

Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y
Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia



TRABAJO DE FIN DE GRADO en NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

CURSO ACADÉMICO 2013 – 2014

“LECTINAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS: APLICACIONES Y USOS MAS IMPORTANTES”

Autora: MARÍA GALLEGO RUBIO

Tutora: PILAR JIMENEZ

RESUMEN

Las lectinas inactivadoras de ribosomas constituyen un grupo de proteínas de origen no inmune, pertenecientes al grupo 2 de las denominadas RIPs, que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, capacidad que les permite desempeñar múltiples funciones como el estudio de las membranas biológicas y caracterización de glucoconjugados de superficie celular y otras funciones aplicadas a los tratamientos terapéuticos relacionados con el cáncer. También poseen propiedades antivirales y de defensa de las plantas que las contienen siendo importantes herramientas en los estudios biomédicos y biológicos. La capacidad tóxica de estas lectinas provoca la inhibición de la síntesis protéica en los ribosomas eucariotas y en otros organismos inferiores como virus, bacterias y hongos. El objetivo de este trabajo consiste en realizar una descripción general y actualizada sobre las lectinas inactivadoras de ribosomas y sus principales usos y aplicaciones.

Palabras clave: *Ribosome Inactivating Proteins, proteínas de unión a carbohidratos, abrina, inmunotoxinas, bioterrorismo.*

INDICE

	PÁGINAS
1. INTRODUCCIÓN	4 - 7
1.2 Conceptos Básicos	4 - 5
1.3 Naturaleza de las lectinas de las plantas	5
1.4 Clasificación	6 – 7
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVOS	9
4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA	10 – 11
5. LECTINAS TÓXICAS DE LAS PLANTAS MÁS IMPORTANTES	12 – 17
6. FIJACIÓN Y ESPECIFICIDAD DE AZÚCARES	18 - 19
7. USOS EN LA TERAPIA DEL CÁNCER: INMUNOTOXINAS	20 – 21
8. USOS ILÍCITOS	22 - 23
9. CONCLUSIONES	24
10. BIBLIOGRAFÍA	25 - 29

1. INTRODUCCION

1.1 CONCEPTOS BÁSICOS

Cada vez es mayor el consumo de alimentos procedentes de fuentes vegetales formando parte de la dieta habitual del ser humano, cuyas características son de considerable valor nutricional y en muchos de los casos constituyen la mejor opción de consumo en detrimento de las fuentes animales. Un ejemplo son las proteínas vegetales, que a pesar de considerarse de menor valor biológico que las procedentes de fuentes animales, debido a la ausencia de ciertos amino ácidos esenciales tales como lisina, metionina y cisteína; constituyen un perfecto sustitutivo de las proteínas animales que por lo general llevan asociadas mayor cantidad de lípidos saturados y por consiguiente pueden ser rechazadas o restringidas por la población. Para suplir la carencia de los citados amino ácidos esenciales de las proteínas de origen vegetal, se deben combinar alimentos de origen vegetal tales como legumbres o verduras con otros alimentos que contengan suficientes cantidades de los amino ácidos limitantes como son los cereales, frutos secos y semillas.

En cambio, los avances en el desarrollo y la evolución tecnológica del análisis de la composición de los alimentos han suscitado un continuo estudio que ha derivado en el descubrimiento de ciertos componentes de plantas y vegetales que en muchos casos son de consumo habitual ⁽¹⁾ que afectan a la seguridad del alimento, cuyo efecto en el organismo es nocivo y en algunos casos con un alto poder de toxicidad; estos componentes son las denominadas lectinas.

El término lectina deriva del latín *ligere* que significa “elegir” y fue introducido por Willian Bloyd en 1954⁽²⁾. Las lectinas son proteínas, generalmente glucoproteínas, de origen no inmunológico que aglutinan y/o precipitan glucoconjugados libres o presentes en superficies celulares. Dicha capacidad de aglutinación se debe al reconocimiento específico y fijación de azúcares ⁽³⁾ que forman parte de glucolípidos y/o glucoproteínas presentes en las membranas celulares de la mayoría de los organismos. Esta característica de las lectinas es descrita en el punto 5 de este trabajo.

La definición de lectina ha variado en los siguientes años a medida que se descubrían nuevas funciones y características de su estructura ^(4,5). Actualmente, para considerar como lectina a una proteína o glucoproteína debe contener al menos un sitio de

reconocimiento de carbohidratos (CRD por sus siglas en inglés) que les permite unirse específicamente y de forma reversible a un determinado mono u oligosacárido, de origen no inmunológico y que además no modifican los enlaces covalentes que forman el carbohidrato al cual se unen.⁽⁶⁾

1.2 NATURALEZA DE LAS LECTINAS DE LAS PLANTAS

Hasta 1970, se conocía la presencia de lectinas en múltiples organismos (principalmente en plantas) sin embargo, su aislamiento se basaba en técnicas convencionales que incluían una serie de precipitaciones con sales y disolventes⁽⁷⁾ Inicialmente fueron identificadas y aisladas sólo en plantas, pero en los años siguientes fueron aisladas de otros organismos como en tejidos animales y microorganismos^(8,9) y las técnicas han ido evolucionando y mejorando a lo largo de los últimos años⁽⁶⁾.

Actualmente se han identificado 357⁽¹⁰⁾ estructuras 3D de lectinas vegetales, siendo las leguminosas el grupo dónde más abundan y pueden constituir el 3% de la proteína vegetal total⁽²⁾, sin embargo hoy en día se han identificado en otros organismos como tejidos animales, bacterias y virus, algas y hongos^(7,8). Además de encontrarse ampliamente distribuidas en la naturaleza, las lectinas se pueden producir mediante técnicas de recombinación usando vectores de expresión de E. Coli⁽⁸⁾.

Su estructura varía en tamaño, acidograma, número, organización y función de los dominios y número de subunidades⁽⁹⁾. Las técnicas de purificación y aislamiento de las lectinas han ido modificándose a lo largo de los años con el fin de aumentar el rendimiento de las mismas y minimizar los costes⁽⁶⁾ siendo las técnicas cromatográficas las más utilizadas.

1.3 CLASIFICACIÓN

En este trabajo atenderemos a la clasificación de las lectinas en 5 familias (Figura 1), que han sido identificadas gracias a las diferencias observadas en su estructura mediante las técnicas cromatográficas de rayos X utilizadas para el estudio de su estructura ⁽¹¹⁾.

En función a esta clasificación nos encontramos las lectinas inactivadoras de ribosomas con acción enzimática, que forman parte de las denominadas RIPs o Proteínas Inactivadoras de Ribosomas, que actúan como tóxicos dañando las células intestinales mediante la interacción con las estructuras glucosiladas (glucolípidos y glucoproteínas) que forman parte de los receptores de la superficie celular de las células del epitelio del intestino.

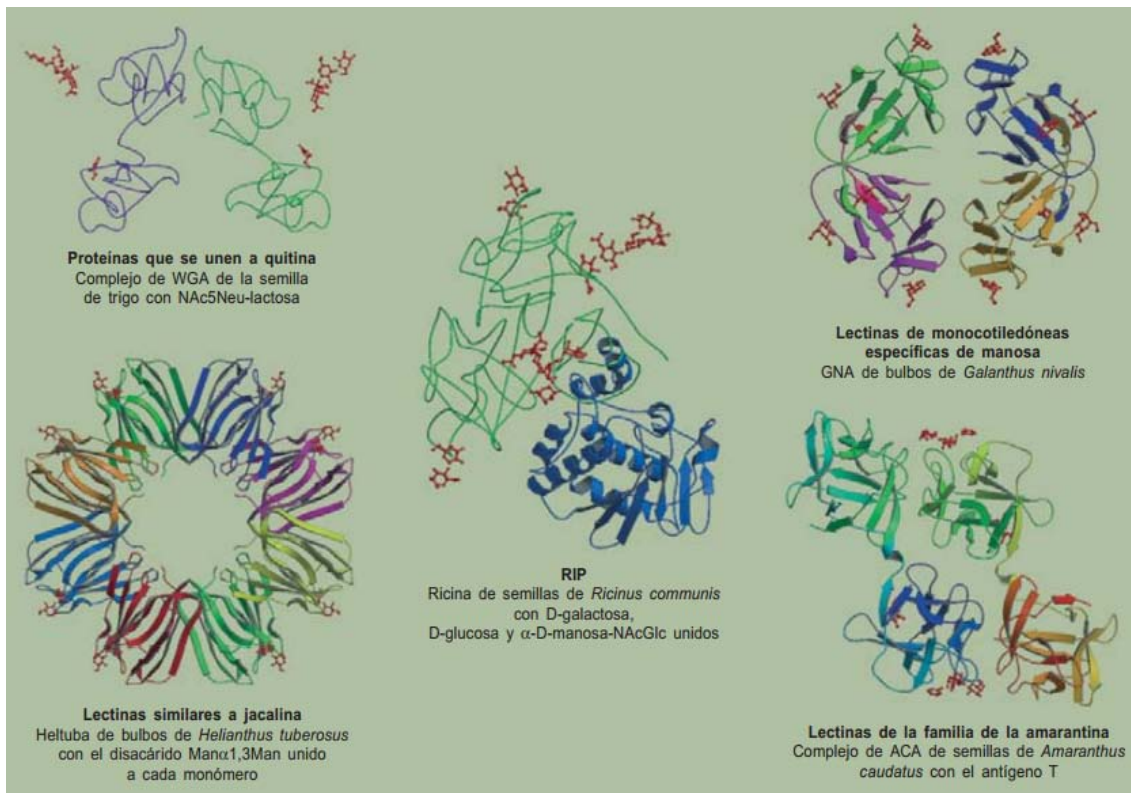


Figura 1. Representación de los diferentes tipos de lectinas vegetales según su estructura cristalográfica. Fuente: Gallego et al 2006

Anteriormente fueron clasificadas en función de la estructura de sus dominios por Van Damme en 1988^(4,5,6) en merolectinas, aquellas con un solo dominio que dispone de únicamente un sitio de unión a carbohidratos; quimerolectinas las cuales disponen 2 o más dominios dispuestos en tándem y otro dominio aislado, las hololectinas formadas por 2 o más dominios y superlectinas que suponen un grupo de quimerolectinas compuestas por dos dominios de unión a carbohidratos dispuestos en tándem cuya estructura y función son diferentes. Los primeros autores en clasificar las lectinas utilizaron la especificidad de monosacáridos de las lectinas vegetales para catalogarlas como se muestra en la tabla 1.⁽⁴⁾

TABLA I

Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos		
MONOSACARIDO	LECTINA	ABREVIATURA
α -D-manosa, α -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i> .	ConA
	<i>Lens culinaris</i> .	LCA
β -galactosa, N-acetil- α -D-galactosamina	.	.
	<i>Ricinus communis</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
N-acetil- β -D-glucosamina	<i>Triticum vulgare</i> .	WGA
α -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i> .	LTA
	<i>Ulex europeus</i> .	UEA
α -N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i> .	LPA

Tabla 1. Fuente: Handbook of plant lectins

Debido a la ubicuidad de las lectinas en los diferentes organismos y las diferencias entre ellas, este trabajo se centra en realizar una descripción de las propiedades y aplicaciones más importantes únicamente de las lectinas de origen vegetal, concretamente aquellas con alto poder tóxico, clasificadas como lectinas inactivadoras de ribosomas y que forman las RIPs, del inglés Ribosome Inactivating Proteins.

2. JUSTIFICACIÓN

El hecho de que las lectinas vegetales, en este caso concreto las RIPs, se encuentren distribuidas entre vegetales cuyo consumo conlleva un riesgo para la salud debido a la toxicidad, y/o se comporten como sustancias antinutrientes supone que la investigación en ciencia de los alimentos se encuentre en continuo desarrollo para así conocer la distribución de estos compuestos y asegurar la seguridad alimentaria de los alimentos donde se encuentran presentes. Además en los últimos años se han atribuido a esta clase de proteínas tóxicas otras funciones de carácter terapéutico y los mismos estudios han contribuido a conocer otras funciones y aplicaciones de las lectinas tales como su utilización como potentes herramientas biomédicas, tanto diagnósticas como terapéuticas. También a las lectinas se le atribuyen usos ilícitos como arma de guerra biológica en el bioterrorismo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar una descripción general sobre las lectinas tóxicas presentes en las plantas y vegetales, algunos de consumo habitual y sus funciones y aplicaciones más importantes así como el desarrollo de éstas como agentes terapéuticos así como los usos ilícitos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características comunes y más importantes de las lectinas vegetales tóxicas de forma generalizada.
- Describir las propiedades y estructura de las principales lectinas tóxicas conocidas y sus mecanismos de acción.
- Realizar una descripción sobre las aplicaciones terapéuticas y diagnósticas más importantes de las lectinas tóxicas procedentes de plantas.
- Determinar los usos no terapéuticos de algunas de las lectinas tóxicas de ciertas plantas utilizadas con fines armamentísticos y como importantes agentes en la guerra biológica.

4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

Entre los meses de Enero a Julio del año 2013 he realizado una búsqueda bibliográfica en la base de datos *PubMed* y *Google Scholar*, y he utilizado como palabras clave “*plant toxic lectins*” combinada con “*carbohydrate binding protein*” y “*bioterrorism*” También se utilizaron “*ribosome inactivating proteins from plants*” combinada con “*abrin*”, “*ricin*” e “*immunotoxins*”. Se impuso un límite de fecha de 5 años atrás aunque se han utilizado documentos anteriores a la fecha límite para poder realizar una introducción general de los temas a tratar. Se estableció un criterio de búsqueda por *reviews* que se eliminó en los casos en los que no existía suficiente bibliografía o se centrada en el tema tratado en este trabajo. A continuación se presenta una tabla con los documentos encontrados correspondientes a cada combinación de palabras clave:

Palabra clave	Reviews	Otros	Año de publicación	
			Reviews	Otros
Plant Toxic Lectins	10	58	2010 - 2013	2009 - 2014
Plant Toxic Lectins specifity carbohydrate binding proteins	51	3	2009 - 2011	2009 - 2013
Plant Toxic Lectins bioterrorism	2	3	2012 - 2013	2012 - 2013
Ribosome Inactivating Proteins from plants	23		2010 - 2014	
Ribosome Inactivating Proteins from plants abrin	3	8	2010 - 2014	2010 - 2014
Ribosome Inactivating Proteins from plants ricin	29	54	2010 -2011	2009 - 2014
Ribosome Inactivating Proteins from plants Inmunotoxins	3	16	2011 -2013	2009 - 2013

Del total de los artículos y revisiones, muchos fueron excluidos porque no se centraban en los contenidos y desarrollo de la estructura de este trabajo, la lengua de la revista era alemán, ruso o chino o no se ha tenido acceso al documento completo y sólo se han podido visualizar los *abstract* de dichos documentos.

Finalmente se revisaron 49 artículos y 2 *abstract*, cuya lectura motivó la búsqueda y lectura de otros artículos que aparecían citados en las respectivas referencias bibliográficas que se consideraron relevantes y que sumaron un total de tantos artículos. Además de los artículos encontrados mediante la búsqueda en Google Scholar utilizando las mismas palabras clave que en la búsqueda sistemática realizada en Pubmed.

Los artículos y revisiones utilizados que han sido extraídas de las referencias utilizadas en los artículos encontrados mediante la búsqueda sistemática realizada en la base de datos Pubmed ascienden a un total de 11 artículos. También se han utilizado como fuentes primarias libros o monografías de capítulos que trataban en profundidad el tema del presente trabajo.

5. LECTINAS TÓXICAS DE LAS PLANTAS MÁS IMPORTANTES

Las lectinas vegetales tóxicas en muchos de los casos se inactivan con el proceso de cocción ^(12,13) o con los enzimas proteolíticos que se segregan durante la digestión, perdiendo la acción tóxica, pero en ocasiones esto no ocurre y en los últimos años se han intentado desarrollar técnicas para reducir estos efectos como en el caso de las lectinas vegetales ricina y α -chalconina ⁽¹²⁾.

En la literatura, las proteínas tóxicas vegetales se agrupan en lectinas, proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs), inhibidores de enzimas proteolíticos y glucosidasas.⁽¹³⁾ Este trabajo se centra en las lectinas denominadas Proteínas Inactivadoras de Ribosomas, conocidas por sus siglas RIPs del inglés Ribosome Inactivating Proteins, concretamente en las RIPs Tipo II o Lectinas Inactivadoras de Ribosomas ya que son las que se consideran tóxicas. La nomenclatura fue introducida por F. Stirpe en 1982 ⁽¹⁴⁾ aunque su existencia se conoce desde Stilkmark en el año 1888.⁽⁴⁾

5.1 PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS (RIPs)

Son un conjunto de proteínas conocidas principalmente por su actividad enzimática N-glucosidasa (Figura 2) que actúa de forma irreversible, en los ribosomas de ARN ribosómico, inhibiendo la síntesis de proteínas; aunque actualmente se han identificado otras funciones enzimáticas que han demostrado que no sólo actúan sobre el ARN ribosómico sino que actúan sobre otros ácidos nucleicos actuando como polinucleótido adenosin glucosidasas, DNasas, antivirales y actividad lipasa ⁽¹⁵⁾

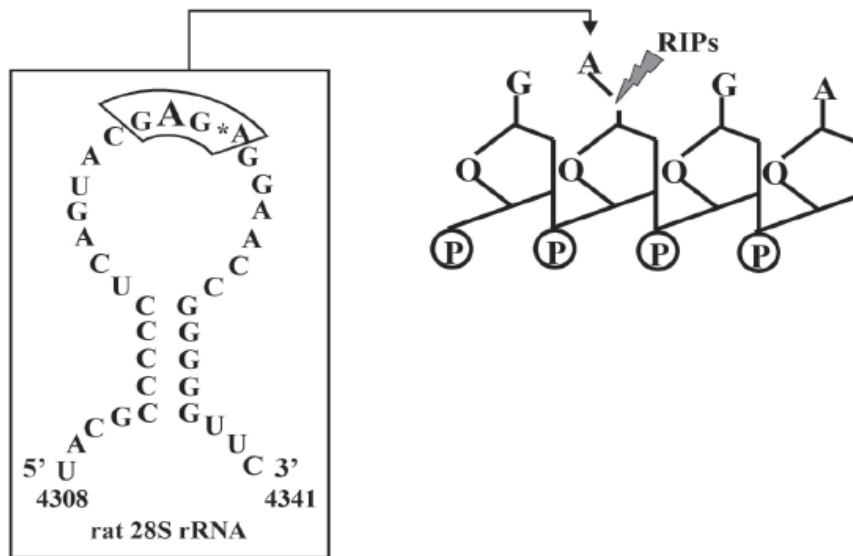


Figura 2. Representación de la actividad N-glicosidasa a nivel celular de las RIP, in vivo y en ratas, que actúan rompiendo el enlace N-glicosídico de la A4324 presente en la 28S del ARNribosómico. Fuente: Stirpe 2005

Se dividen en dos grupos; por un lado las RIPs Tipo I, cuyo ejemplo más estudiado y descrito es la toxina denominada saporina ⁽¹⁶⁾, con una sola cadena peptídica denominada “cadena A”, con un peso molecular de 30KDa con actividad enzimática N-glicosidasa, encargada de la inhibición de la síntesis de proteínas; y por otro las RIPs Tipo II formadas por dos cadenas peptídicas unidas mediante un enlace disulfuro; una cadena “A” similar a la de las RIPs Tipo I con actividad de enzima unida a una cadena denominada “B” con actividad de lectina, es decir, de unión a carbohidratos específicos, libres o presentes en la en las membranas celulares formando parte de los glucolípidos y glucoproteínas presentes en la superficie exterior de la membrana. Una representación de la estructura se presenta en la Figura 3.⁽¹⁷⁾. Actualmente, la estructura y función de cada una de las cadenas es sobradamente conocida pero fueron P.Erlich y cols los pioneros en definir sus respectivas funciones ⁽¹⁸⁾.

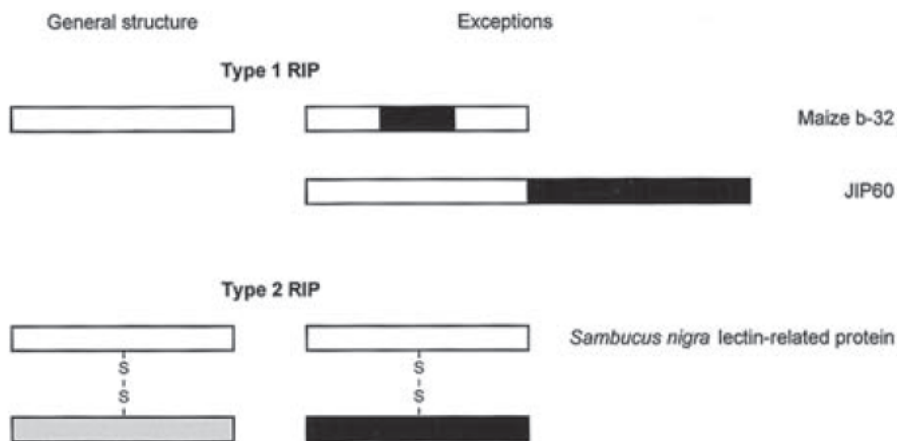


Figura 3. Estructura de las RIPs. Las barras blancas identifican las cadenas con actividad enzimática, las barra gris representa la cadena con actividad lectina y la barra negra representa cadenas con actividad desconocida. Fuente: F. Stirpe and M. G. Battelli, 2006.

Algunos autores han propuesto otras clasificaciones para poder catalogar las RIPs, las Holo-RIPs, RIPs de una sola cadena o dos cadenas pequeñas y las Quimero-RIPs que serían las RIPs de dos cadenas⁽¹⁹⁾, pero actualmente en la mayor parte de la literatura se habla de RIPs Tipo 1 y Tipo 2.⁽²⁰⁻²³⁾ que atiende a la presencia o ausencia de la cadena B.

Se encuentran distribuidas ampliamente en varias familias del reino vegetal y existen amplias listas elaboradas donde se refleja su ubicuidad en las plantas⁽²²⁾ y también se han identificado en algunos hongos y en ciertas bacterias^(23,24). Son más abundantes las RIPs Tipo I que las RIPs Tipo 2, ambas se pueden encontrar diseminadas en diferentes tejidos de una misma planta como ocurre con la saporina, RIP Tipo 1, o en sólo una parte de la planta como ocurre con las semillas de ricina⁽¹⁹⁾.

El mecanismo de acción y vías de entrada a la célula y transporte intracelular se encuentran bien establecidos, y especialmente referido a las primeras RIPs en ser identificadas: la ricina y la abrina,⁽²⁵⁾ consideradas las cabeza de lista del grupo de RIPs Tipo 2. El proceso comienza con la unión de la cadena B de la RIP Tipo 2 con los restos de azúcares específicos que forman parte de los glicoconjugados de las membranas celulares que hay en la célula diana, seguido por la internalización de la de la cadena A gracias a la acción de la cadena B, y el transporte retrógrado al retículo endoplasmático. La cadena A se libera del a través de una vía de degradación asociada al Retículo Endoplasmático. Los procesos implicados están ampliamente descritos recientemente en la literatura.⁽²⁰⁾

Sin embargo, recientemente se han descubierto RIPs Tipo II cuya toxicidad es casi nula para los humanos como son la ebulina y la nigrina ⁽²⁶⁾, lo cual resulta de gran importancia para el uso de estas RIPS no tóxicas como agentes terapéuticos en sustitución de las otras RIPs Tipo 2 mucho más tóxicas y con mayores problemas a la hora de poder ser utilizadas en seres humanos.

Gracias al amplio conocimiento que en los últimos 40 años han proporcionado los estudios sobre esta familia particular de proteínas, se han descrito numerosas aplicaciones en la agricultura como antivirales y antiinsecticidas ^(27,28) relacionados con el rol biológico de las RIPs, como agentes terapéuticos en enfermedades como el cáncer a través de las posibilidades que ofrecen las RIPs para la formación de inmunotoxinas, que son conjugados proteicos formados por una toxina y un anticuerpo u otros transportadores que los hacen especialmente tóxicos para las células diana cancerígenas o cancerosas (tema que será tratado en el punto 7 de este trabajo).

La toxicidad de ambos grupos de RIPs es muy diferente ya que hoy en día se conoce con certeza que está asociada a la cadena "B", siendo las RIPs de Tipo II las más tóxicas, debido a que esa actividad de lectina que se atribuye a la cadena B que poseen, les permite unirse a los receptores de membrana de las células, atravesarlas y poder llegar al citosol donde se produce la traducción o síntesis proteica ⁽²²⁾ Los mecanismos de entrada a las células se recogen en varias revisiones recientes sobre el tema. ⁽²⁰⁾

A continuación se presentan las características de las RIPs Tipo 2 más estudiadas hasta el momento, aunque nuevos estudios han dilucidado nuevas RIPs tanto Tipo 1 como Tipo 2.

5.1.1 Abrina

Lectina tóxica aislada de las semillas y tallos de la planta *Abrus Precatorius*, originaria de África pero que actualmente se extiende a otras regiones subtropicales, donde forman parte de la materia prima utilizada en la elaboración de bisutería y continúa siendo una de las causas de intoxicación accidental por abrina ⁽²⁹⁾. Olsnes ⁽¹⁸⁾ describió múltiples usos que se le atribuyen desde hace cientos de años relacionados con la medicina además de sus aplicaciones como veneno con fines ilícitos contra animales y seres humanos, constituyendo junto con otras toxinas como la ricina, una potente arma de guerra, aspecto que se trata en el punto 8 de este trabajo.

Se trata de una RIP tipo 2 siendo la cadena B galactosa-específica, altamente tóxica que provoca la muerte celular mediante mecanismos de apoptosis que están descritos ampliamente en la literatura y aún siguen siendo estudiadas nuevas vías implicadas en esos mecanismos ^(30,31,32). Actualmente no existe aún ningún antídoto efectivo para la intoxicación por abrina pero nuevas estrategias terapéuticas están en constante desarrollo, como el uso de conjugados con anticuerpos de las biotoxinas, que producen una inmunidad innata en el organismo, específica para cada toxina descrita ya en los años 90 por Paul Ehrlich ⁽¹⁸⁾. Existen varios ensayos clínicos que buscan el desarrollo de nuevos agentes que puedan disminuir o contrarrestar la toxicidad. ⁽³²⁾

5.1.2 Ricina

Lectina tóxica aislada de la planta *Ricinus Communis* en 1888 por Stilkmark ⁽²⁾. Es una proteína extremadamente tóxica aunque los datos sobre su toxicidad varían entre autores ⁽²¹⁾, siendo dicha toxina sensible al calor, desnaturalizándose e inactivándose a una temperatura de 80° C. El mecanismo de acción es idéntico a la toxina abrina, y está formada por dos cadenas peptídicas características de las RIPs tipo 2, unidas mediante un enlace disulfuro. La cadena denominada "B" galactosa o manosa específica se une a las estructuras glucoconjugadas de la superficie de la membrana celular, de esta manera la cadena "A" de la toxina se internaliza en la célula disociándose de la cadena "B", pasa al citoplasma celular donde es captada mediante endosomas primarios, por el Aparato de Golgi y transportada retrógradamente al Retículo Endoplásmico donde a partir de la traslocación de membrana pasa al citoplasma donde realiza su función de inhibición de la síntesis proteica.

5.1.3 Viscumina

Es una RIP de Tipo 2 aislada en la hoja y tallo de la planta del muérdago (*Viscum álbum* L) a principios de los años 80⁽³⁴⁾. Se encuentra en 3 isoformas diferentes dentro de la misma planta cuyas concentraciones en la planta son variables según las zonas cultivadas. En las épocas antiguas ha sido utilizada como una planta con propiedades curativas y venenosas⁽¹⁸⁾ y actualmente su uso se extiende en el campo de la medicina alternativa sobre todo en terapias anticancerígenas⁽³⁶⁾ las cuales defienden la seguridad de su administración. Aunque algunos autores describen efectos perjudiciales del uso de esta planta, como daños en el riñón o perforaciones colónicas entre otras.⁽³⁶⁾

La toxicidad de la viscumina es comparable a la de la ricina y el mecanismo de acción de ambas es similar; la viscumina se une a la célula diana (gracias a su cadena B con actividad lectina, es decir, de unión específica a oligosacáridos que forman parte de la membrana celular de la célula diana, en este caso es específica para galactosa) y tras los procesos de endocitosis para introducir en el citoplasma celular la cadena B encargada de inhibir enzimáticamente la síntesis protéica. Esta interrupción del proceso de síntesis de proteínas induce una respuesta de estrés celular que provoca la liberación de citoquinas por la célula diana⁽¹³⁾ y en dosis altas la viscumina induce apoptosis celular⁽³⁷⁾.

5.1.4 Volkesina

Se trata de otra toxina perteneciente al grupo de las RIPs Tipo 2 y que comparte las características, mecanismo de acción y alta toxicidad de las otras toxinas mencionadas anteriormente. Originaria de África, aislada de la planta *Adena Volkensii*, que contiene otras RIPS que no se revisan en este trabajo⁽³⁸⁾. Su estructura se ha estudiado en recientes artículos.^(39,40)

La toxicidad de la Volkesina afecta a nivel neurológico atacando especialmente las células de la glía.⁽⁴⁰⁾

6. FIJACIÓN Y ESPECIFICIDAD AZÚCARES

Como ya se ha comentado en la introducción, las lectinas vegetales son capaces de reconocer restos de azúcares con una alta especificidad característica de cada familia de lectinas vegetales. Esta característica es lo que ha permitido su uso, desde hace más de 30 años, en el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato presentes en gran variedad de procesos fisiológicos ^(42,43) siendo uno de ellos el reconocimiento celular, utilizado en las técnicas cromatográficas, para la investigación de azúcares de membrana que forman los receptores ^(43,45). La purificación de los receptores de membrana se realiza mediante la incubación de la lectina específica y restos de membranas celulares, produciéndose unos complejos lectina-receptor entre la lectina específica y los receptores que posee el azúcar de reconocimiento que forma parte de las glucoproteínas o glucolípidos de las membranas celulares. Para disociar el complejo formado, se grandes cantidades del monosacárido específico de esas lectinas a los cuales se unirán rápidamente, separándose de los receptores de membrana.

Estos restos de azúcares que reconocen forman parte de oligosacáridos (cadenas cortas de monosacáridos unidos mediante enlace glucosídicos) unidos a las fracciones protéicas y lipídicas de los glicoconjugados que se encuentran en la superficie celular de las membrana de las células.

La especificidad de las lectinas por los monosacáridos reside en la configuración de las estructuras monosacáridas, teniendo la capacidad de diferenciar epímeros de moléculas, según la posición de los grupos hidroxilos que forman el azúcar. De la misma manera, la especificidad de las lectinas por estructuras más complejas como oligosacáridos depende de la conformación espacial y composición aminoacídica de los oligosacáridos.

La unión de las lectinas a los hidratos de carbono se produce entre los grupos hidroxilo (-OH) de los azúcares y el dominio de unión de la cadena B de la lectina. Estas uniones son de tipo no covalente en la mayoría de los caso, es decir, que los carbohidratos a los que se unen no se modifican en el proceso ya que las uniones son de tipo hidrofóbico como interacciones hidrofóbicas, puentes de Hidrógeno, fuerzas de Van der Waalls así como metales de coordinación tales como Mg^{2+} y Ca^{+} presentes en algunas lectinas y que forman enlaces de coordinación con las proteínas (glucoproteínas) participando en la estabilización de la estructura del sitio de enlace del carbohidrato en la lectina.

El dominio de reconocimiento y unión al carbohidrato de la lectinas vegetales de una misma familia comparte características referidas a sus estructuras nativas (similar composición en aminoácidos), secundarias y su organización tridimensional en el espacio, de tal manera que se puede dividir en 2 partes, el sitio que corresponde a la unión de monosacáridos y otro conocido como “sitio extendido” que permite la unión oligosacáridos o polisacáridos más complejos.

Otras acciones en el tráfico y localización intracelular, interacciones ligando-receptor, o participación en la señalización y adhesión celular y en procesos de respuesta inmune innata en el huésped, han sido descritas para las lectinas, todos ellos relacionados con la capacidad de reconocimiento específico de carbohidratos. ^(44,45)

La especificidad de unión a carbohidratos de una lectina es comparable a la unión antígeno-anticuerpo ⁽⁴⁾ y permiten separar polisacáridos y glucoproteínas entre sí y en una matriz con otras sustancias. Además, suponen unas valiosas herramientas en la Glycobiología, ciencia que estudia la estructura y función de los hidratos de carbono, para el aislamiento y la purificación de glicoconjugados como enzimas, antígenos, hormonas, entre otros. ⁽⁴⁵⁾

El fenómeno de especificidad de las lectinas fue descrito a partir de los estudios que revelaron el fenómeno de hematoaglutinación de células rojas ⁽⁴⁴⁾, que dilucidaron el mecanismo mediante el cual ciertas lectinas vegetales en contacto con células animales, producían la aglutinación específica de las células que presentaban en superficie el azúcar de unión a la lectina. Estudios posteriores demostraron que ciertas lectinas, como la Concavalina A, aglutinaron células tumorales pero no las normales ya que estas últimas necesitaban mayores concentraciones de lectina.

7. USOS EN LA TERAPIA DEL CÁNCER: INMUNOTOXINAS

Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* con varias lectinas han demostrado que poseen un efecto inhibitorio en el crecimiento del tumor, siendo las RIPs las pioneras en la construcción de inmunotoxinas y conjugados de utilidad en la terapia experimental del cáncer.

Se denomina inmunotoxina a una especie molecular producida artificialmente a partir de la unión de un anticuerpo y una toxina, concretamente una Proteína Inactivadora de Ribosomas. El anticuerpo está dirigido contra un antígeno presente en la superficie de la célula blanco tumoral y por ello las inmunotoxinas son capaces de identificar y matar a dichas células blanco.⁽²⁶⁾ Los mecanismos de acción de las lectinas son variados ya que dependen del origen celular del tumor, la clase de tumor o la concentración de lectina.⁽⁴⁷⁾ En el caso de los glucoconjugados presentes en las membranas de las células se ha descrito el uso de las inmunotoxinas para el estudio de los cambios estructurales de dichos detectando de esta manera cambios y alteraciones en la expresión de las moléculas presentes en la superficie celular, actuando como marcadores celulares para el reconocimiento de células cancerígenas, llevando a cabo finalmente la apoptosis celular.⁽⁴⁸⁾

Las lectinas presentes en numerosos alimentos como en las leguminosas, inhiben la adherencia de la célula tumoral, proliferación y formación de colonias tumorales; causando hematoaglutinación y efectos citotóxicos sobre las células antitumorales.

Las primeras inmunotoxinas producidas utilizaban como toxina la molécula entera de ricina, pero la elevada toxicidad inespecífica de esta poderosa toxina se descartó para su uso en terapia contra el cáncer. Sin embargo las denominadas inmunotoxinas de primera generación, estaban formadas por la cadena A de la ricina aislada a partir de la disociación de la ricina en un medio reductor unida por puentes disulfuro a un anticuerpo monoclonal dirigido a la célula blanco, al contrario de las inmunotoxinas de segunda generación que utilizan la molécula intacta de ricina, eliminando químicamente la toxicidad de dicha toxina. La presencia de pequeñísimas cantidades de cadena B contaminante permitía la reconstitución de la molécula de ricina y confería a las preparaciones de inmunotoxina una toxicidad inespecífica intolerable para una terapia eficaz y segura. Las patologías que pueden tratarse con inmunotoxinas son todas aquellas basadas en la existencia de células enfermas que

presenten moléculas distintivas específicas en su superficie celular y que estén ausentes o a menor concentración en la superficie celular de las células sanas ⁽²⁶⁾

En investigaciones posteriores, RIP tipo 2 con escasa o nula toxicidad sobre las células han sido descubiertas, como por ejemplo aquellas aisladas de la planta *Sambucus*, cuya escasa toxicidad frente a la ricina, las convierte en perfectos candidatos en la construcción de inmunotoxinas en la terapia del cáncer. ^(49,50)

También lectinas aisladas del melón amargo (bitter melon) induce la apoptosis celular en las células tumorales en el cancer de próstata ⁽⁵¹⁾.

7. USOS ILÍCITOS

Desde la antigüedad existen datos sobre la ricina y la abrina y sus características tóxicas aplicadas como sustancias venenosas ⁽¹⁸⁾. Pero el uso de toxinas como las RIPs de Tipo 2 mencionadas en ataques antiterroristas se considera algo contemporáneo, declarándose como potencial agente de guerra biológico que en casos como la ricina es de fácil acceso y manipulación y ha sido estudiada con fines armamentísticos por algunos países como EE.UU, Inglaterra o la antigua URS ⁽⁸⁾. Otras toxinas derivadas de microorganismos como la toxina Botulínica, toxinas animales y de algas también han sido objeto del desarrollo bélico de otros muchos países. ⁽²⁾

En muchos países es necesaria la importación de alimentos para abastecer a la población y estas transacciones son un perfecto vehículo para la introducción de una toxina en un país. Por eso el uso deliberado de agentes biológicos es una amenaza no sólo para la salud pública, sino también para el sector agrícola y la cadena alimentaria, y aunque hayan sido pocos los casos del llamado agroterrorismo existen reseñas en la literatura que realizan una revisión de los casos de este tipo de bioterrorismo y describen las asociaciones grupales que han utilizado este modus operandi ⁽²⁾ con el fin de conocer las motivaciones que los diferentes grupos puedan tener para el uso de agentes biológicos contra el sector agrícola y poder definir contramedidas y estrategias más eficaces.

Desde 1993, la Convención sobre las Armas Químicas (CWC) incluye en sus listas las toxinas, en especial las mencionadas en este trabajo, como agentes químicos de especial control y en los últimos 10 años se han asociado con grupos terroristas en varios países, pero no se sabe si la utilización de la toxina ha sido realmente efectiva. Otros casos en cambio han sido perfectamente identificados, como el asesinato de Georgi Markov, periodista búlgaro, defensor de los derechos humanos, que murió tras ser intoxicado con la toxina Ricina presente en la punta del paraguas que se utilizó la policía secreta búlgara como arma homicida.

La ricina y otras RIPs de Tipo 2 son letales por vía parenteral o inhalada en pequeñas cantidades. Su toxicidad ha sido estudiada en ratas y produce daños en el tejido pulmonar a partir de los 5 minutos de la inhalación de la toxina lo que induce a pensar que el daño celular derivado de la inactivación de la síntesis proteica se produce rápidamente, y solo las acciones preventivas resultan eficaces si se producen anteriormente, es decir, en el proceso de unión a la célula. Los efectos de la toxina inyectada se traducen en necrosis del tejido muscular y por vía oral tienen una menor toxicidad aun que producen graves daños gastrointestinales, razón por la cual no son muy utilizadas en el agroterrorismo, para contaminar fuentes de agua o grandes cantidades de comida.⁽¹⁹⁾

La identificación de nuevos anticuerpos y vacunas contra la ricina han sido objetivo de múltiples estudios, alguno de ellos recientes, ^(3,4) así como la búsqueda de nuevas técnicas más sensibles y eficaces y rápidas que permitan la rápida detección y cuantificación de las biotoxinas, como los métodos basados en inmunoensayos (5) o la espectrofotometría de masas ⁽⁶⁾. Todo ello junto con el conocimiento por parte del personal sanitario sobre los síntomas derivados de las diferentes formas de exposición a las toxinas constituyen una estrategia más sólida para abordar el problema del bioterrorismo de manera eficaz y efectiva.

8. CONCLUSIONES

- El uso de lectinas para el estudio de las bases moleculares que forman parte de las interacciones carbohidrato-proteína han permitido profundizar en los cambios conformacionales que sufren los restos de azúcares que forman el sitio de reconocimiento en la lectina respecto a otras herramientas utilizadas en la glicobiología.
- El desarrollo de la ciencia de la Glicobiología ha sufrido un importante ascenso con la introducción de las lectinas como herramientas para el estudio de las funciones de los carbohidratos y los procesos patológicos relacionados con su unión con proteínas, abriendo nuevos horizontes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades.
- Las toxinas RIPs constituyen una potente arma de guerra debido a su fácil manipulación y administración, en algunos de los casos.
- Los efectos y los procesos celulares activados por las pequeñas dosis de toxinas cuando se produce una exposición a las mismas a través de las vías adecuadas, son letales e irreversibles.
- El desarrollo de nuevas vacunas y antídotos dilucidan un futuro mejor en el transcurso de los síntomas.
- El constante desarrollo de la biología molecular ha aportado los conocimientos suficientes para que en algunos casos sea fácil la producción a gran nivel de una toxina y que pueda ser utilizada en un ataque masivo a la humanidad.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Luna, A. V., Sobac, R. D., & Domínguez, E. R. (2014). Lectinas en frutas y plantas comestibles: nuevas posibilidades de interacción entre la ciencia de los alimentos y la biomedicina. *CienciaUAT*, 23(1), 60-66.
2. Alejandro Micucci ,H. , Camps, E. (1987). Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. *Acta farmacológica Bonarense* 6 (1) 35-54.
3. Goldstein, IJ; Hughes, RC; Monsigny, M; Osawa, T; Sharon, N. (1980) "What Should Be Called A Lectin." *Nature* 285(5760): 66-66.
4. Van Damme, E. J., Peumans, W. J., Pusztai, A., & Bardocz, S. (1998). *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. John Wiley & Sons.
5. Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, 109(2), 347.
6. Nascimento, K. S., Cunha, A. I., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2012). An overview of lectins purification strategies. *Journal of Molecular Recognition*, 25(11), 527-541.
- 7 Singh, H., & Sarathi, S. P. (2012). Insight of Lectins-A review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 3, 1-9.
8. Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(1), 45-55
9. Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53R-62R.
10. Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales <http://www.cermav.cnrs.fr/>
<http://glyco3d.cermav.cnrs.fr/stats.php?type=lectin>
11. del Sol, F. G., Nagano, C. S., Cavada, B. S., Sampaio, A. H., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2006). Lectinas. *Investigación y Ciencia*, 59.
12. Friedman, M., & Rasooly, R. (2013). Review of the inhibition of biological activities of food-related selected toxins by natural compounds. *Toxins*, 5(4), 743-775.

13. Wu, W., & Sun, R. (2012). Toxicological studies on plant proteins: a review. *Journal of Applied Toxicology*, 32(6), 377-386.
14. Stirpe, F. (1982). On the action of ribosome-inactivating proteins: are plant ribosomes species-specific?. *Biochemical Journal*, 202(1), 279.
15. Peumans, W. J., Hao, Q., & van Damme, E. J. (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?. *The FASEB Journal*, 15(9), 1493-1506
16. Giansanti, F., Di Leandro, L., Koutris, I., Cialfi, A., Benedetti, E., Laurenti, G., & Ippoliti, R. (2010). Ricin and saporin: plant enzymes for the research and the clinics. *Current Chemical Biology*, 4(2), 99-107
17. Molecular Neurosurgery with Targeted Toxins Ronald G. Wiley, Douglas A. Lappi. Capítulo 2. Fiorenza Stirpe
18. Olsnes, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, 44(4), 361-370.
19. Stirpe, F., & Battelli, M. G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(16), 1850-1866.
20. Puri, M., Kaur, I., Perugini, M. A., & Gupta, R. C. (2012). Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug discovery today*, 17(13), 774-783.
21. Wu, W., & Sun, R. (2012). Toxicological studies on plant proteins: a review. *Journal of Applied Toxicology*, 32(6), 377-386.
22. Stirpe, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon*, 44(4), 371-383.
23. Ng, T. B., Wong, J. H., & Wang, H. (2010). Recent progress in research on ribosome inactivating proteins. *Current Protein and Peptide Science*, 11(1), 37-53.
24. Girbes, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., & Stirpe, F. (2004). [Abstract] Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(5), 461-476.
25. Giansanti, F., Di Leandro, L., Koutris, I., Cialfi, A., Benedetti, E., Laurenti, G. & Ippoliti, R. (2010). Ricin and saporin: plant enzymes for the research and the clinics. *Current Chemical Biology*, 4(2), 99-107.

26. Juan, T. G. (2004). Nigrina b: una proteína inactivadora de ribosomas no tóxica del saúco. Utilidad farmacéutica en la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia del cáncer. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (No. 1, pp. 73-94). Real Academia Nacional de Farmacia.
27. Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, 109(2), 347.
28. Carlini, C. R., & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11), 1515-1539.[Abstract]
29. Wooten, J. V., Pittman, C. T., Blake, T. A., Thomas, J. D., Devlin, J. J., Higginson, R. A., & Johnson, R. C. (2014). A case of abrin toxin poisoning, confirmed via quantitation of l-abrine (n-methyl-l-tryptophan) biomarker. *Journal of medical toxicology*, 1-3.
30. Gadadhar, S., & Karande, A. A. (2013). Abrin immunotoxin: targeted cytotoxicity and intracellular trafficking pathway. *PloS one*, 8(3), e58304.
31. Saxena, N., Yadav, P., & Kumar, O. (2013). The Fas/Fas ligand apoptotic pathway is involved in abrin-induced apoptosis. *Toxicological Sciences*, 135(1), 103-118.
32. Bhasker, A. S. B., Sant, B., Yadav, P., Agrawal, M., & Rao, P. V. (2014). Plant Toxin Abrin Induced Oxidative Stress Mediated Neurodegenerative Changes in Mice. *Neurotoxicology*.
33. - Saxena, N., PVL, R., ASB, B., & Bhutia, Y. D. (2014). Protective effects of certain pharmaceutical compounds against abrin induced cell death in Jurkat cell line. *International Immunopharmacology*
34. Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K., Pihl, A., 1982. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *J. Biol. Chem.* 257, 13263–13270.
35. Bao, Y., Kong, X., Yang, L., Liu, R., Shi, Z., Li, W., & Hou, W. (2014). Complementary and Alternative Medicine for Cancer Pain: An Overview of Systematic Reviews. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
36. Posadzki, P., Watson, L. K., & Ernst, E. (2013). Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. *Clinical Medicine*, 13(1), 7-12.

37. Patočka, J., & Středa, L. (2006). Protein biotoxins of military significance. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 49(1), 3-11.
38. Battelli, M. G., Scicchitano, V., Polito, L., Farini, V., Barbieri, L., & Bolognesi, A. (2010). Binding and intracellular routing of the plant-toxic lectins, lanceolin and stenodactylin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(12), 1276-1282.
39. Severino, V., Paiardini, A., Pascarella, S., Parente, A., & Chambery, A. (2009). Structural analysis of toxic volkensin, a type 2 ribosome inactivating protein from *Adenia volkensis* Harm (kilyambiti plant): Molecular modeling and surface analysis by computational methods and limited proteolysis. *International journal of biological macromolecules*, 45(4), 407-413.
40. Chambery, A., Severino, V., Stirpe, F., & Parente, A. (2007). Cloning and expression of the B chain of volkensin, type 2 ribosome inactivating protein from *Adenia volkensis* harms: Co-folding with the A chain for heterodimer reconstitution. *Protein expression and purification*, 51(2), 209-215.[Abstract]
41. Sparapani, M., Buonamici, L., Ciani, E., Battelli, M. G., Ceccarelli, G., Stirpe, F., & Contestabile, A. (1997). Toxicity of ricin and volkensin, two ribosome-inactivating proteins, to microglia, astrocyte, and neuron cultures. *Glia*, 20(3), 203-209.
42. Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(1), 45-55.
43. Ochoa, J.L. 1981. "Consideration of the nature of the lectin-carbohydrate interaction". *J. Chromatogr.* 215:351-360.
44. Weis, w., Drickamer, k. 1996. "Structural basis of lectin carbohydrate recognition". *Annu.Rev. Biochem.* 65:441-473.
45. Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53R-62R.
46. Sharon, N. (2007). Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2753-2764

47. Ghazarian, H., Idoni, B., & Oppenheimer, S. B. (2011). A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemica*, 113(3), 236-247.
48. Castillo-Villanueva, A., & Abdullaev, F. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación clínica*, 57(1), 55-64.
49. Liu, B., Bian, H. J., & Bao, J. K. (2010). Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287(1), 1-12.
50. Ferreras, J. M., Citores, L., Iglesias, R., Jiménez, P., & Girbés, T. (2011). Use of ribosome-inactivating proteins from *Sambucus* for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins*, 3(5), 420-441.
51. Xiong, S. D., Yu, K., Liu, X. H., Yin, L. H., Kirschenbaum, A., Yao, S. & Levine, A. C. (2009). [Abstract] Ribosome-inactivating proteins isolated from dietary bitter melon induce apoptosis and inhibit histone deacetylase-1 selectively in premalignant and malignant prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 125(4), 774-782.

