



ALTERACIONES HISTOLÓGICAS CAUSADAS POR LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE EBULINA EN RATONES

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR,
HISTOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA.

Trabajo de fin de grado en el grado de
Medicina.

Valladolid, Mayo 2017

Andrea Vicente Pardo

Tutor: Dr. Manuel Garrosa

ÍNDICE	Pág.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
II.1. LAS RIPS	2
II.2. ACTIVIDADES DE LAS RIPS	3
II.3. PAPEL BIOLÓGICO DE LAS RIPS EN LAS PLANTAS	4
II.4. TOXICIDAD DE LAS RIPS	6
II.5. APLICACIONES Y FUTURO DE LAS RIPS	8
II.6. LA EBULINA	9
II.7. TOXICIDAD DE LA EBULINA	12
III. MATERIAL Y MÉTODOS	13
IV. RESULTADOS	14
V. DISCUSIÓN	18
VI. CONCLUSIONES	21
VII. BIBLIOGRAFÍA	22

I. RESUMEN

La ebulina es una proteína inhibidora de ribosomas tipo 2 con actividad lectina (RIL) aislada del saúco enano. Los frutos del saúco se han consumido desde la antigüedad por sus atribuidos efectos medicinales. En la actualidad se está estudiando su posible uso en la terapia contra el SIDA y como antineoplásico. Nos planteamos, por tanto, un estudio experimental para valorar la toxicidad de esta proteína antirribosómica. Para ello administramos intraperitonealmente una dosis única de 5mg/kg de ebulina a 6 ratones Swiss adultos (40-45 g), empleando 3 como controles a los que se les inyectó SSF. Los animales, tras anestesia, fueron sacrificados mediante perfusión intracardíaca y fijados con paraformaldehído al 4%. Se tomaron muestras de estómago, intestinos delgado y grueso, hígado, riñón, pulmón y corazón, que fueron incluidas en parafina para su posterior estudio histológico mediante H&E y tricrómico de Masson. La inyección de ebulina provoca en el intestino delgado desde apariencia edematosa con epitelio aplanado hasta total desaparición de las vellosidades y atrofia de las criptas de Lieberkühn, con células necróticas en su interior, así como un aumento de las apoptosis. Las criptas del intestino grueso también se ven afectadas, aunque en menor grado, conservando su citoarquitectura, donde las células caliciformes aparecen más resistentes. Los pulmones se muestran congestivos tanto en animales control como en experimentales, encontrándose solo en experimentales focos hemorrágicos. En el corazón hallamos dehiscencia y degeneración de algunas fibras cardíacas en varios de los animales tratados. Nuestros resultados muestran que la ebulina resulta tóxica a la dosis administrada, y comparando la vía de administración ip con la vía oral encontramos que con esta última aparece más daño en el corazón y los pulmones pero no en el resto de órganos estudiados. El consumo de frutos del saúco debe, por tanto, tener esto en consideración y tomar medidas que detoxifiquen, como la cocción. Por su parte, la ebulina podría ser combinada con sustancias como la cloroquina para aumentar su toxicidad en células tumorales, o con nanopartículas para llegar al SNC, o con anticuerpos, creando inmunotoxinas que dirijan su toxicidad de forma selectiva frente a las células tumorales o infectadas por VIH.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. LAS RIPS

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) son enzimas (EC 3.2.2.22) con actividad N-glicosidasa en la adenina 4324 que se unen al esqueleto ribosa fosfato del ARNr 28S de los ribosomas. Esta adenina se encuentra en un bucle muy conservado denominado lazo α -sarcin / ricina (SRL) (Figura 1) y es necesaria para la interacción con el factor de elongación eucariota 2 (eEF-2); por lo que la acción de las RIPs impide la promoción de la traslocación dependiente de GTP de la cadena proteica naciente desde el sitio A al sitio P del ribosoma, inhibiendo la síntesis de proteínas de manera irreversible.

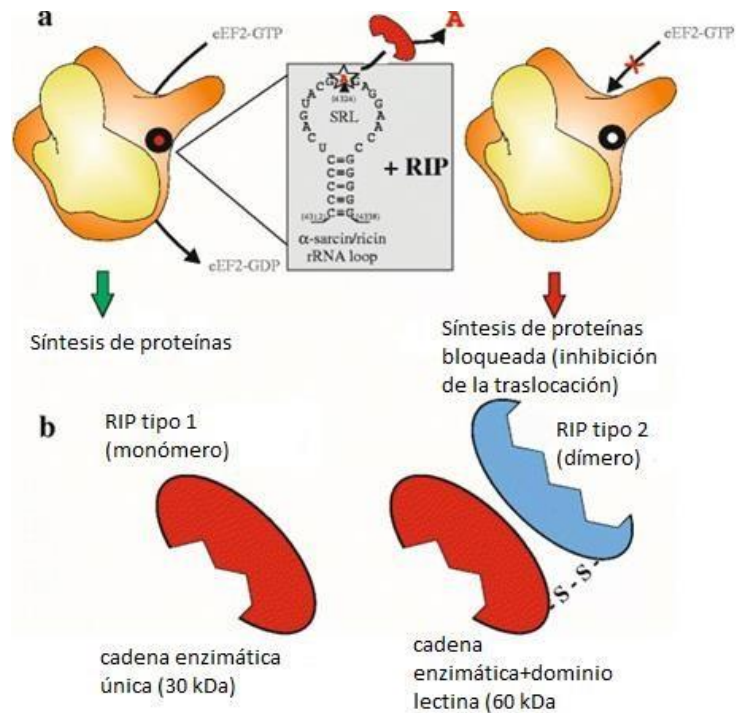


Figura 1: dibujo esquemático de la acción de las RIPs bloqueando la síntesis proteica (a) y de los tipos 1 y 2 de RIPs (b).

Se han descrito tres tipos de RIPs (Tejero et al 2015): las RIP tipo 1 con solo una cadena enzimática (cadena A); RIP tipo 2: proteínas de 2 ó 4 cadenas (A-B o [A-B]₂), unidas mediante puente disulfuro. La cadena A tiene actividad enzimática y la cadena B es un dominio lectina, ya que tiene afinidad por polisacáridos de

membrana, concretamente por residuos de galactosa. Las RIP tipo 3 son un tipo especial de cadena única de RIPs que solo se han encontrado en Poaceae. Las RIP tipo 1 son relativamente abundantes y más de 30 han sido aisladas. Como ejemplos de RIP tipo 1 tenemos ebulitins α y β de *Sambucus ebulus* L. o briodina S de Cucurbitaceae; de RIP tipo 2, diferentes formas de ebulina (*S. ebulus* L.), ricina, abrina, viscumina, modicina, volkensina y eutirucalina, esta última en el látex de *Euphorbia tirucalli* (Tabla 1). Las RIPs 1 no reconocen receptores al carecer de la cadena lectina y no atraviesan la membrana, con lo que resultan menos tóxicas.

	Parte de la planta	Proteína	Mr (kDa)			Afinidad azúcar	Rto/100 gr material	IC50 (nM)
			Conjunto	Cadena A	Cadena B			
S. ebulus	Hojas	Ebulina l	56.0	26.0	30.0	Gal	3.2	0.15
	Frutos	Ebulina f	56.0	26.0	30.0	Gal	1.6	0.03
	Flor	Ebulina blo	60.0	34.0	30.0	Gal	5.9	
	Rizoma	Ebulina r1	56.0	26.0	30.0	Gal	1.34	0.34
	Rizoma	Ebulina r2	56.0	26.0	30.0	Gal	0.56	1.14
	Rizoma	SEA I	140.0	30.0	35.0	Neu5Ac-Gal/GalNac	6	1
S. nigra	Corteza	Nigrina b	58.0	26.0	32.0	Gal/GalNac	254	0.1
	Corteza	Nigrina básica b	64.0	32.0	32.0	No determinado	90	0.02
	Corteza	SNA-I	240.0	33.0	35.0	Neu5Ac-Gal/GalNac	100	1.65
	Corteza	SNA-I'	120.0	32.0	35.0	Neu5Ac-Gal/GalNac	0.2	1.25
	Corteza	SNRLP1	68.0	34.0	34.0	Gal/GalNac oligomero	100	7
	Corteza	SNRLP2	62.0	30.0	32.0	Gal/GalNac oligomero		7
	Corteza	SNA-V	120.0			Gal/GalNac		
	Fruto	Nigrina f	58.0	26.0	31.6	Gal	1.3	0.03
Semillas	Nigrina s	57.3	26.0	31.0	Gal			
S. sieboldiana	Corteza	Sieboldina b	60.0	27.0	33.0	Neu5Ac-Gal/GalNac	2.6	0.9
	Corteza	SSA	115.4	28.7	29.0	Neu5Ac-Gal/GalNac		>100

Tabla 1: Características de las RIPs tipo 2 aisladas del *Sambucus ebulus*, *Sambucus nigra* y *Sambucus sieboldiana* (modificado de Tejero et al. 2015).

II.2. ACTIVIDADES DE LAS RIPS

Ya hemos dicho que la principal actividad de las RIPs es la inhibición de la síntesis de proteínas, pero ya se han estudiado otras actividades como la actividad

fosfatasa en los lípidos, que puede estar relacionada con la mejora del perfil lipídico, actividad DNasa superóxido dismutasa con efectos antimicrobianos y antiparasitarios. También se han visto la actividad quitinasa y topoisomerasa en el ADN (Di Maro et al. 2016).

Además, también se ha comprobado que la ricina, una vez inactivada su acción sobre los ribosomas, continuaba siendo casi tan tóxica como la ricina nativa, lo que favorece la hipótesis de que las RIPs pueden actuar sobre diferentes sustratos.

Las RIPs son más activas a pH ácido que a pH básico, debido a que a pH ácido tanto el ADN como el ARN tienen una estructura menos rígida y hay más facilidad para acceder a ellos por parte de las RIP. Pero se ha visto que los ribosomas no se depurinan bajo las condiciones óptimas a pH ácido como ocurre con los ácidos nucleicos, lo que sugiere que en función de las condiciones celulares, las RIPs pueden alcanzar distintos objetivos.

Se ha observado que la lectina Eutirucalina favorece el reclutamiento de neutrófilos *in vitro* e induce la síntesis de TNF- α , IL12 y NO por macrófagos catalogándose así de estimulador inmune. Se comprobó que ni la migración de neutrófilos ni la interacción lectina-macrófago fueron inhibidas por la presencia de galactosa. A raíz de esos hallazgos se propusieron dos hipótesis: 1. Hay un complejo de glicanos en los macrófagos, que es reconocido más fuertemente por la lectina que la galactosa ó 2. La respuesta biológica observada no está mediada por el dominio de reconocimiento de carbohidratos. También se ha visto que la capacidad inductora de la producción de citocinas existía también en otras RIPs como la ricina y la modicina. Parece que esta actividad inmunoestimuladora se relaciona más con la cadena A (cadena activa) que con la B (Santana et al. 2014).

Asimismo, se ha visto que las RIPs, en ocasiones, eliminan más de una adenina provocando una multidepuración, aunque aún se desconoce el significado funcional de este proceso.

II.3. PAPEL BIOLÓGICO DE LAS RIPS EN LAS PLANTAS

Las diferencias en la actividad mencionadas anteriormente, otras propiedades de las RIPs y sus diferentes concentraciones y localización en los tejidos vegetales

apuntan a diferentes posibles papeles biológicos de estas enzimas en las plantas. Algunas RIP tipo 1 aumentan su concentración en las hojas en la senescencia y en la maduración de los frutos, mientras que otras son constitutivas y no cambian en el ciclo de vida de la planta. Sin embargo, las RIP tipo 2 casi desaparecen en la hoja en senescencia (Stirpe et al. 1996).

La aparición o incremento de estas enzimas en la maduración, en la senescencia o en condiciones de estrés sugiere que una función de las RIP podría ser participar en favorecer la muerte de estas células dañadas. Se ha observado que algunas RIPs se expresan, se activan, o se segregan cuando las células deben morir, sufrir apoptosis en la senectud, o en una infección viral (por ejemplo, en la hipersensibilidad de las plantas tras infecciones virales). En una infección vírica, estas enzimas se sintetizan para inhibir la síntesis de proteínas y provocan la muerte a la célula para evitar la propagación del virus. Además, es posible que las RIP desencadenen la muerte de sus propias células actuando también sobre el ADN, como ya mencionamos anteriormente. Este último mecanismo sería un sistema altamente eficiente, pues pocas alteraciones o incluso un solo cambio crítico en una región de ADN serían suficiente para provocar la muerte de la célula.

En cuanto a la ebulina, RIP 2 en la que me centraré en el trabajo, se ha visto que aparece en frutos, hojas y flores del *Sambucus ebulus* L. (saúco menor o enano, yezgo o sauquillo) en función de la etapa de desarrollo de esta planta. Se vio que en los frutos, con la maduración, se produjo una reducción significativa de la concentración de la ebulina (RIP2) y de la lectina estructuralmente relacionada (SELfd). Se encontraron en los frutos verdes hasta 16 mg/kg de peso húmedo de ebulina mientras que en los frutos maduros apenas se ha encontrado (Tejero et al. 2015). Además se ha observado que la ebulina f solo polimeriza en los frutos verdes y no ocurre en los maduros (tampoco polimeriza la ebulina I en las hojas). En las hojas del saúco es máxima la concentración en los brotes pequeños de 1 mm de tamaño y va desapareciendo con el crecimiento de éstas; ocurre al contrario con la lectina estructuralmente relacionada en las hojas SELfd, que aumenta su concentración cuando maduran las hojas, siendo prácticamente la única lectina que vemos en las hojas senescentes. Se piensa que la ebulina en hojas y en los frutos podría ser un anti-nutriente para proteger los brotes y los frutos

de los insectos depredadores cuando las hojas están creciendo y que permita así formar las semillas.

II.4. TOXICIDAD DE LAS RIPS

Entre las RIPS, destaca la toxicidad de la ricina que es hasta 5000 veces más tóxica que otras RIP 2 como la nigrina o la ebulina, y parece que esto se debe a la ruta intracelular que siguen estas proteínas. Dicha ruta varía en función de distintas condiciones, como la diferente expresión de ligandos en la superficie celular o la variabilidad en la disponibilidad de vías para el traslado de la RIP al citosol. La vía de internalización de la ricina en las células animales es mediante endocitosis en la membrana, tras reconocer aquí restos de galactosa, va entonces hacia la red trans-Golgi y de aquí al retículo endoplásmico mediante transporte vesicular retrógrado. Una vez en el lumen del retículo endoplasmático, las cadenas A y B se disocian y la cadena A activa se va hacia el citoplasma. Se ha observado que la ebulina tiene menor afinidad por la galactosa que la ricina, debido a diferencias estructurales, como el grupo carboxilo subdominio 2 γ de la cadena B de la ricina y ausente en la ebulina, así como la sustitución de Tir en este mismo subdominio en 249 por Fen (Pascal et al. 2001) y en la posición 67 por Asn (Steeves et al. 1999). Esta puede ser una de las causas de la menor toxicidad de la ebulina con respecto a la ricina. RIPS menos tóxicas como la nigrina y la ebulina siguen una ruta desde los endosomas a los lisosomas, donde son degradadas y se expulsan de la célula los productos inactivos. La acumulación de estas RIPS menos tóxicas en los endosomas provocaría la traslocación no específica al citosol (concentración dependiente), permitiendo así la acción sobre los ribosomas. Además la ricina tiene actividad lipasa la cual facilita su llegada al citosol mientras que la ebulina o la nigrina no la tienen, lo que hace que permanezcan en los lisosomas produciéndose su degradación (Figura 2).

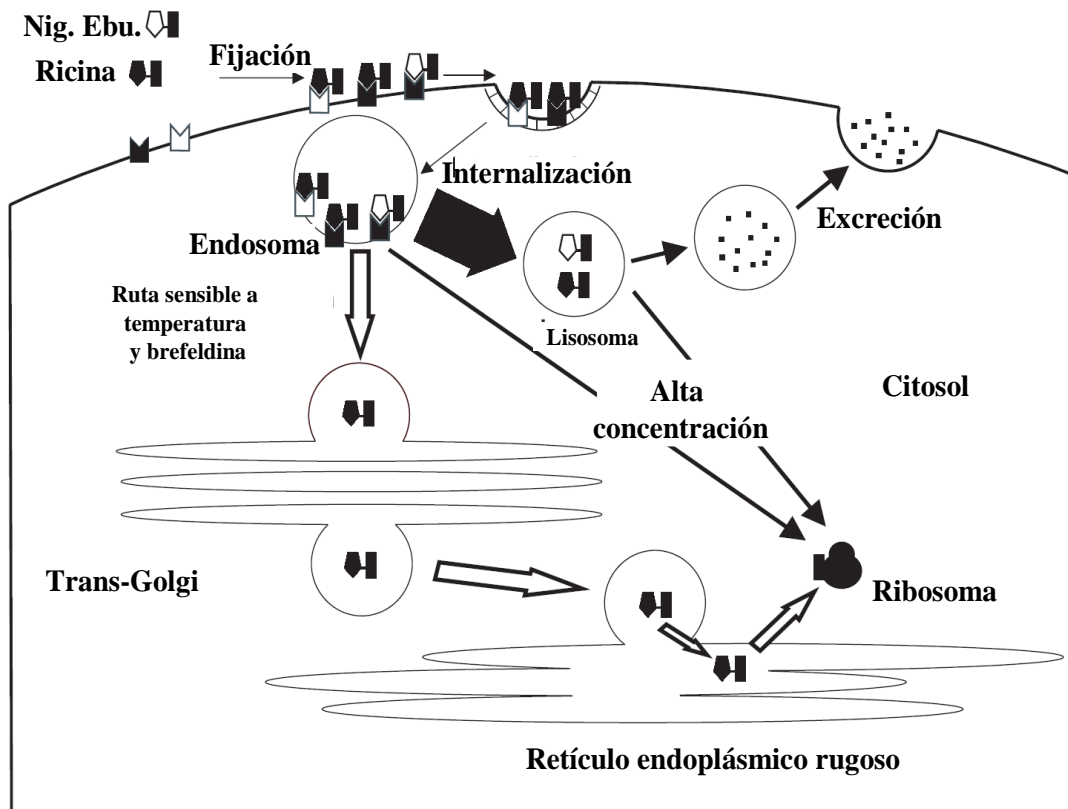


Figura 2: Esquema representativo de la ruta intracelular. La ebulina y la nigrina siguen la ruta endosoma-lisosoma-excreción, en tanto que la ricina penetra hacia el endosoma, desde donde pasa al aparato de Golgi y después directamente hasta el retículo endoplásmico por transporte retrógrado.

Otra explicación para la diferente toxicidad de la ricina y la ebulina puede ser que la primera es capaz de inhibir la reacción de proteína desplegada (UPR) responsable de la degradación proteasa en los proteasomas y sin embargo, parte de la ebulina sería degradada por esta enzima antes de inhibir la síntesis de proteínas en los ribosomas.

Para ser activas en ribosomas, la mayoría de las lectinas deben reducirse. Esto apunta a que cuando las RIPs están en el estado nativo el sitio activo no tiene acceso al lugar de unión en el ribosoma. Es probable que las RIPs menos tóxicas tengan más dificultad para reducir los puentes disulfuro que unen ambas cadenas.

También se ha visto que el calor desnaturaliza la proteína inactivando su acción (se reduciría así la toxicidad de los frutos verdes) (Jiménez et al. 2017).

La falta de toxicidad de la ebulina I intacta, incluso a altas concentraciones, hace que sea muy interesante su uso terapéutico y para la construcción de inmunotoxinas.

II.5. APLICACIONES Y FUTURO DE LAS RIPS

En la actualidad se está estudiando principalmente su uso en la terapia contra el SIDA y sobre todo como posible futuro tratamiento para el cáncer al ser capaz de inhibir los ribosomas y provocar la muerte celular. Sería interesante disminuir la toxicidad de estas proteínas y ser más selectivos con la diana, para por ejemplo atacar solo a un tipo celular. Hoy en día hay múltiples estudios preclínicos que abordan la aplicación de estas moléculas.

Se plantean diferentes alternativas para reducir la toxicidad de las RIPS, como por ejemplo unir RIPS a anticuerpos: obteniendo moléculas quiméricas conocidas como inmunotoxinas, que combinan la acción tóxica intracelular para provocar la muerte de las células y la especificidad de la diana que da el anticuerpo. Más novedoso sería obtener RIPS unidas a nanopartículas: Las nanopartículas pueden atravesar la barrera hematoencefálica, y por su tamaño nanométrico pueden entrar en varios compartimentos celulares, incluido el núcleo, abriendo nuevos caminos para el tratamiento con estas enzimas.

Se ha construido una inmunotoxina fusionando ebulina I y el anticuerpo monoclonal anti-CD105 humano obteniendo así la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas en células que expresan CD105 humano. Se ha visto que además de inhibir la angiogénesis como otros fármacos antiangiogénicos, es capaz de destruir vasos sanguíneos ya formados por el tumor. (Tejero et al. 2015). También se ha construido un conjugado de ebulina I con transferrina humana, manteniendo tanto la capacidad de direccionamiento de las células que expresan el receptor de transferrina como la inhibición de la síntesis de proteínas celulares dependiendo de la orientación.

En la actualidad en el laboratorio de Oncología de Hadassah-Jerusalén se ha visto que el fruto del *Sambucus ebulus* estimula el sistema inmunológico del cuerpo y se están tratando a pacientes de cáncer y SIDA con él (Porter et al. 2017)

II.6. LA EBULINA

En mi trabajo me voy a centrar en la ebulina, que como ya hemos dicho es una RIP tipo 2 que se está investigando como posible tratamiento contra el cáncer. La ebulina se aisló del *Sambucus ebulus* L (Girbés et al. 1993). Pertenece a la familia Caprifoliaceae (Adoxáceas) dentro de la cual hay unas 40 especies diferentes de arbusto medio. El *Sambucus ebulus* es nativo del sur y centro de Europa, y del sudoeste de Asia y crece en abril en climas templados y húmedos cerca de los ríos, floreciendo al inicio del verano.

Desde el neolítico se han usado diferentes partes de esta planta tanto como remedio medicinal para diferentes patologías, como alimento eligiendo sus frutos, fuente de sustancias como vitamina C, flavonoides y compuestos fenólicos.

Se han observado restos de saúco enano en yacimientos arqueológicos en el sur de Francia y norte de Italia de 6000 años de antigüedad y en los tratados de Hipócrates y Dioscórides ya se nombra esta planta con propiedades terapéuticas. Los romanos también se han beneficiado de sus efectos medicinales. En el libro "The Physicians of the Myddavai" escrito en el siglo XII se recoge el saúco menor como planta medicinal para distintas afecciones.

El doctor Blockwich publicó el libro "Anatomía Sambuci" en el que hasta 70 enfermedades pueden ser tratadas con remedios a base de saúco.

El fruto del saúco se enumera en el Manual de Hierbas Medicinales CRC en 1985, y en la enfermería de referencia de Drogas 2000 de Mosby para los resfriados, la gripe, las infecciones por hongos y nasales, la congestión del pecho y la fiebre del heno. El jugo de la baya del saúco se utilizó para tratar una epidemia de gripe en Panamá en 1995, reduciendo los síntomas y acortando la duración en aquellos pacientes que la consumían.

El mecanismo de acción de la ebulina es el propio de una RIP, la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas; y su cadena B se une selectivamente a D-galactosa.

Se ha visto que la cadena A de la ebulina I no comparte un alto grado de homología con la cadena A de otras RIP tipo 2, sino con la briodina S de Cucurbitaceae (RIP tipo 1) y con otras RIP 1 que se usan contra el VIH de tipo I tricotsanina y TAP 29. La cadena B tiene gran parecido con la cadena B de la ricina y de lectinas no antirribosómicas del Sambucus.

Si tratamos con anilina ácida el ARNr de los ribosomas de reticulocitos de conejo a los que previamente se les añadió ebulina, se libera el fragmento de ARN que es el diagnóstico de la acción catalítica de RIP (actividad del rRNA N-glicosidasa en los ribosomas de mamíferos). La ebulina a dosis de 51 microgramos por mL aglutina completamente eritrocitos humanos y es de 1.000 a 5.000 veces menos tóxica que la ricina.

En el saúco enano se han encontrado diferentes isoformas de la ebulina en sus distintas partes, así como otras lectinas relacionadas.

La **ebulina I**, llamada así por haberse obtenido de las hojas (leaves) fue la primera RIP aislada del saúco. Está compuesta por dos subunidades, una subunidad A con actividad N-glicosidasa (26.000 kDa) y una subunidad B con propiedades de lectina que se une a D-galactosa (30.000 kDa), ambas subunidades unidas mediante un puente disulfuro. La Ebulina I inhibe la síntesis de proteínas en mamífero, en presencia de un reductor, con una concentración que da un 50% de inhibición (CI50) de 8 ng/ml en reticulocitos de conejo, 15 ng/ml en hígado de rata y 5 ng/ml para sistemas libres de células de cerebro de rata. Sin embargo, la ebulina I no inhibe la síntesis de proteínas en sistemas libres de células vegetales y bacterianas. La ebulina I es aproximadamente 10.000 veces menos tóxica para las células cultivadas de mamífero que la ricina, lo que llevó a considerar a la ebulina I junto con la nigrina b, como una RIP tipo 2 no tóxica.

Del rizoma del Sambucus ebulus se aislaron las **ebulinas r1 y r2**. La diferencia fundamental con la ebulina I es que estas ebulinas del rizoma son activas en su forma nativa e inhiben la síntesis de proteínas en ausencia de reductor. La ebulina r2 nativa es tan activa como la ebulina I reducida y 100 veces más activa que la ebulina r1 no reducida (Barbieri et al. 2004). Además, se ha visto que las ebulinas I, r1 y r2 desencadenan una fuerte multidepuración en el ADN y ARN que es comparable a la que provoca la ricina.

En los frutos del saúco menor se ha encontrado una isoforma de la ebulina I, la **ebulina f** (30.000 kDa cadena A y 34.000 kDa cadena B). En los frutos también se ha aislado una lectina homodimérica denominada **SELfd** (100.000 kDa). La ebulina f muestra una afinidad muy alta por la mucina y una sialo-mucina. La SELfd nativa es resistente a la acción de la pepsina en un protocolo de incubación de 60 min a 37°C (se ha visto que hasta más de 90 minutos). Por el contrario, la ebulina f comenzó a degradarse después de solo 15 minutos de incubación, y fue casi completamente hidrolizada después de 60 min. Podría ser debido a que SELfd está fuertemente glicosilada y la ebulina f no, y esta resistencia de la SELfd podría llegar a convertirla en un alérgeno. Un calentamiento corto de extractos de frutos maduros sólo redujo el contenido de fenoles totales y por tanto las actividades antioxidantes hasta en un 13,5%, pero la ebulina f quedó completamente sensibilizada a la pepsina (Jiménez et al. 2015).

Las flores del yezgo contienen otra isoforma de ebulina conocida como **ebulina blo**, junto con una lectina homodimérica llamada SELblo. Se ha visto que la ebulina blo es tóxica cuando se administra a ratones por alimentación forzada por sonda esofágica.

SEA I: esta proteína se describe como una lectina que interactúa con ácido siálico como lo hace SNA I (sambucus nigra aglutinina I). Parece tener una estructura tetramérica 2 (A-B). Se intuye que además de la acción de depuración del ARN ribosomal, también tiene un efecto sobre el ADN, como se pudo deducir en la observación en células COLO 320 en cultivo. El análisis histológico mostró que se une a las glicoproteínas y glicolípidos en la membrana plasmática y se acumula en las vesículas intracelulares. Si se marca con fluorescencia se ve que se une a las células caliciformes presentes en las vellosidades del epitelio del intestino delgado. Estas células están especializadas en la síntesis y acumulación de mucina, cuyas cadenas de oligosacáridos a menudo terminan en ácido siálico,

II.7. TOXICIDAD DE LA EBULINA

Aunque hemos hablado de la baja toxicidad de las isoformas de ebulina en comparación con la ricina, se ha estudiado la toxicidad de la ebulina f cuando se inyectó en grandes cantidades (5mg/kg de peso) via intraperitoneal (ip) en ratones jóvenes (6 semanas de edad), y éstos murieron a los 2-4 días de su administración observándose una dramática pérdida de peso. A dosis de 3.12 mg/kg via ip se ha visto que mueren todos los ratones entre el tercer día y el noveno, habiendo también una acusada pérdida de peso. Con 2.5 mg/kg solo muere un ratón a los 11 días. Hay una reducción rápida de peso en los primeros dos días, se estabiliza, desciende tras esta meseta y luego empieza a recuperar de nuevo el peso previo (Jimenez et al. 2013).

Administrando la ebulina f via oral a dosis de 5 mg/kg de peso se ve que tanto machos como hembras mueren aproximadamente en una proporción de la mitad, sin diferencias significativas entre sexos, entre los 3 y 9 días tras la administración. Se comprueba así que la ebulina f es tóxica via oral a diferencia de la nigrina b y que la ricina. Aunque la ebulina se degrade con pepsina, como dije antes, algo pasa a sangre y causa daños.

También se estudió la administración de SELfd vía ip a dosis de 5mg/kg y se vio que no provoca ningún efecto relevante en el peso del animal ni provoca ninguna muerte.

Teniendo en cuenta el extendido consumo de los frutos del saúco y los potenciales usos terapéuticos de la ebulina, nos parece fundamental conocer la toxicidad de esta proteína. Con el fin de contribuir a dicho conocimiento, nos planteamos en este trabajo la realización de un estudio experimental de la histotoxicidad de la ebulina en ratones y así valorar la viabilidad de su consumo y su posible utilización como fármaco.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado para la obtención de la ebulina para el trabajo fue a partir de los frutos verdes del *Sambucus ebulus* recolectados en la localidad de Barruelo del Valle (Valladolid), durante los meses de junio y julio. Se los tritura en un mortero formando una pasta que se diluye en tampón de extracción (NaCl 0.14M, fosfato monosódico 5mM pH 7.5). Se mezclan en un vaso de precipitados la pasta y 800 ml de tampón de extracción durante 12 horas en agitación constante a 4°C. El extracto se filtra con una doble gasa de nailon y después se somete a dos centrifugaciones obteniendo sobrenadante, se vuelve a filtrar y obtenemos lo que se conoce como extracto crudo. Este extracto se pasa por gravedad por una columna Ge-Pharmacia KX50 con camisa de refrigeración, cargada con 200 ml de AT-Sepharosa 6B. A continuación se lava la columna con tampón salino hasta que por gravedad la lectura de densidad óptica a 280 nm esté por debajo de 0.1 unidades. Después se realiza una cromatografía de exclusión molecular a través de Superdex 75.

Se utilizaron un total de 9 ratones Swiss hembras cuyo peso oscilaba entre los 40 y 45 gramos. A 6 de ellas se les administró la ebulina por vía intraperitoneal a dosis de 5mg/kg de peso en 200µl de agua destilada, mientras que a otras 3 se les inyectó SSF en igual cantidad de volumen para servir como controles. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, estabulados en condiciones estándar. A los 5 días se sacrificaron por perfusión intracardíaca, previa anestesia con una mezcla de Ketamina y Xilacina. En todo momento se siguió la normativa referida en el R.D. 53/2013 para animales utilizados en experimentación.

Se obtuvieron muestras de hígado, riñón, estómago, intestinos delgado y grueso, pulmón y corazón para su inclusión en parafina y posterior estudio histológico mediante hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson.

IV. RESULTADOS

De los órganos estudiados, las alteraciones histológicas más llamativas tuvieron lugar en los intestinos delgado y grueso (Figura 3). La mucosa gástrica, sin embargo, aparece apenas dañada, solo se ve una leve pérdida de mucocitos. En la mucosa del intestino delgado se observa que las vellosidades son más cortas y menos numerosas y las criptas de Lieberkühn aparecen notablemente atróficas (Figura 3 A y B). Las criptas del intestino delgado están llenas de células muertas y restos celulares de las paredes en los animales experimentales (Figura 3 B). En estos animales las vellosidades comienzan haciéndose edematosas y los enterocitos son reemplazados por células epiteliales aplanadas. Se observa un aumento en el número de apoptosis en el epitelio intestinal, particularmente en el compartimiento amplificador transitorio (TAC), dando primero una atrofia de las criptas que posteriormente desemboca en una disminución de la tasa de renovación y consecuentemente en la atrofia de la mucosa y desaparición de las vellosidades. La lámina propia pierde su asociación normal con el epitelio. Esto lleva a un fracaso de la barrera epitelial y da lugar a hemorragias en el intestino delgado que se observan en las autopsias de estos animales tratados (Figura 4). El intestino grueso se afecta en menor grado, conservando las criptas de Lieberkühn su citoarquitectura general y ocurriendo la pérdida celular principalmente en los enterocitos, ya que las células caliciformes parecen ser más resistentes (Figura 3 C y D). Las células dañadas aparecen principalmente en el tercio medio de la cripta, siendo menor el número de apoptosis observadas en el intestino grueso en comparación con el intestino delgado. Asimismo hemos encontrado incremento en el número de apoptosis en el hígado de animales experimentales (Figura 5).

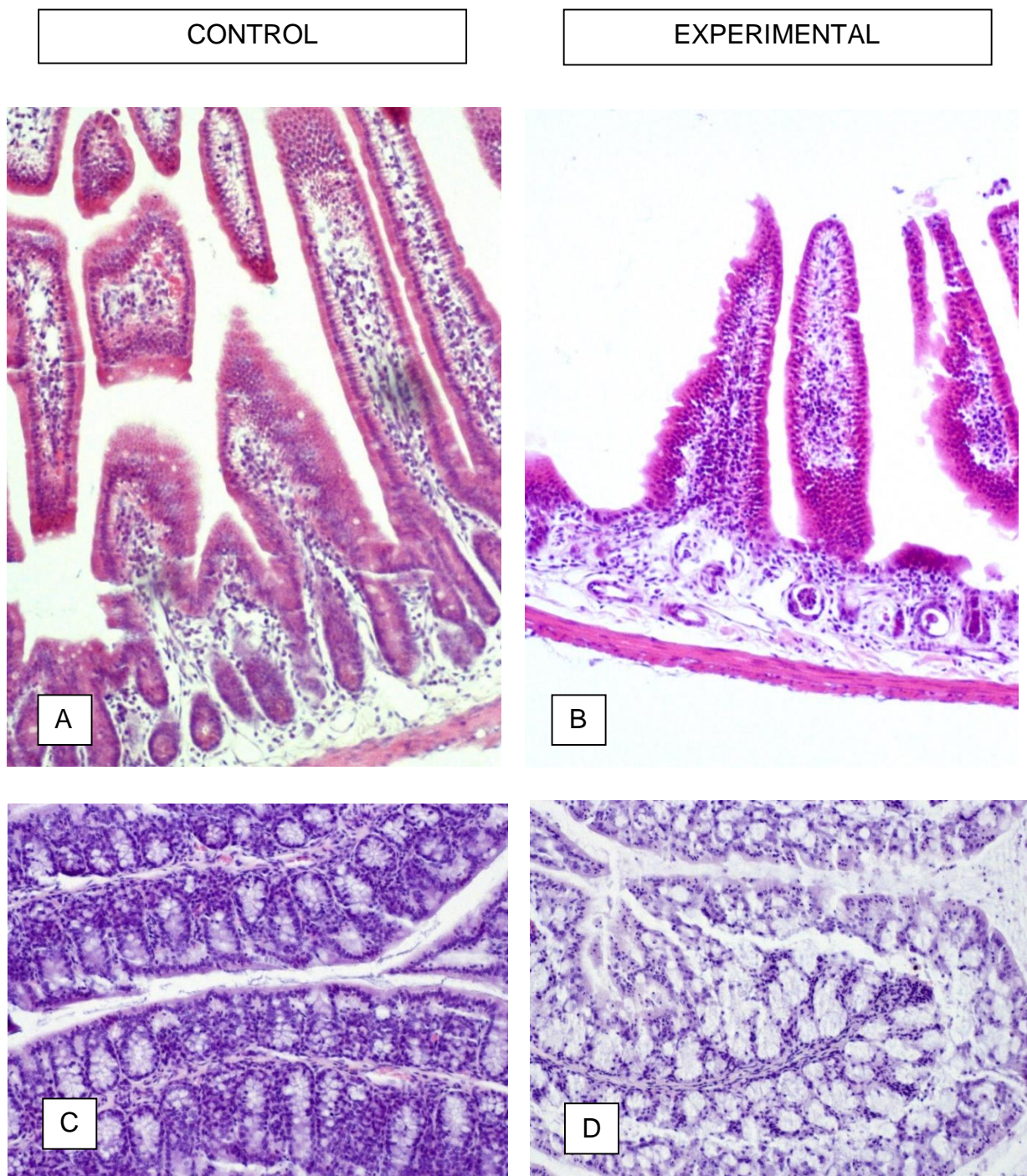


Figura 3: secciones histológicas del intestino delgado (A y B) y grueso (C y D) en las que puede observarse la atrofia de las criptas de Lieberkühn en los animales experimentales mucho más marcada en el intestino delgado. H&E. Objetivo x10.

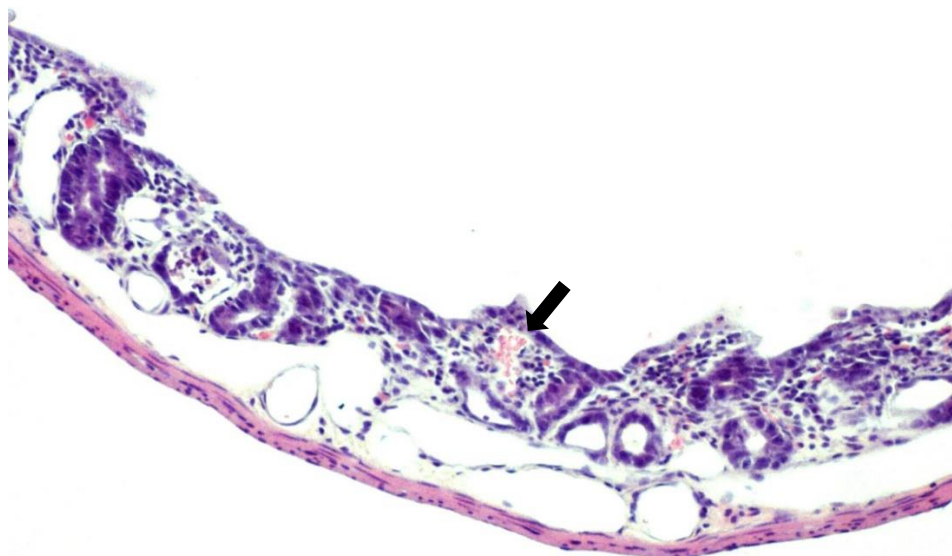


Figura 4: sección histológica del intestino delgado de un animal experimental en la que se observa desaparición de las vellosidades, franca atrofia de las criptas de Lieberkühn y pequeños focos hemorrágicos (flecha). H&E. Objetivo x10.

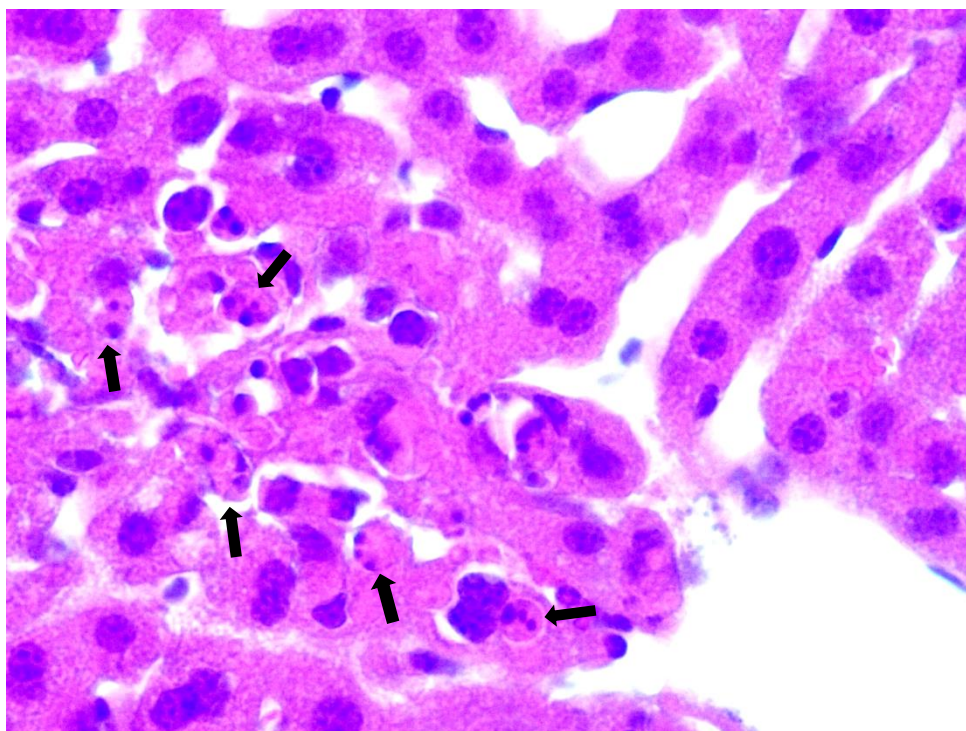


Figura 5: sección histológica del hígado de un animal experimental en el que se observan múltiples apoptosis (flechas). H&E. Objetivo x40.

Los pulmones aparecen congestivos tanto en animales controles como en experimentales (Figura 6), en tanto que solo en el caso de estos últimos animales aparecía hemorragia alveolar en algunos de ellos (Figura 7).

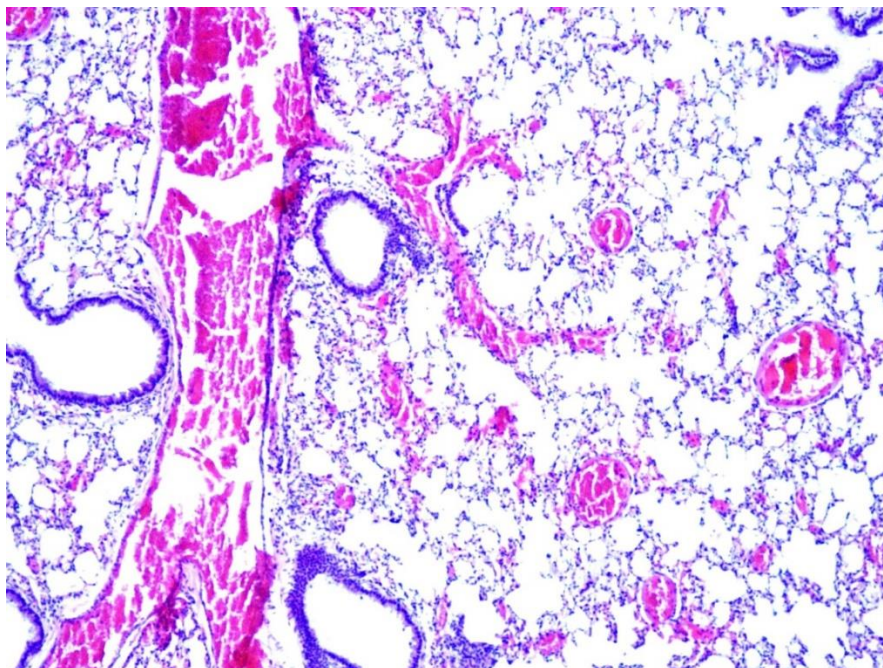


Figura 6: sección histológica de pulmón de un animal control en el que se observa dilatación de los vasos pulmonares. H&E. Objetivo x10.

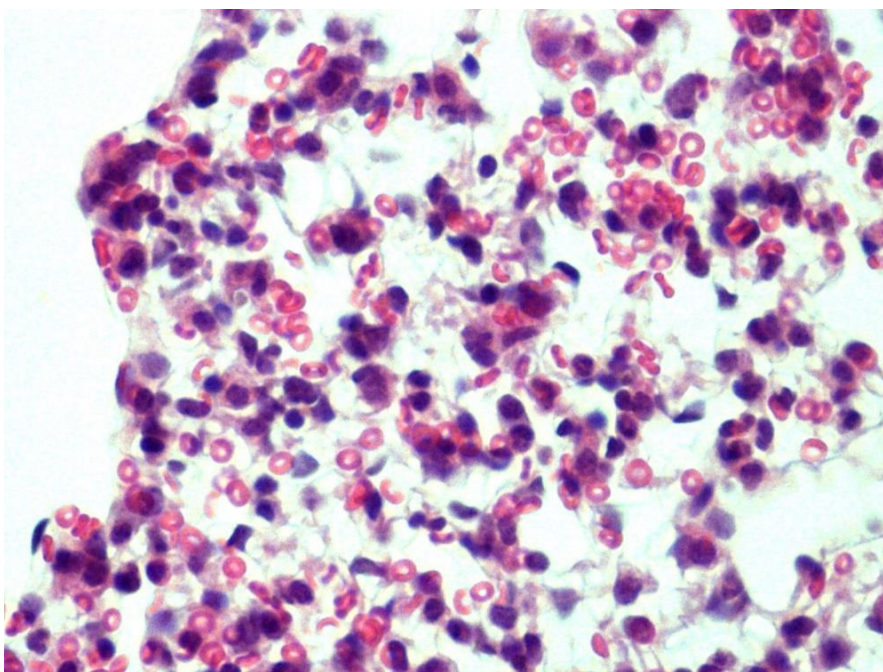


Figura 7: sección histológica de pulmón de animal experimental en el que se observa extravasación de los hematíes al intersticio pulmonar y espacio alveolar. H&E. Objetivo x40.

El músculo cardíaco muestra focos degenerativos y zonas en las que las fibras musculares aparecen poco cohesivas, con signos de debilidad y dehiscencia (Figura 8).

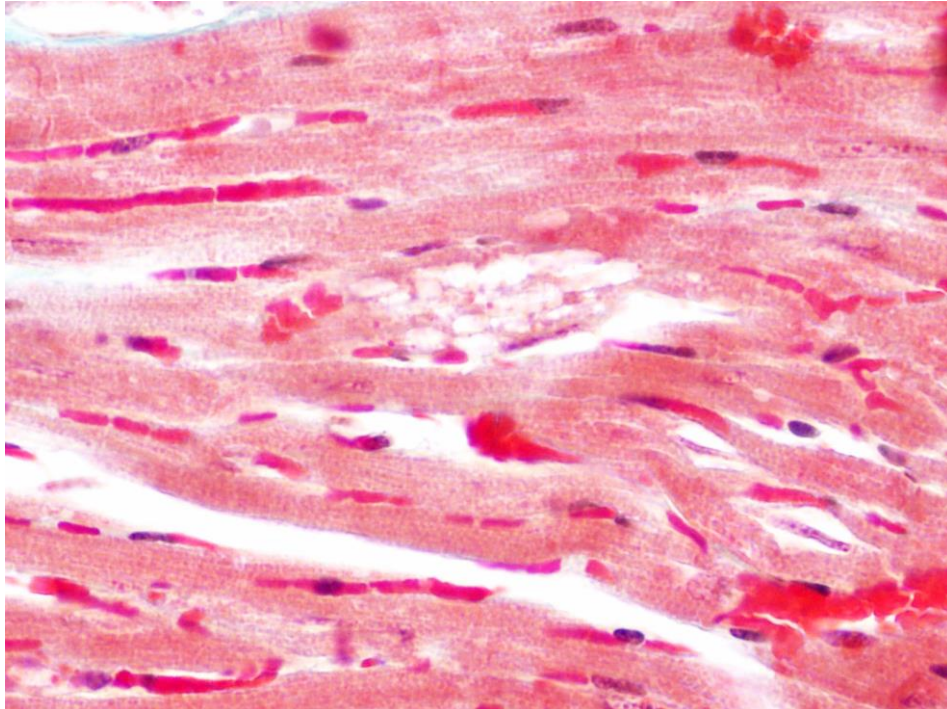


Figura 8: sección histológica del miocardio de un animal experimental en la que aparecen signos degenerativos de algunos cardiomiocitos. Tricrómico de Masson. Objetivo x20.

V. DISCUSIÓN

Debido a la toxicidad del saúco menor es probable que, desde que se comenzó a consumir en tiempos prehistóricos, se sometiera a tratamiento: hervir los extractos acuosos de la planta a un nivel seguro para inactivar la proteína, y hacerla sensible a la degradación por la pepsina ácida. Así los antiguos se dieron cuenta que podían consumir esta planta sin que se produjeran efectos tóxicos.

En el estudio de Garrosa et al. (2015), se describe en los pulmones de los ratones viejos el desarrollo de focos neumónicos; sin embargo, en nuestro estudio realizado en animales adultos no hemos hallado otras alteraciones en los

pulmones además de congestión y algunos focos de hemorragia. Esto se puede explicar debido a que a mayor edad hay menos resistencia de los pulmones contra las agresiones. La dosis más baja utilizada en ese estudio (1,4 mg / kg) no causó daño a los intestinos, pero causó daño considerable a los pulmones.

Sin embargo, con respecto a los intestinos, no encontramos en nuestro estudio, diferencias significativas con relación a los hallazgos descritos por Garrosa et al. (2015) en animales viejos; en cuyo estudio tampoco observaban diferencias en los cambios histológicos causados por la ebulina cuando comparaban a los ratones de 6 con los de 12 meses de edad. No obstante, sí se ha visto que hay más apoptosis en los ratones mayores, lo que puede ser debido a la mayor toxicidad de esta sustancia en ratones viejos o simplemente al mayor número de apoptosis que observamos debido a que éste aumenta con el envejecimiento. Esto puede resultar en una mayor toxicidad de esta sustancia lo que puede llevar a la ruptura de la mucosa intestinal.

Otro tema destacado en el trabajo de Garrosa et al. (2015) es la aparición de núcleos atípicos que muestran displasia en el parénquima pulmonar después de la administración de ebulina f. En nuestro estudio en animales jóvenes no hemos visto estas displasias, pudiéndose explicar estas diferencias por el mayor grado de mutagenicidad presente en edades avanzadas. En su estudio Garrosa et al. (2015) no vieron cambios proliferativos, pero la presencia de estos núcleos atípicos puede hacer sospechar un posible efecto mutagénico de esta RIP. De todos es sabido que muchos fármacos que se usan como tratamiento contra el cáncer, a corto y sobre todo a largo plazo, pueden ser inductores de nuevas neoplasias, debido a la agresividad de estas sustancias y su capacidad de alterar el normal funcionamiento de las células no tumorales. Este hallazgo debe ser observado muy de cerca y ser estudiado por la posible grave repercusión.

En otros estudios se ha realizado la administración de ebulina f por vía oral (Tejero et al. 2015) procediendo al análisis histológico a las 24 y 48 horas. En el estómago se observó cierto deterioro, pero que no aparecía a las 48 horas. El intestino delgado y grueso aparecen menos dañados en comparación con la administración vía ip; esto quizás se deba a que la ebulina f ha sido en gran parte degradada por la pepsina en el estómago. Sí se vio afectado el corazón, y en mayor medida que

por vía ip, observándose desgarros, lo que podría provocar fallo en el aparato circulatorio y explicarse así también el gran daño que vemos en los pulmones, más acusado que cuando se administra por vía ip. En los pulmones se encontró una gran congestión venosa que también podría ser explicado por la regurgitación parcial de algunos animales que fallecían en las primeras 24-48 horas.

Nuestro estudio demuestra, como también puede comprobarse en estudios previos en la literatura, que la ebulina puede ser realmente dañina para el organismo y no una RIP no tóxica. Ello trae consigo un corolario interesante, como es el poder provocar daño en las células tumorales tratando de respetar las células normales empleando una menor dosis. Una idea teórica podría ser la de inhibir los lisosomas de forma selectiva en las células tumorales. Ya hemos visto la ruta intracelular que sigue la ebulina siendo ésta degradada en su mayor parte en los lisosomas, de ahí su menor toxicidad, de manera que si conseguimos inutilizar los lisosomas únicamente en las células tumorales, éstas serían más sensibles a la acción de la RIP, necesitándose menos dosis. La cloroquina, un conocido antipalúdico, altera el pH de los lisosomas, con lo que las enzimas del interior no pueden actuar, inactivando su acción. Podríamos, además, combinar la ebulina con un anticuerpo y dirigirla selectivamente a las células del tumor, aumentando así la toxicidad de la ebulina en ellas.

Otro potencial uso de la ebulina, como ya comenté anteriormente, sería combinarla con nanopartículas que sean capaces de penetrar en el SNC, abriendo nuevos horizontes para el tratamiento de enfermedades que aquejan al neuroeje.

Igual que pasa con otras RIPs, se piensa que dentro de la célula la ebulina actúa también mediante otros mecanismos, ya que la concentración necesaria para inhibir la traducción es mayor que la necesaria para afectar la viabilidad celular.

Hasta ahora he hablado de las RIPs y de la ebulina en concreto como posible terapia contra el cáncer debido a que inhibe la síntesis de proteínas de manera irreversible provocando la muerte celular, pero sus múltiples acciones y efectos pueden hacer de ella un fármaco para otras patologías. Se ha visto que algunas RIP tienen actividad antiviral contra virus animales y vegetales, pudiendo tener un papel muy importante en la terapia contra el SIDA. Se ha postulado que algunas RIP tipo 1 como tricotsantina, TAP 29, MAP 30 serían moléculas que actuarían

directamente contra el VIH tipo I provocando su inactivación o destrucción. Aunque en otros estudios parece que el efecto directo de las RIP sobre los virus no es algo factible y el mecanismo de acción sería más indirecto. Estas proteínas aparecerían en las células infectadas inactivando los ribosomas, provocando la muerte celular y previniendo así la propagación viral. Sería interesante poder usarlas en fases precoces de la enfermedad cuando aún no hay muchas células infectadas y mediante la combinación con anticuerpos dirigirlas a células diana y destruirlas y con ellas el virus. La tricostantina ya ha sido usada en ensayos clínicos para la terapia contra el SIDA (Lee-Huang et al. 1991).

VI. CONCLUSIONES

1. La ebulina administrada intraperitonealmente produce en ratones:

- a) Atrofia de las criptas de Lieberkühn y desaparición de las vellosidades en el intestino delgado.
- b) Atrofia de las criptas en el intestino grueso, aunque en menor grado.
- c) Congestión y hemorragias pulmonares.
- d) Degeneración de algunas fibras musculares cardíacas.

2. La mencionada toxicidad de la ebulina debe tenerse presente cuando se consuman frutos del saúco y, por su parte, el conveniente empleo de la dosis adecuada de ebulina podría tener aplicabilidad en la terapia del cáncer intestinal, así como en otros tumores, especialmente en forma de inmunotoxina.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Barbieri L, Ciani M, Girbés T, Wang-yi Liu, Van Damme JM, Peumans WJ, Stirpe F (2004) **Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins.** FEBS Lett.; 563(1-3):219-22

Di Maro A, Pizzo E (2016) **A new age for biomedical applications of Ribosome Inactivating Proteins (RIPs): from bioconjugate to nanoconstructs.** J Biomed Sci.23(1):54

Garrosa M, Jiménez P, Tejero J, Cabrero P, Cordoba-Diaz D, Quinto E, Gayoso M, Girbés T (2015) **Toxicity of the Anti-ribosomal Lectin Ebulin f in Lungs and Intestines in Elderly Mice** Toxins (Basel). Feb; 7(2): 367–379

Girbés T, Cítores L, Iglesias R, Ferreras JM, Muñoz R, Rojo MA, Arias FJ, Garcia JR, Méndez E, Calonge M (1993) **Ebulin I, a Nontoxic Novel Type 2 Ribosomeinactivating Protein from Sambucus ebulus L. Leaves.** J Biol Chem.; 268(24):18195-9.

Jiménez P, Gayoso M, Tejero J, Cabrero P, Córdoba-Díaz D, Basterrechea JE, Girbés T (2013) **Toxicity in mice of lectin ebulin f present in dwarf Elderberry (Sambucus ebulus L.).** Toxicon.; 61:26-9

Jiménez P, Tejero J, Cordoba-Diaz D, J. Quinto E, Garrosa M, Gayoso M, Girbés T (2015) **Ebulin from Dwarf Elder (Sambucus ebulus L.): A Mini-Review.** Toxins (Basel). Mar; 7(3): 648– 658.

Jiménez P, Cabrero P, Cordoba-Diaz D, Cordoba-Diaz M, Garrosa M, Girbés T (2017) **Lectin Digestibility and Stability of Elderberry Antioxidants to Heat Treatment In Vitro.** Molecules.; 22(1).

Lee-Huang S, Huang PL, Kung HF, Li BQ, Huang PL, Huang P, Huang HI, Chen HC (1991) **TAP 29: an anti-human immunodeficiency virus protein from Trichosanthes kirilowii that is nontoxic to intact cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. (15):6570-4.

Pascal JM, Day PJ, Monzingo AF, Ernst SR, Robertus JD, Iglesias R, Pérez Y, Ferreras JM, Cítores L, Girbés T. (2001) **A crystal structure of a nontoxic type II ribosome inactivating protein, ebulin I.** Proteins 43:319-326

Porter RS, Bode RF (2017) **A Review of the Antiviral Properties of Black Elder *Sambucus nigra* L Products.** *Phytother Res.* 31(4):533-554.

Santana SS, Gennari-Cardoso MT, Carvalho FC, Roque-Barreira MC, Santiago A, Alvim FC, Pirovani CP (2014) **Eutirucallin, a RIP-2 Type Lectin from the Latex of *Euphorbia tirucalli* L. Presents Proinflammatory Properties.** *PLoS One.* 9(2): e88422

Steeves, R.m., Denton, M.E., Brnard, F.C., Henry, A. Lambert, J.M. (1999) **Identification of three oligosaccharide-binding sites in ricin.** *Biochemistry,* 38:116777-11685

Stirpe F, Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Bolognesi A, Polito L (1996) **Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves.** *FEBS Lett.* 1996 Mar 18; 382(3):309-12

Tejero J, Jiménez P, Quinto Damián E, Garrosa M, Cordoba-Diaz M, Gayoso M, Girbés T (2015) **Elderberries: A Source of Ribosome-Inactivating Proteins with Lectin Activity.** *Molecules* 20(2), 2364-2387.