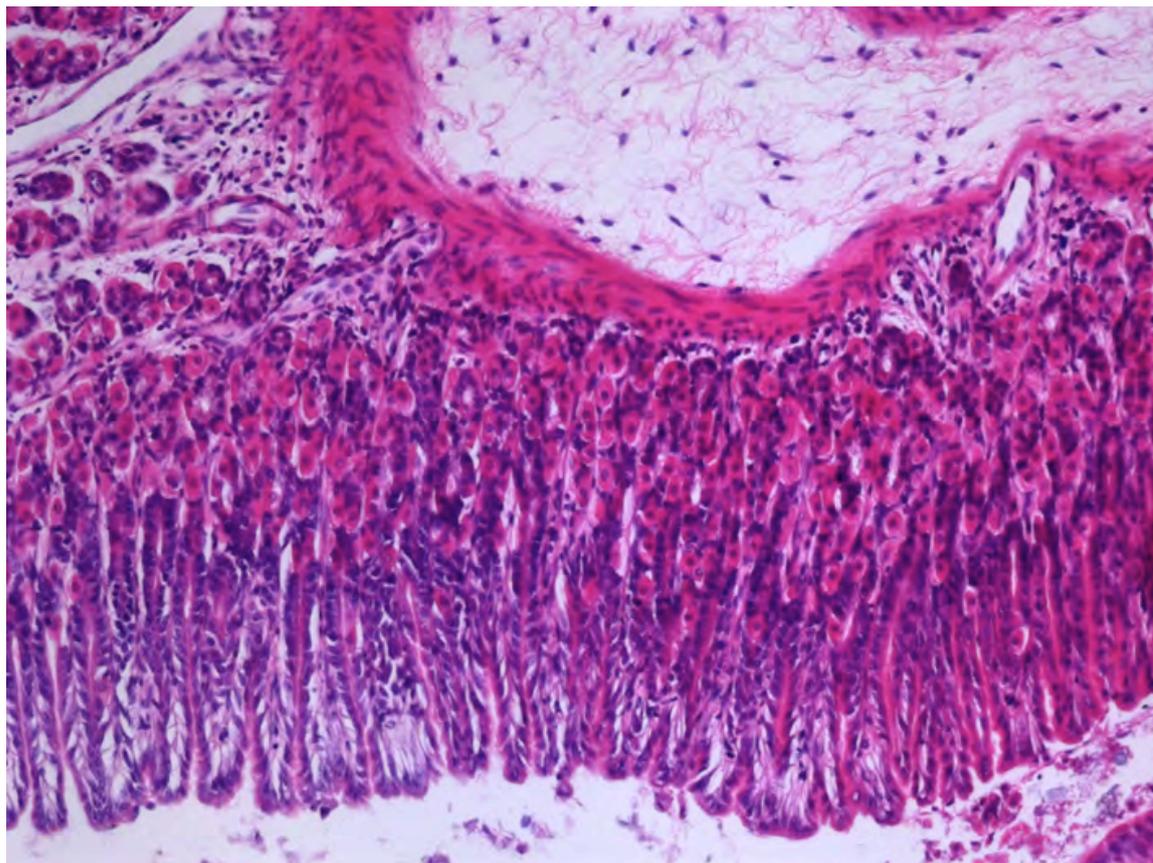
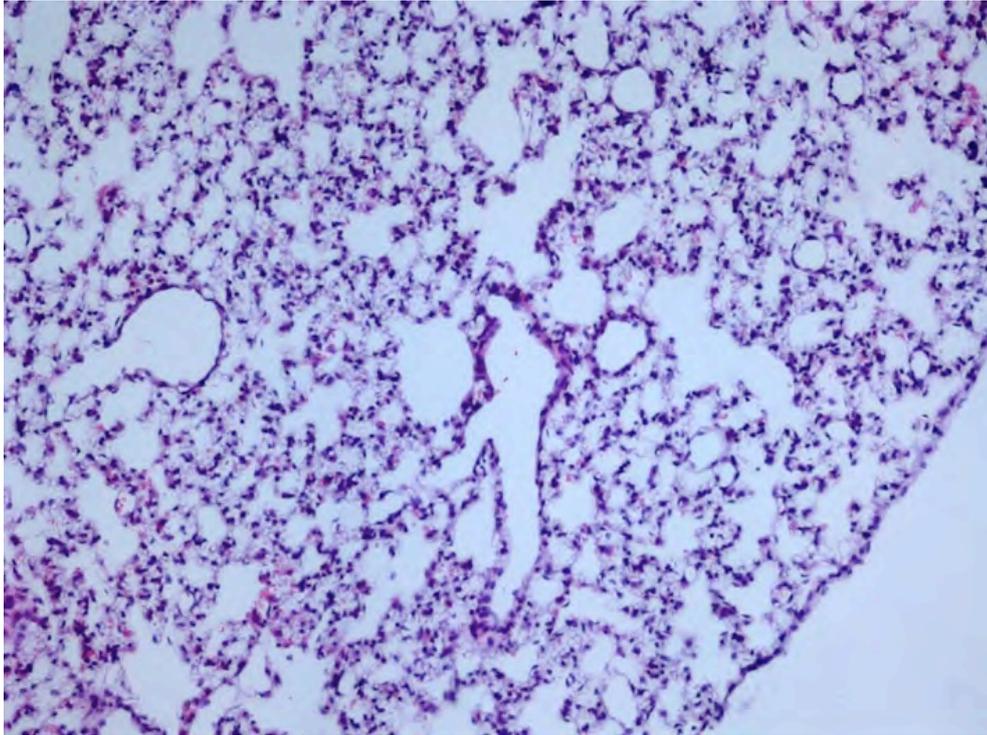


Figura 44. Análisis histológico a las 2 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografía de estómago teñida con hematoxilina/eosina y realizada a 10 aumentos.

A



B

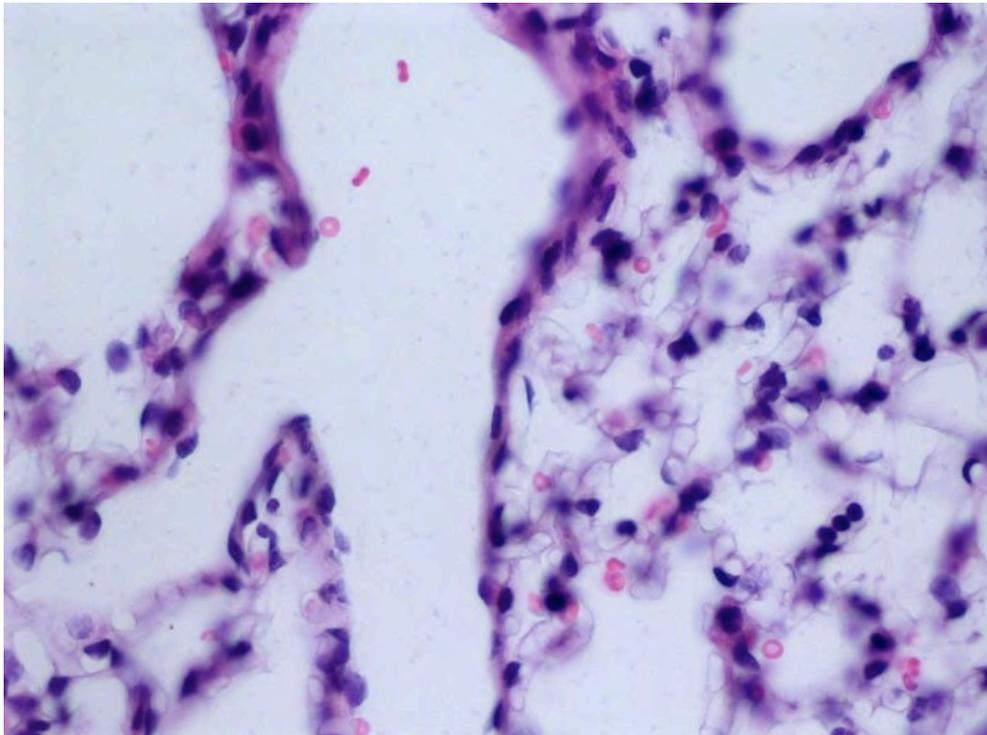


Figura 45. Análisis histológico a las 2 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de tejido pulmonar teñidas con hematoxilina/eosina. Panel (A) 20 aumentos y panel (B) 40 aumentos.

Dado que la ebulina f es sensible a la pepsina ácida y se degrada prácticamente en 90 minutos cualquier efecto de la ebulina f a medio o largo plazo puede ser ejercido en los primeros 90 minutos desde su administración, tiempo en el cual hay ebulina f remanente intacta que podría hacer efecto a través de las paredes del tracto intestinal bien alterando los tejidos gastrointestinales o bien pasando a la sangre y distribuyéndose a otros órganos. Por ello, dado que la administración vía intraperitoneal de 5 mg/kg peso de ebulina f ejerce efectos profundos a partir de las 24 horas, decidimos estudiar también los efectos a medio plazo y por ello seleccionamos las 48 horas, tiempo inferior al necesario para que mueran los ratones con esta dosis.

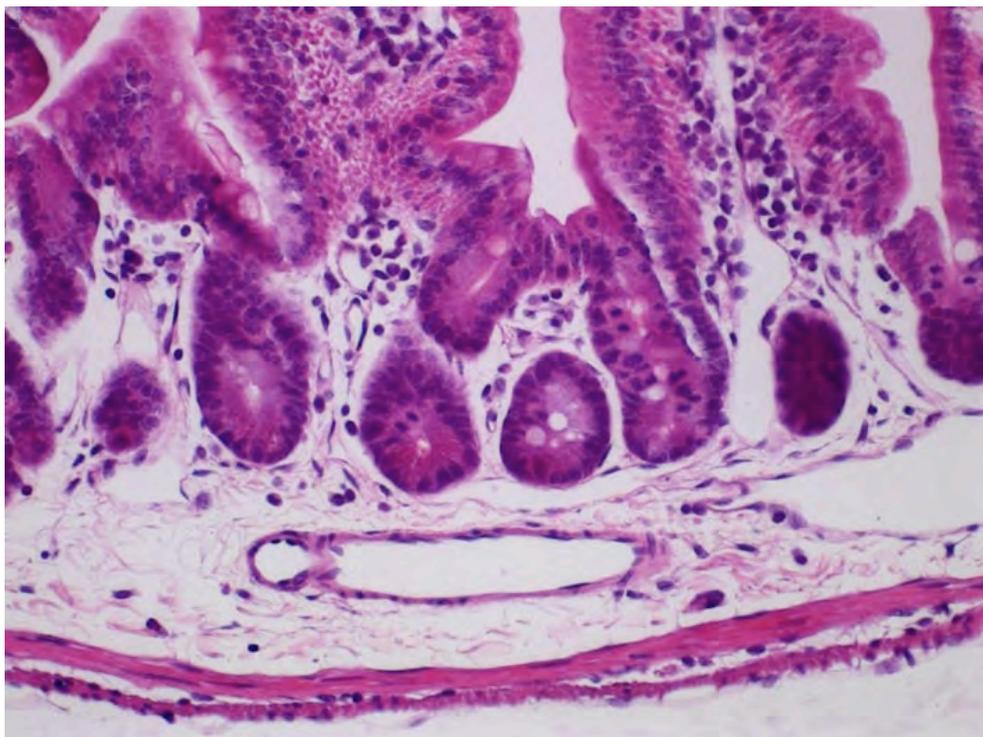
Como puede observarse en la figura 46 (criptas) y figura 47 (*villi*) la administración vía oral tuvo poco efecto sobre el intestino delgado. Tampoco se observaron efectos notables sobre el intestino grueso y la zona glandular del estómago que parece haberse recuperado del posible efecto directo de la ebulina f (figura 48).

El efecto sobre los pulmones fue mucho más agresivo que la administración vía intraperitoneal, pues como se muestra en la figura 49. Los alvéolos se observan muy deteriorados y con un notable encharcamiento de sangre.

El tejido cardíaco apareció también afectado como vemos en la figura 50, con unos desgarramientos que podrían ser producto de un debilitamiento del músculo cardíaco aunque no podría excluirse algún artefacto de la preparación.

Dado que se afecta el sistema circulatorio se estudió el efecto sobre el riñón, figura 51, y no parece haber afección destacable.

A



B

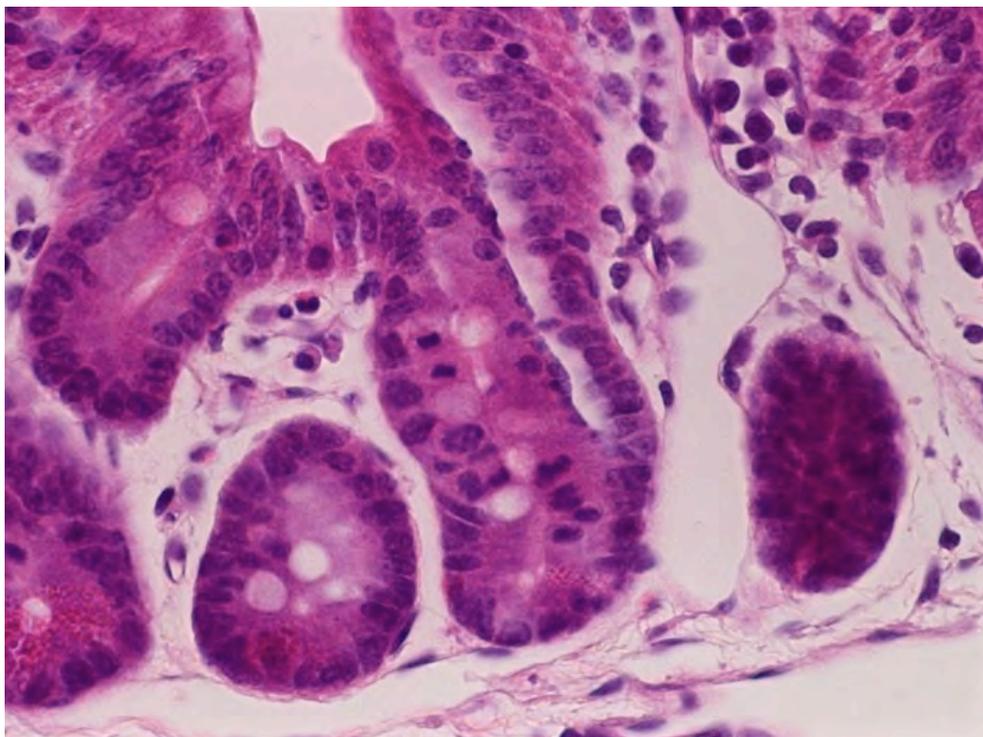
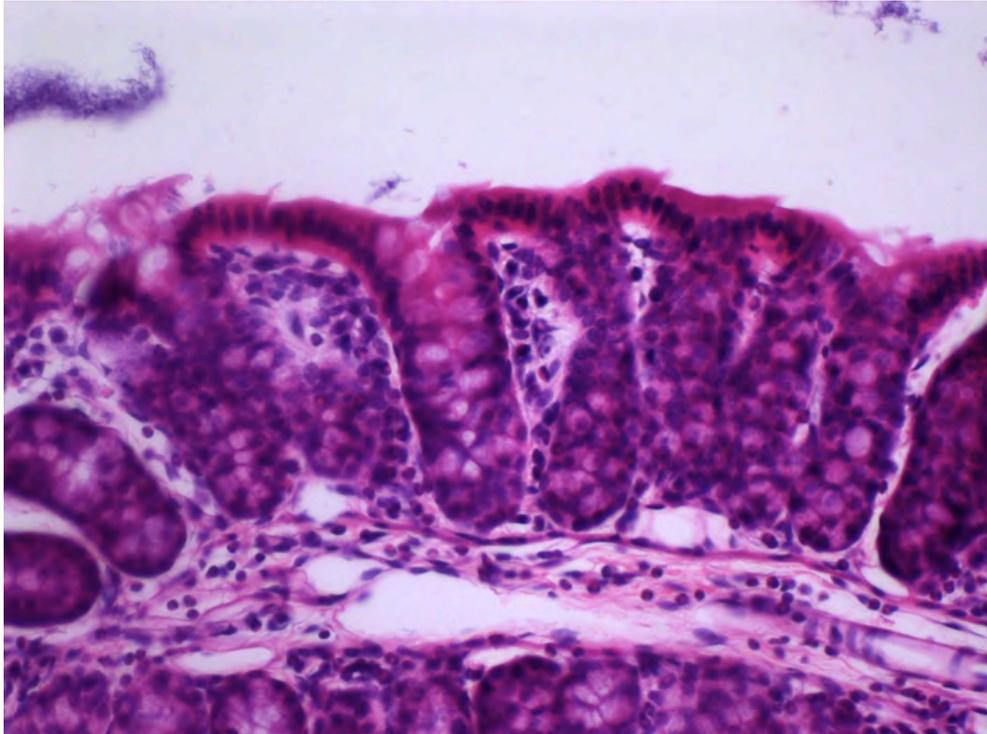


Figura 46. Análisis histológico a las 48 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de intestino delgado teñidas con hematoxilina/eosina. Panel (A) 20 aumentos y panel (B) 40 aumentos.



Figura 47. Análisis histológico a las 48 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de intestino delgado teñidas con hematoxilina/eosina y realizada a 40 aumentos.

A



B

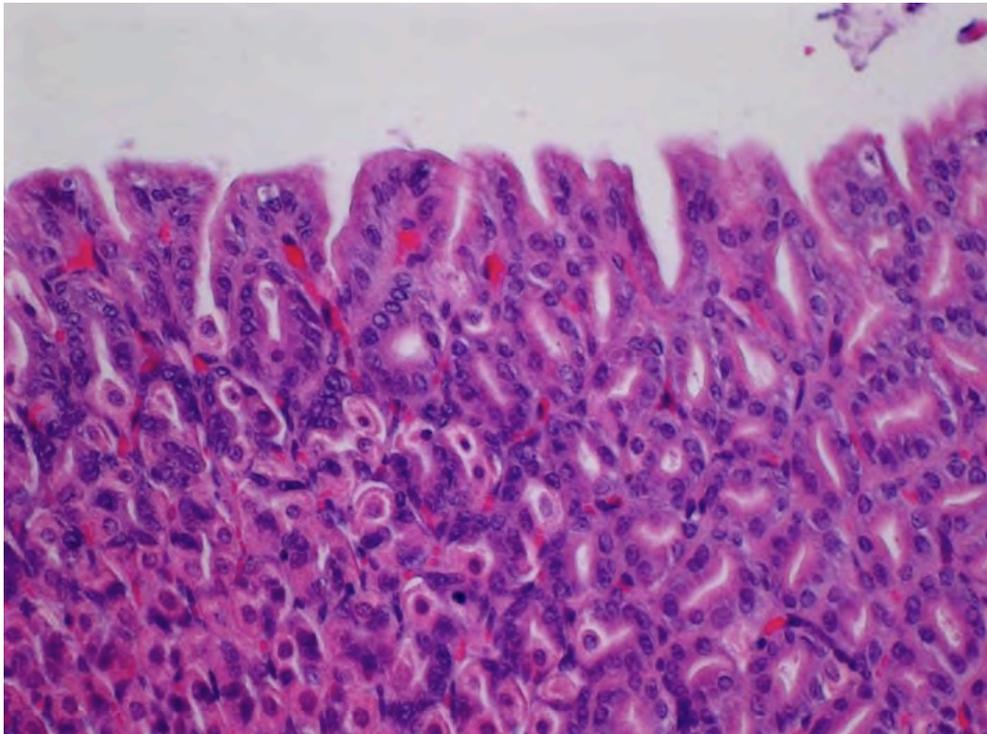
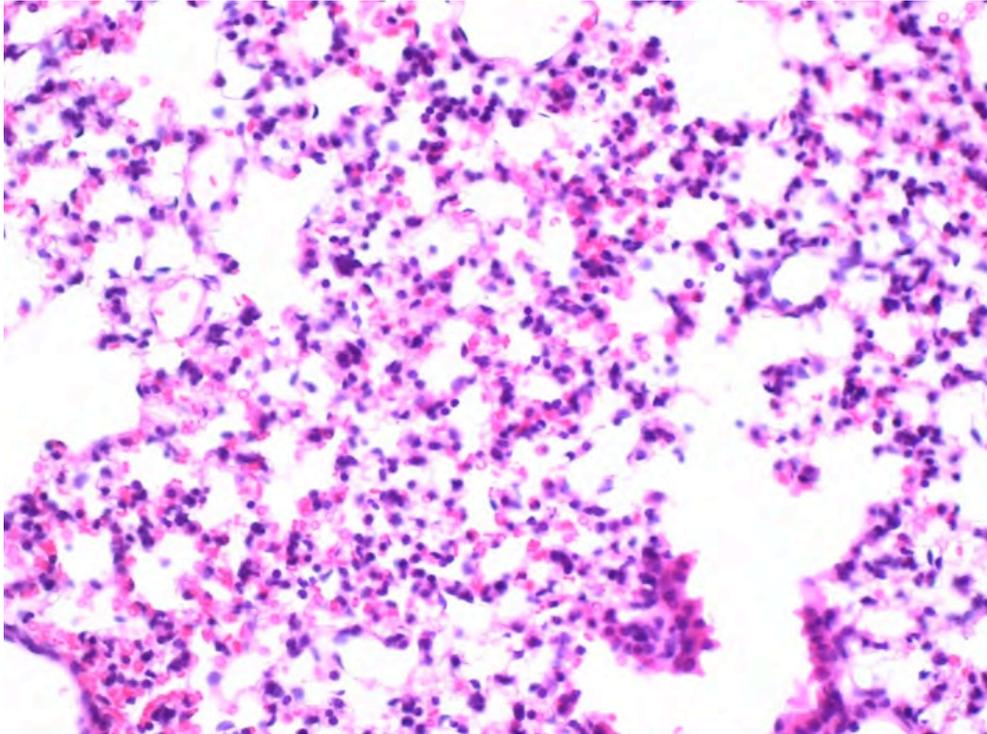


Figura 48. Análisis histológico a las 48 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de intestino grueso (A) y del estómago (B) teñidas con hematoxilina/eosina, y ambas realizadas a 20 aumentos.

A



B

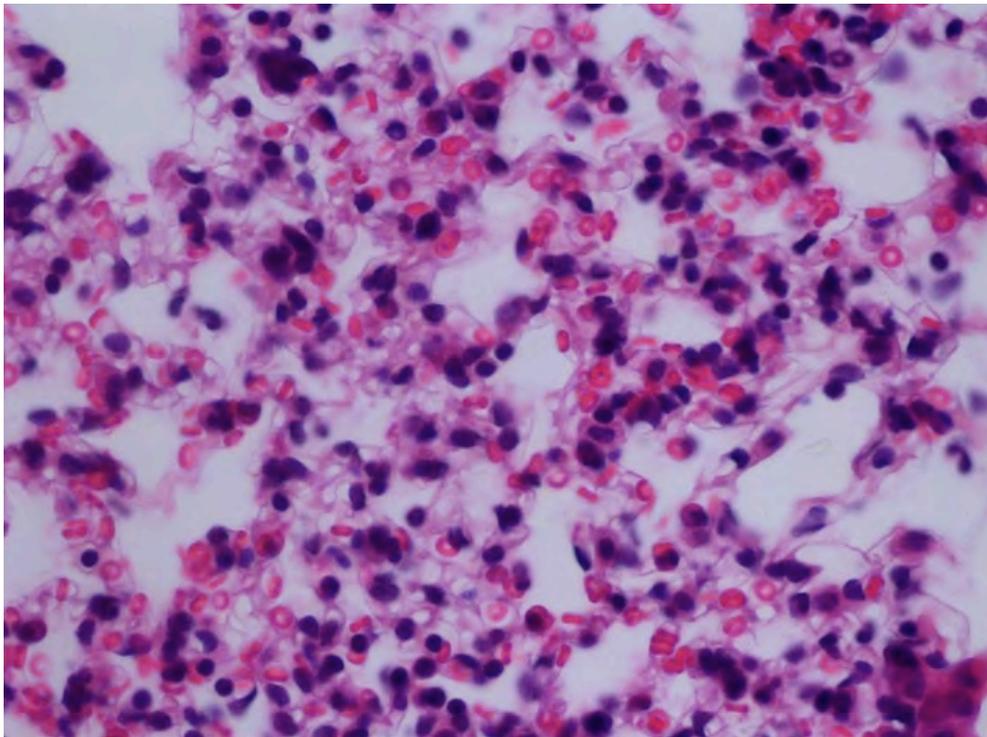
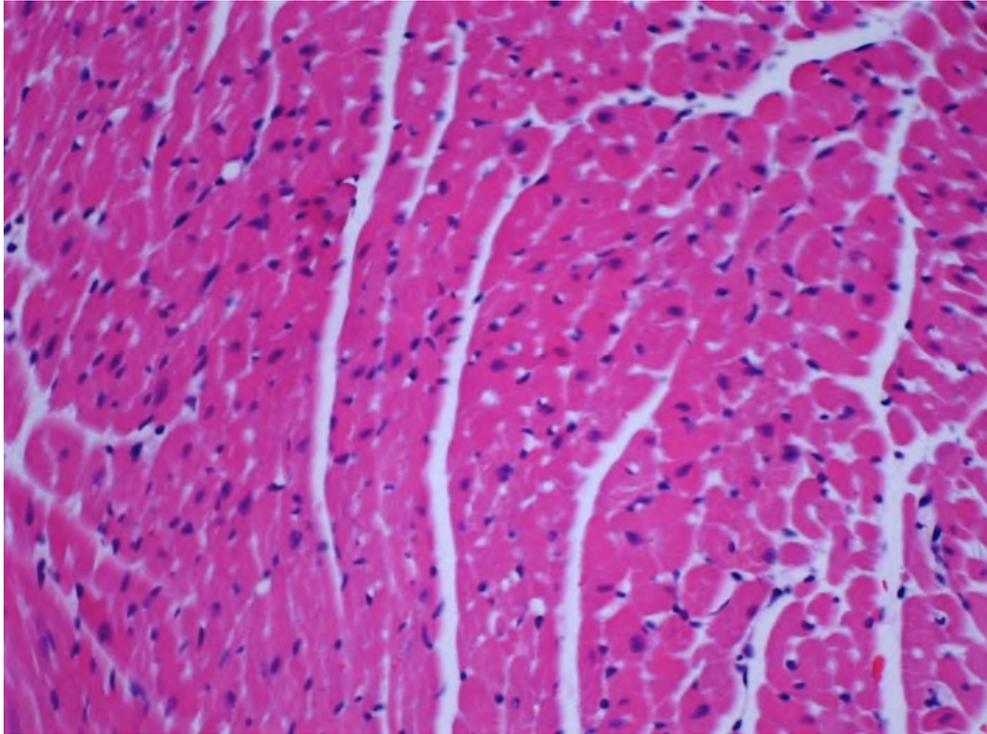


Figura 49. Análisis histológico a las 48 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de tejido pulmonar teñidas con hematoxilina/eosina. Panel (A) 20 y panel (B) 40 aumentos.

A



B

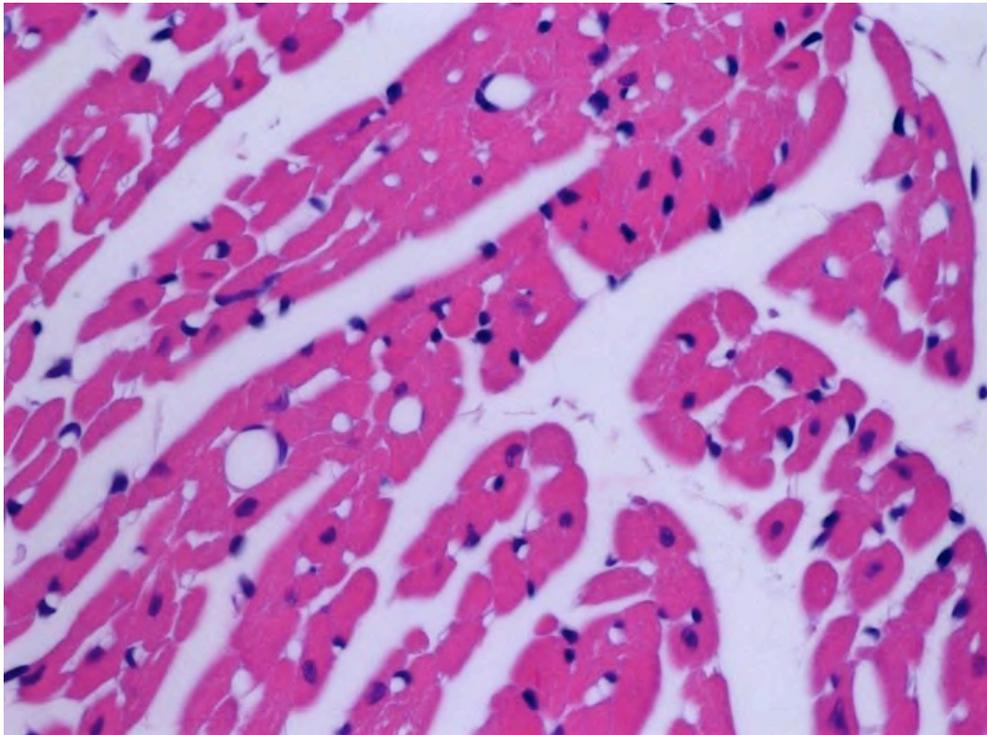
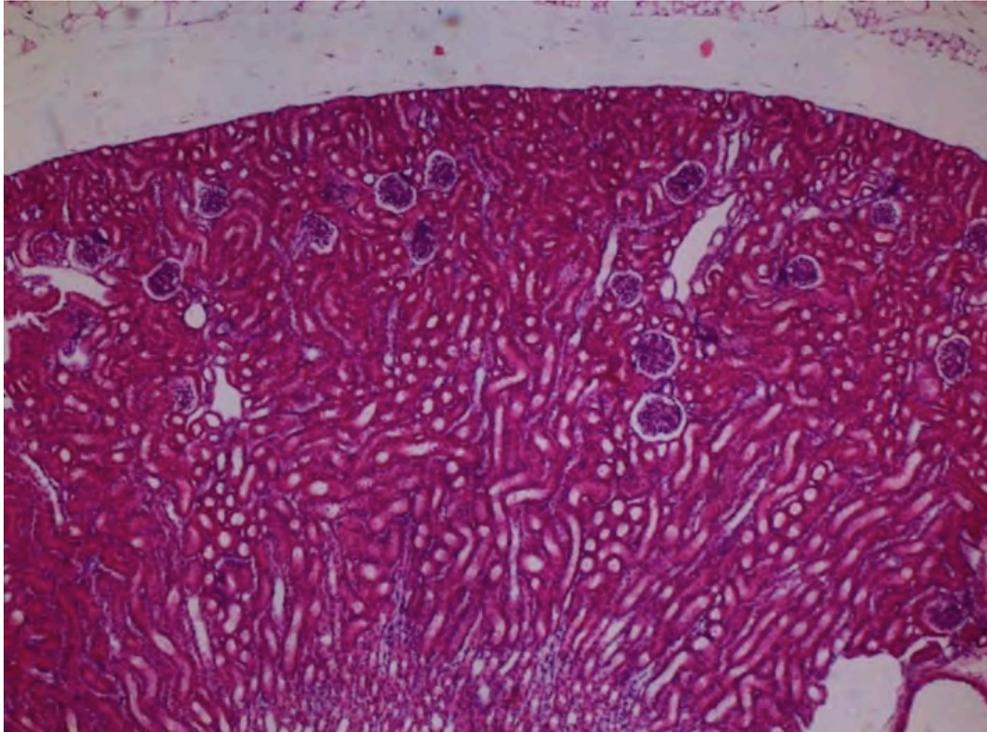


Figura 50. Análisis histológico a las 48 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de tejido muscular cardiaco teñidas con hematoxilina/eosina. Panel (A) 20 y panel (B) 40 aumentos.

A



B

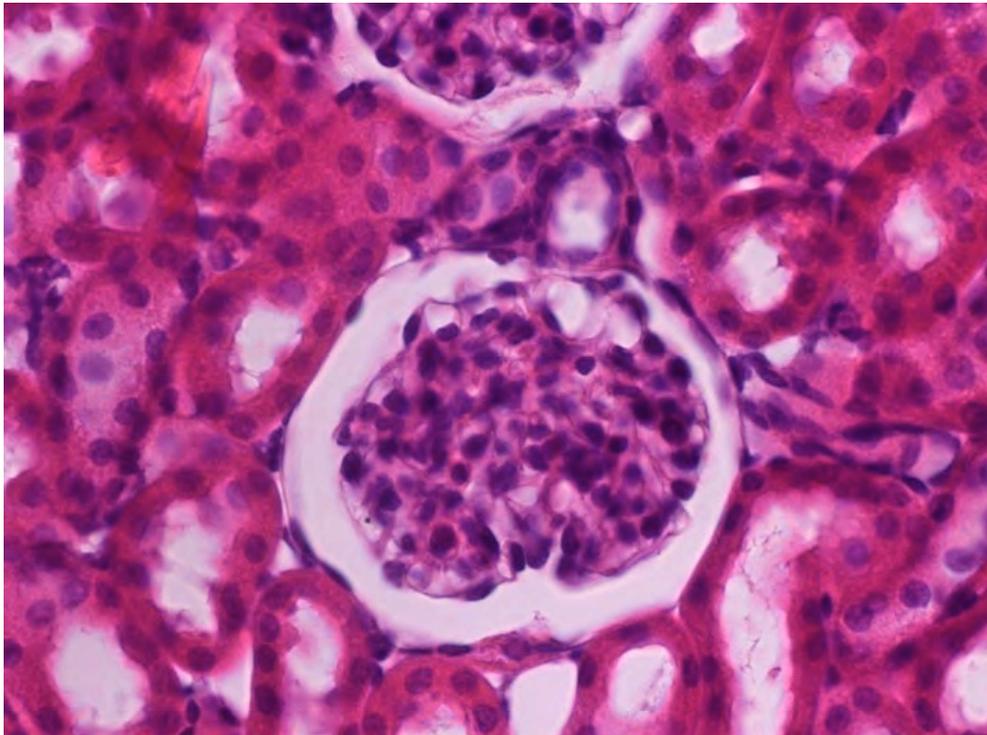


Figura 51. Análisis histológico a las 48 horas de la administración de 5 mg/kg por vía oral de ebulina f en ratones Swiss. Micrografías de riñón teñidas con hematoxilina/eosina. Panel (A) 5 y panel (B) 40 aumentos.

5. DISCUSIÓN.

5. DISCUSIÓN.

Estudios realizados en los últimos años por el grupo del profesor Girbés en la Universidad de Valladolid han permitido determinar que la presencia de las RIPs de tipo II y proteínas relacionadas en las especies de la familia *Sambucaceae* está ligada al desarrollo. En *S. nigra* la presencia de LIR (Lectinas Inactivadoras de Ribosomas) tanto en corteza como en fruto varía en función de la estación y probablemente en función de la temperatura (Citores, 96; Ferreras, 2011).

En *S. ebulus* se ha observado una variación similar tanto en hojas como en frutos y en rizomas. En hojas se produce la variación de ebulina I en sentido contrario a la expresión de la lectina SELld, así en brotes y hojas muy pequeñas se expresa predominantemente ebulina I con trazas de SELld. En hojas maduras la expresión es muy similar. En hojas senescentes se expresa casi exclusivamente SELld, de manera que es posible obtener lectina pura a partir de estas hojas (Rojo y cols., 2003).

En frutos de *S. ebulus* se describió que la maduración conlleva variaciones notables en el contenido de lectinas D-galactosa, SELfd y ebulina f (Citores y col., 1998). Los primeros aislamientos de dichas lectinas se realizaron a partir de frutos de septiembre, época en la cual coexisten todavía frutos verdes grandes y frutos con madurez incipiente con frutos completamente maduros. Los primeros aislamientos se realizaron sin tener en cuenta el estado de madurez y se determinó la presencia de las dos lectinas más un producto de polimerización de ambas que se denominó poliebulina (Citores y col., 1998). Cuando el aislamiento se realizó con frutos muy maduros, las lectinas D-galactosa prácticamente desaparecieron quedando un remanente de lectina SELfd.

Esta dependencia de la expresión de lectinas en función del estado de madurez es el que nos llevó a investigar en primer lugar la presencia de las de D-galactosa con frutos verdes de tamaño variable, pequeños de 90 frutos por gramo y grandes de 28 frutos por gramo aproximadamente. Encontramos que la mayor concentración de ambas lectinas se produce en los frutos verdes pequeños aunque la proporción entre ambas lectinas fuese constante. Esta circunstancia podría tener que ver con el carácter antinutriente que se les ha asignado a las LIR. El grupo de Peumans (Universidad de Gante, Bélgica) considera que las LIR suponen una ventaja competitiva de la planta frente a la predación por insectos y al daño por hongos (Peumans y Van Damme, 1995), en este sentido y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo puede considerarse que la acumulación de ebulina en frutos verdes y quizás SELfd, podría proteger a dichos frutos de los predadores, insectos y aves durante su desarrollo hasta la maduración. Esta toxicidad potencial puede ser la equivalente a la que hemos encontrado en este trabajo sobre los ratones y en este sentido podrían explicarse los casos de envenenamiento, en algunos casos fatal, debido a la ingestión de los frutos de *S. ebulus* (Fon-Quer, 1999).

Estaríamos pues ante un mecanismo de defensa de la planta para proteger el proceso de formación de semillas del ataque de fundamentalmente de aves y de insectos. Estos resultados también sugieren la presencia de este tipo de lectinas en flores de *S. ebulus*, extremo este que no se ha investigado y que sería interesante explorar para completar el argumento que presentamos.

Se ha descrito que el polen de *S. nigra* contiene el alérgeno Sam n1 con secuencias de aminoácidos idénticos a las diversas lectinas de *Sambucus*

en particular ebulina I, lo que llevó a sugerir que el alérgeno Sam n1 es una LIR de dos cadenas (Förster-Waldl y cols., 2003). Uno de los objetivos de esta tesis fue investigar la relación del alérgeno con las LIR, en particular la ebulina f.

Nuestros resultados indican que la ebulina f posee secuencias determinadas en pépticos trípticos idénticos a las de la ebulina I, y una masa molecular prácticamente el doble que el alérgeno Sam n1, por tanto podemos decir que el alérgeno y la ebulina f son proteínas distintas. Además, no se estudió si el alérgeno Sam n1 posee actividad hemoaglutinante y tóxica, lo que ofrecería argumentos para asegurar que se trata de una RIP tipo II como se sugirió anteriormente (Förster-Waldl y cols., 2003). Sin embargo ebulina f presenta tanto actividad hemoaglutinante como actividad tóxica notable en ratones.

Las consideraciones estructurales así como la secuenciación de los péptidos trípticos sugieren que el alérgeno Sam n1 puede ser una lectina monomérica presente en el polen de *S. nigra* que encaja bastante bien con una lectina monomérica de brotes de *S. ebulus* denominada SELId. Por lo tanto es muy posible que el polen, quizás las flores, contengan también proteínas monoméricas equivalentes a la Sam n1 sin actividad tóxica, extremo este que no se ha estudiado.

Los resultados obtenidos y su comparación con los datos publicados anteriormente sugieren que al estar la mayor parte de las lectinas de *Sambucus* relacionadas secuencialmente con el alérgeno Sam n1, podrían constituir una familia de alérgenos con propiedades de hipersensibilización similares a los de Sam n1. De ser cierta esta hipótesis convertiría a las lectinas de *Sambucus*, en particular las de frutos, en alérgenos alimentarios.

Muchos alérgenos alimentarios pierden su carácter al pasar a través del estómago donde sufren digestión por pepsina (Vieths y cols., 1998). Por ello se estudió la sensibilidad de nuestras lectinas a pepsina ácida. El hecho de que la ebulina f sea mucho más sensible que la lectina dimérica sugiere que la ebulina f sería poco eficaz como alérgeno en comparación con SELfd, no obstante, dado su toxicidad los efectos serían mucho más serios.

Las ebulinas han sido clasificadas como RIPs tipo II no tóxicas en comparación con la ricina (Girbés y cols., 2004). No obstante la administración a ratones en grandes cantidades de nigrina b de corteza por vía intraperitoneal conlleva la degeneración específica de los intestinos, siendo el efecto más notable en el intestino delgado (Gayoso y cols., 2005; Ferreras y cols., 2011; Battelli y cols. 1997).

La administración vía intraperitoneal de grandes cantidades de ebulina f (5 mg/kg) provoca la muerte de todos los animales en 2 a 4 días, lo que recuerda el efecto altamente tóxico de la ricina. La toxicidad intraperitoneal de la ebulina f se ha establecido en una LD₅₀ de alrededor de 2,8 mg/kg. Ebulina f, a diferencia de nigrina b y ricina, es tóxica por vía oral lo que la convierte en un agente potencialmente peligroso por su uso ilícito (bioterrorismo, contaminación intencionada de alimentos, etc.).

El análisis histológico revela que los mecanismos de acción de la ebulina f dependen de la vía de administración. Así, la administración por vía intraperitoneal conlleva efectos dramáticos en la estructura intestinal que se generan por degradación de las criptas de Lieberkühn. El análisis por microscopía óptica de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina indican que el blanco son las células del tercio medio de dichas criptas en donde se

localizan las células del comportamiento denominado TAC (*transit amplifying compartment*) que son células ligeramente diferenciadas de las células madre de las criptas. La muerte de las células TAC con lleva la atrofia de la mucosa y posterior desaparición de los *villi*.

Por el contrario la administración oral de la misma cantidad de ebulina f por vía oral provoca una fuerte toxicidad que lleva a la muerte a la mitad de los animales a los 10 días. El análisis histológico de los intestinos indica que están muy poco afectados, pero por el contrario presenta una fuerte alteración en otros tejidos particularmente en los pulmones y en el músculo cardíaco. Esto indica claramente que los efectos son diferentes dependiendo de la vía de administración y ello determina la naturaleza del efecto. En el caso de la vía oral el efecto sobre el músculo cardíaco podría provocar fallos en el sistema circulatorio y por lo tanto el encharcamiento de los pulmones. No obstante no se puede excluir una acción directa de la ebulina f sobre las células pulmonares como se ha descrito para la ricina (Lord y cols., 1994). De hecho en los casos en los que se administró la ebulina f por vía oral y se produjo regurgitación parcial de la dosis, y por tanto la entrada de ebulina f en los pulmones, los animales murieron inmediatamente (24-48 h).

La administración de 2,5 mg/kg de ebulina f por vía intraperitoneal no produce por si la muerte de los animales. Sin embargo, la administración conjunta por vía oral de 30 mg/kg de Polyphenon E a estos animales tratados con ebulina f 2,5 mg/kg intraperitoneal provoca un fuerte efecto tóxico que se traduce en la muerte del 60% de los animales en 15 días, con una notable reducción del peso corporal. La cavidad abdominal de estos animales tratados conjuntamente con ebulina f y Polyphenon E tenían un aspecto negruzco y de escasa consistencia, de hecho la retirada del

paquete intestinal debía realizarse con mucho cuidado para evitar su rotura. Esto sugiere un efecto destructivo sobre los tejidos mediado posiblemente por la actuación de los polifenoles que son activadores celulares que producen una respuesta de estrés oxidativo que se uniría de manera sinérgica al efecto de la ebulina f (Schönthal, 2011).

Este efecto abre una vía de investigación interesante en particular en lo que respecta a la administración oral de ebulina f, por cuanto los frutos verdes contienen polifenoles y ebulina f. Esta podría ser la causa de la toxicidad de los frutos descrita en la etnofarmacología (Font-Quer, 1999).

6. CONCLUSIONES.

6. CONCLUSIONES.

1. El procedimiento utilizado en este trabajo para el aislamiento de las lectinas de los frutos de *Sambucus ebulus* permite eliminar un mucílago plástico que estropea las columnas de cromatografía y dificulta enormemente el aislamiento de la lectinas de los frutos de *S. ebulus*, lo que supone un avance tecnológico.
2. Los frutos de pequeño tamaño con 90 frutos por gramo, contienen aproximadamente 2,5 veces más lectina total, suma de ebulina f y SELfd, que los frutos grandes con 28 frutos por gramo. Ambos tipos de frutos se pueden dar en la misma planta.
3. El análisis por espectrometría de masas da valores de 58.904 para ebulina f y 68.678 para SELfd, que concuerdan perfectamente con las masas moleculares aparentes descritas previamente por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
4. El análisis por espectrometría de masas de algunos péptidos trípticos obtenidos de ambas lectinas de *S. ebulus*, indica que existe una relación muy cercana con las proteínas equivalentes presentes en hojas maduras de la misma planta.
5. El análisis conjunto de tamaño molecular y secuencia de aminoácidos permite concluir que la ebulina no es el alérgeno Sam n1 y que las propiedades del alérgeno son consistentes con una lectina monomérica presente en el polen y equivalente a la lectina SELlm presente en brotes de *Sambucus ebulus*.

-
6. Las lectinas ebulina f y SELfd poseen una sensibilidad a pepsina ácida diferente, muy probablemente relacionada con la estructura en particular el grado de glicosilación, pues mientras SELfd está fuertemente glucosilada y la ebulina f no.
 7. Mientras que la lectina SELfd no presenta toxicidad en ratones por administración intraperitoneal, la ebulina f si lo hace con una LD₅₀ de aproximadamente 2,80 mg/kg.
 8. La administración oral de ebulina f presenta también una fuerte toxicidad que provoca la muerte de los ratones con una LD₅₀ de 5 mg/kg que contrasta con ricina administrada oralmente que pose una LD₅₀ de 29 mg/kg.
 9. Los efectos tóxicos de la administración intraperitoneal de ebulina f se traducen fundamentalmente en una profunda alteración del intestino delgado, en particular las criptas de Lieberkühn y después los *villi*, y en menor extensión en congestión pulmonar.
 10. Los efectos tóxicos de la administración oral de ebulina f se expresan fundamentalmente como alteraciones en músculo cardiaco, y una fuerte congestión pulmonar, sin afectarse profundamente el intestino delgado como sucede en la vía intraperitoneal.
 11. La administración conjunta de dosis subletales de ebulina f intraperitoneal y una mezcla de polifenoles del té verde por vía oral provoca una fuerte toxicidad responsable de la muerte del 60% de los ratones en 15 días provocándose una grave pérdida de la consistencia de los tejidos.

-
12. La toxicidad oral de la ebulina en relación con la de la ricina debe tenerse en consideración por su posible uso ilícito.

7. BIBLIOGRAFÍA.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol*;14(10):1269-1273.

Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*; 1154: 237-282.

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

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

Battelli MG, Musiani S, Buonamici L, Santi S, Riccio M, Maraldi NM, Girbés T, Stirpe F. (2004) Interaction of volkensin with HeLa cell: binding, endocytosis, intracellular localization, degradation and exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci*; 61: 1975-1984.

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

Chambery A, del Monaco G, Di Maro A, Parente A. (2009) Peptide fingerprint of high quality Campania white wines by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chem*; 113: 1283-1289.

Christensen KB, Petersen RK, Kristiansen K, Christensen LP. Identification of bioactive compounds from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) that activate the human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma. *Phytother Res*; 24 Suppl 2:S 129-132 (2010).

Chrubasik C, Maier T, Dawid C, Torda T, Schieber A, Hofmann T, Chrubasik S. (2008) An observational study and quantification of the

actives in a supplement with *Sambucus nigra* and *Asparagus officinalis* used for weight reduction. *Phytother Res*; 22(7): 913-918.

Citores L, de Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, Argüeso P, Jiménez P, Méndez E, Girbés T. (1998) Presence of polymerized and free forms of the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein ebulin and a structurally-related new heterodimeric lectin in fruits of *Sambucus ebulus* L. *Planta*; 204: 310-317.

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

Citores L, Muñoz R, de Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, Girbés T.(1996b) Differential sensitivity of HeLa cells to the type 2 ribosome-inactivating proteins ebulin 1, nigrin b and nigrin f as compared with ricin. *Cell Mol Biol*; 42: 473-476.

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

Diesner SC, Untersmayr E, Pietschmann P, Jensen-Jarolim E.(2011) Food allergy: only a pediatric disease? *Gerontology*; 57(1): 28-32.

Endo Y, Tsurugi K.(1987) RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosome *Sambucus*. *J Biol Chem*; 262(17): 8128-8130.

Endo Y, Wool IG.(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 JL, Alaba I, Escarmis C, Fernandez-Luna JL, Mendez E, Salinas M.(1985) The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *Eur J Biochem*; 149: 29-34.

Ferreras JM, Citores L, de Benito FM, Arias J, Rojo A, Muñoz R, Iglesias R, Girbés T. (2000) Ribosome-inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. *Current Topics in Phytochemistry*; 3: 113-128.

Ferreras JM, Citores L, Iglesias R, Jiménez P, Girbés T.(2011) Use of ribosome-inactivating proteins from *sambucus* for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins (Basel)*. 2011 May;3(5):420-41. Epub 2011 Apr 29.

Font Quer, P.(1999) *Plantas Medicinales: El Dioscorides Renovado*. Península, Barcelona.

Förster-Waldl E, Marchetti M, Schöll I, Focke M, Radauer C, Kinaciyan T, Nentwich I, Jäger S, Schmid ER, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. (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(12):1703-1710.

Gayoso M, Munoz R, Arias Y, Villar R, Rojo M, Jimenez P, Ferreras JM, Aranguez I, Girbes T.(1005) Specific dose-dependent damage of Lieberkuhn crypts promoted by large doses of type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b intravenous injection to mice. *Toxicol Appl Pharmacol*; 207(2): 138-146.

Gilani GS, Cockell KA, Sepehr E.(2005) Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *J AOAC Int*; 88: 967-987.

Girbés T, Vázquez D, Modolell . (1976) Polypeptide-chain elongation promoted by guanyl-5'-yl imidodiphosphate. *European Journal of Biochemistry* ,67:257-265.

Girbés T, Citores L, Ferreras JM, Rojo MA, Iglesias R, Muñoz R, Arias FJ, Calonge M, García JR, Méndez E.(1993a) Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol Biol*; 22, 1181-1186.

Girbés T, Citores L, Iglesias R, Ferreras JM, Muñoz R, Rojo MA, Arias FJ, García JR, Méndez E, Calonge M.(1993b) Ebulin I, a non-toxic novel

type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J Biol Chem*; 268: 18195-18199.

Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F.(2004) Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Rev Med Chem*; 4: 461-476.

Hasani-Ranjbar S, Nayebi N, Larijani B, Abdollahi M.(2009) A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World J Gastroenterol*; 15(25): 3073-3085.

Henning SM, Niu Y, Liu Y, Lee NH, Hara Y, Thames GD, Minutti RR, Carpenter CL, Wang H, Heber D. (2005) Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. Center for Human Nutrition, David Geffen School of Medicine, *J Nutr Biochem*. 2005 Oct;16(10):610-6.

Huang PL, Chen HC, Kung HF, Huang PL, Huang P, Huang HI, Lee-Huang S.(1992) Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms. *Biofactors*; 4: 37-41.

Iglesias R, Arias FJ, Rojo MA, Escarmis C, Ferreras JM, Girbés T.(1993) Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Letters*; 325: 291-294.

Kaack K, Austed T.(1998) Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods Hum Nutr*; 52(3):187-98.

Kaczanowska M y Rydén-Aulin M.(2007) Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*; 71: 477-494.

Kalb VF Jr, Bernlohr RW.(1977) A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem*; 82(2):362-371.

Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, Huo C, Chan TH, Dou QP.(2012) Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4:111-31.

Koppelman SJ, Hefle SL, Taylor SL, de Jong GA.(2010) Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Mol Nutr Food Res*; 54(12): 1711-1721.

Krawitz C, Mraheil MA, Stein M, Imirzalioglu C, Domann E, Pleschka S, Hain T.(2011) Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complement Altern Med*; 25: 11-16.

Laemmli UK.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227(5259):680-685.

Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Bourinbaiar AS, Chen HC, Kung HF.(1985) Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 y GAP31. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 8818-8822.

Li XD, Chen WF, Liu WY, Wang GH.(1997) Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins, cinnamomin and camphorin, from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Protein Expr Purif*; 10: 27-31.

López-Otín C, Barber D, Fernández-Luna JL, Soriano F, Méndez E.(1984) The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur J Biochem*; 143: 621-634.

Lord JM, Roberts LM, Robertus JD.(1994) Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J*; 8: 201-208.

Martin L, Jacomet S, Thiebault S.(2008) Plant economy during Neolithic in a mountain context: the case of "Le Chenet des Pierres" in the French Alps (Bozel-Savoie, France). *Vegetal History and Archeobotany*; 17: S113-S122.

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

-
- Montfort W, Villafranca JE, Monzingo AF, Ernst SR, Katzin B, Rutenber E, Xuong NH, Hamlin R, Robertus JD.(1987) The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. *J Biol Chem*; 262(11): 5398-5403.
- Morlon-Guyot J, Helmy M, Lombard-Frasca S, Pignol D, Piéroni G, Beaumelle B.(2003) Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *J Biol Chem*; 278: 17006-17011.
- Muñoz R, Arias Y, Ferreras JM, Rojo A, Jiménez P, Girbés T.(2001) Sensitivity of several cancer cell lines to ricin and the novel type 2 ribosome- inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett*; 167: 163-169.
- Ng TB, Wong JH, Wang H.(2010) Recent progress in research on ribosome inactivating proteins. *Curr Protein Pept Sci*; 11(1): 37-53.
- Nielsen K, Boston R. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*; 52: 785-816 (2001).
- Olsnes S, Pihl A.(1982) EN: *Molecular Action of a Toxins and Viruses* (Cohen, P. and Van Heyningen, S. eds.) pp. 51-105, Elsevier, New York.
- Olsnes S.(2004) The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*; 44: 361-370.
- Pali-Schöll I, Herzog R, Wallmann J, Szalai K, Brunner R, Lukschal A, Karagiannis P, Diesner SC, Jensen-Jarolim E.(2010) Antacids and dietary supplements with an influence on the gastric pH increase the risk for food sensitization. *Clin Exp Allergy*; 40(7): 1091-1098.
- Pali-Schöll I, Jensen-Jarolim E.(2011) Anti-acid medication as a risk factor for food allergy. *Allergy*; 66(4):469-477.
- Pascal JM, Day PJ, Monzingo AF, Ernst SR, Robertus JD, Iglesias R, Pérez Y, Ferreras JM, Citores L, Girbés T.(2001) 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins*; 43: 319-326.
- Peumans WJ, Van Damme EJ. (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*. 109(2), 347-52.
-

Rojo MA, Citores L, Arias FJ, Ferreras JM, Jiménez P, Girbés T.(2003) Molecular cloning of a cDNA coding for the D-galactose-binding dimeric lectin of dwarf elder (*Sambucus ebulus* l.) leaves. *Int J Biochem Cell Biol*; 35: 1061-1065.

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

Rutenber E, Ready M, Robertus JD.(1987) Structure and evolution of ricin B chain. *Nature*; 326(6113): 624-626.

Sandvig K, van Deurs B.(2002) Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett*; 529: 49-53.

Schmitzer V, Veberic R, Slatnar A, Stampar F.(2010) Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Wine: A Product Rich in Health Promoting Compounds. *J. Agric. Food Chem*; 58: 10143–10146.

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

Shih R, Mac Donald KM, Jackman A, Girbés T, Iglesias R.(1997) Bifunctional plant defense enzymes with chitinase and ribosome-inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Science*; 130: 145-150.

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

Spiegel PC, Ermolenko DN, Noller HF.(2007) Elongation factor G stabilizes the hybrid-state conformation of the 70S ribosome. *RNA*, 13:1473-1482.

Steeves, R.M., Denton, M.E., BRNAard, F.C., Henry, A., Lambert, J.M. (1999) Identification of three oligosaccharide-binding sites in ricin. *Biochemistry*, 38:11677-11685.

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

Stirpe F, Bolognesi A, Bortolotti M, Farini V, Lubelli C, Pelosi E, Polito L, Dozza B, Strocchi P, Chambery A, Parente A, Barbieri L.(2007) Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). *Toxicon*; 50: 94-105.

Svinth M, Steighardt J, Hernandez R, Suh JK, Kelly C, Day P, Lord M, Girbes T, Robertus JD.(1998) Differences in cytotoxicity of native and engineered RIPs can be used to assess their ability to reach the cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun*; 249: 637-642.

Timberlake, C.F., Bridle, P. (1977) Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 28:539-544.

Untersmayr E, Jensen-Jarolim E.(2008) The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J Allergy Clin Immunol*; 121(6): 1301-1310.

Van Damme EJ, Barre A, Rougé P, Van Leuven F, 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):505-513.

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

Verberic R, Jakopic J, Stampar F, Schmitzer V.(2009) European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chem*; 114. 511-515.

Vieths S, Frank E, Scheurer S, Meyer HE, Hrazdina G, Haustein D.(1998) Characterization of a new IgE-binding 35-kDa protein from birch pollen with cross-reacting homologues in various plant foods. *Scand J Immunol*; 47(3):263-72.

Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B.(2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci*; 964: 47–68.

Villafranca JE, Robertus JD.(1981) Ricin B chain is a product of gene duplication. *J Biol Chem*; 256(2):554-556.

Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S.(2010) A systematic review on the sambuci fructus effect and efficacy profiles. *Phytother Res*; 24(1): 1-8.

Walz B y Chrubasik S.(2008) Impact of a proprietary concentrate of *Sambucus nigra* L. on urinary pH. *Phytother Res*; 22(7): 977-978.

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

Yagami T, Haishima Y, Nakamura A, Osuna H, Ikezawa Z.(2000) Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods, *J. Allergy Clin. Immunol*; 106: 752–762.

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

ABREVIATURAS

Å : Angström.

A₂₃₀ : Absorbancia a 230 nanómetros.

A₂₆₀ : Absorbancia a 260 nanómetros.

A₃₂₀ : Absorbancia a 320 nanómetros.

ARN : Ácido Ribonucleico.

ARNr : Ácido Ribonucleico ribosómico.

ARNt : Ácido Ribonucleico de transferencia.

Asn : Asparagina.

BSA : Seroalbúmina bovina.

CTV : Concentrado de Té verde.

Da : Dalton.

EtOH : Etanol.

Fen : Fenilamina.

GDP : Guanosín difosfato.

GTP : Guanosín trifosfato.

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

IgE : Inmunoglobulina E.

kD : kiloDalton.

LIR : Lectinas Inactivadoras de Ribosomas.

mA : Miliamperios.

nm : Nanometros.

O⁺ : Eritrocitos humanos grupo O +.

PBS : Tampón fosfato salino.

ppm : Partes por millón.

p/v : Peso por volumen.

RIP : Proteína inhibidora de ribosomas.

rpm : Revoluciones por minuto.
SEA : *Sambucus ebulus* agglutinin.
SDS : Dodecilsulfato sódico.
SNA : *Sambucus nigra* agglutinin.
SNLRP : Proteína de hojas *Sambucus nigra*.
SLT : Transglicosilasa Lítico Soluble.
SRA : *Sambucus racemosa* agglutinin.
SSA : *Sambucus sieboldiana* agglutinin.
TAC : Transit amplifying compartment.
TEMED : tetrametiletilendiamina.
Tir : Tirosina.
UCM : Universidad Complutense de Madrid.
VIH : Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
v/v : Volumen por volumen.

INDICE	Página
1. INTRODUCCIÓN.	2
1.1. Breve reseña del saúco negro (<i>Sambucus nigra</i> L.) y del yezgo (<i>Sambucus ebulus</i> L.)	3
1.1.1. Botánica.	4
1.1.2. Fitoquímica.	5
1.2. Aplicaciones actuales más frecuentes del saúco.	7
1.3. Toxicidad del saúco.	8
1.4. Lectinas (fitohemaglutininas) del saúco.	9
1.4.1. Lectinas antirribosómicas.	10
1.4.1.1. Toxicidad <i>in vitro</i> en células.	13
1.4.1.2. Toxicidad <i>in vivo</i> en ratones.	14
1.4.2. Lectinas no antirribosómicas.	14
1.4.3. Etapa afectada de la biosíntesis de proteínas.	15
1.4.4. Mecanismo de acción molecular.	17
1.4.5. Variación estacional de las lectinas de <i>Sambucus</i>.	20
1.4.5.1. Frutos de <i>Sambucus nigra</i> y de <i>Sambucus ebulus</i>.	20
1.4.5.2. Brotes y hojas de <i>Sambucus ebulus</i>.	21
1.4.5.3. Corteza de <i>Sambucus nigra</i>.	21
1.5. Estructura de ebulina l y nigrina b.	22
1.5.1. Secuencia aminoacídica de ebulina l y nigrina b.	22
1.5.2. Estructura espacial de ebulina l y nigrina b y análisis comparado con ricina.	24
1.5.3. Dominios proteicos de interacción con azúcares.	27
1.6. Tránsito intracelular de las lectinas antirribosómicas vegetales de <i>sambucus</i>.	30
1.7. Desarrollo de alergias alimentarias de origen vegetal.	33
1.8. Alergia de tipo 1 al saúco y alérgeno Sam n1.	35
1.9. Polifenoles de té verde.	35
2. OBJETIVOS DE LA TESIS.	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1. Materiales.	40

3.1.1. Reactivos.	40
3.1.2. Material vegetal.	41
3.1.3. Animales de experimentación.	42
3.2. Purificación de proteínas de frutos de <i>Sambucus ebulus</i> L.	42
3.2.1. Material de partida y obtención de los extracto de <i>Sambucus</i> .	42
3.2.2. Preparación de AT-Sepharose 6B.	43
3.2.3. Cromatografía de afinidad a través de AT-Sepharose (6B).	43
3.2.4. Cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75.	44
3.3 Medida de la concentración de proteínas por el método Kalb & Bernlohr.	45
3.4. Detección de la actividad aglutinante de eritrocitos.	45
3.5. Toxicidad en ratones.	46
3.6. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.	46
3.7. Digestión <i>in vitro</i> con pepsina.	47
3.8. Determinación de la masa molecular de ebulina f y SELfd por espectrofotometría de masas.	48
3.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masas y análisis de secuencias péptidos trípticos.	48
3.10. Obtención de muestras de histología.	50
3.10.1. Perfusión de ratones Swiss.	50
3.10.2. Selección de piezas y toma de muestras.	50
3.10.3. Inclusión en parafina.	51
3.10.4. Realización de cortes.	51
3.10.5. Tinción con hematoxilina/eosina.	52
3.10.6. Análisis de muestras por microscopía óptica.	52
4. RESULTADOS	55
4.1. Frutos de <i>S. ebulus</i> utilizados.	55
4.2. Determinación de masas moleculares de ebulina f y SELfd.	60
4.3. Determinación de péptidos trípticos de ebulina f y SELfd.	62
4.4. Secuenciación de péptidos trípticos y comparación con secuencias de base de datos NCBI Viridiplantae (Green Plants).	64
4.5. Actividades biológicas de ebulina f t SELfd.	66

4.5.1. Hemoaglutinación.	66
4.5.2. Sensibilidad a pepsina.	67
4.6. Toxicidad de ebulina f y SELfd en ratones Swiss.	71
4.6.1. Supervivencia de ratones a la administración intraperitoneal de ebulina f.	71
4.6.2. Supervivencia de los ratones a la administración por vía oral de ebulina f.	76
4.6.3. Efecto de la administración conjunta de Polyphenon E por vía oral y ebulina f por vía intraperitoneal.	80
4.6.4. Efecto de la administración intraperitoneal de 5 mg/kg de SELfd a ratones.	83
4.7. Análisis histológico de los intestinos de ratones Swiss.	84
4.7.1. Análisis histológico de los efectos de la administración vía intraperitoneal de 5 mg/kg peso de ebulina f en ratones Swiss.	87
4.7.2. Efecto de la administración vía oral de 5 mg/kg peso de ebulina f en ratones Swiss.	92
5. DISCUSIÓN.	106
6. CONCLUSIONES.	113
7. BIBLIOGRAFÍA.	113
ABREVIATURAS.	126

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTAS INTERNACIONALES INDEXADAS EN EL JCR 2006.

Pilar Jiménez, Jesús Tejero, Damián Córdoba, Patricia Cabrero, Manuel Córdoba and Tomás Girbés. Differential sensitivity of lectins from fruits of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) to a simulated gastric fluid. *Food Chemistry*, en revisión 2ª versión (2012).

Pilar Jiménez, Manuel Gayoso, Jesús Tejero, Patricia Cabrero, Damián Córdoba-Díaz, and Tomás Girbés. Toxic effects of the antirribosomal lectin ebulin f present in dwarf elderberry (*Sambucus ebulus* L.) on mice. *Journal of Applied Toxicology*, en preparación (2012).

Pilar Jiménez, Manuel Gayoso, Jesús Tejero, Patricia Cabrero and Tomás Girbés. Oral toxicity of ebulin f present in dwarf elderberry (*Sambucus ebulus* L.) in mice and potentiation by oral ingestion of polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, en preparación 2,999.

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

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

FINANCIACIÓN

Los proyectos de investigación que han financiado en parte el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral han sido:

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

Grupo de Investigación reconocido GIR "Inmunotoxinas antitumorales". Organismo financiador: Universidad de Valladolid. Centro de Ejecución: Facs. Medicina y Ciencias Univ. Valladolid. Investigador Principal: Tomas Girbés. Periodo: 2009-2012.

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