

**INSTITUTO DE ESPAÑA**

**REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**

**LECTINAS: HERRAMIENTAS PARA  
EL TERCER CÓDIGO BIOLÓGICO**

**DISCURSO DEL  
EXCMO. SR. D. TOMÁS GIRBÉS JUAN**

**LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 29 DE ABRIL DE 2021  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO**

**Y CONTESTACIÓN DEL  
EXCMO. SR. D. FIDEL ORTEGA ORTIZ DE APODACA**



**MADRID, 2021**



INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

# **LECTINAS: HERRAMIENTAS PARA EL TERCER CÓDIGO BIOLÓGICO**

DISCURSO DEL  
**EXCMO. SR. D. TOMÁS GIRBÉS JUAN**

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 29 DE ABRIL DE 2021  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DEL  
**EXCMO. SR. D. FIDEL ORTEGA ORTIZ DE APODACA**



Madrid, 2021

© De los textos, sus autores

Edita: Real Academia Nacional de Farmacia

ISBN: 978-84-122587-4-5

Depósito legal: M-14225-2021

INDICE	Páginas
AGRADECIMIENTOS	4
MI RELACIÓN CON FARMACIA	8
RECUERDO BIOGRÁFICO DEL EXCMO. SR. D. MANUEL ORTEGA MATA	11
JUSTIFICACIÓN DEL TEMA ELEGIDO.	14
FLUJOS DE INFORMACIÓN Y ALFABETOS QUÍMICOS	16
El código genético.	16
El código de azúcares y la glicómica	19
Breve resumen histórico de hitos relevantes en la investigación sobre las lectinas.	22
DISTRIBUCIÓN Y TIPOS DE LECTINAS	25
LECTINAS DE MICROORGANISMOS	27
LECTINAS ANIMALES	29
Las lectinas como moléculas de reconocimiento celular	31
Galectinas	33
Siglecs	37
Lectinas de organismos marinos	40
LECTINAS VEGETALES	42
RILs (“ribosome-inactivating lectins”)	45
Blanco de la acción inhibidora de las lectinas antirribosómicas	46
Actividad enzimática	47
Ricina	49
Lectinas antirribosómicas del género <i>Sambucus</i>	51
Ebulina I	52
Nigrina b	54
SNA I	56
Estructura tridimensional de ebulina I y análisis comparado con ricina.	56
Aspectos moleculares de la internalización y del tráfico intracelular de ricina	60
Comparación del tránsito intracelular de ricina y ebulina.	62
EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS LECTINAS.	64
Actividad apoptótica	64
Actividad antimicrobiana	64
APLICACIONES DE LAS LECTINAS	65
Aplicaciones en agricultura	65
Implicaciones de las lectinas en estrés abiótico y desarrollo.	65
Lectinas en la respuesta al estrés biótico.	65
APLICACIONES DE LAS LECTINAS COMO HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA GLICOBIOLOGÍA	67
Histoquímica	67

Matrices analíticas con lectinas para el estudio de glicoconjugados (“arrays” de lectinas)	68
Biosensores	69
Cromatografía de afinidad	69
Detección de proteínas en electroforesis en geles de poliacrilamida de glicoproteínas	70
APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS LECTINAS	70
Inmunotoxinas: los proyectiles mágicos de Ehrlich.	71
Inmunotoxinas convencionales con lectinas antirribosómicas de los saúcos	73
Inmunotoxinas recombinantes	74
Inmunotoxinas y conjugados con ebulina y nigrina	75
Nigrina b-mAb 44G4 y ebulina l-mAb 44G4	76
Nigrina b-mAb MJ7 in vivo	78
recNigrina b cadena A-anti-MTX3 (OMTX503)	79
APLICACIONES DE LAS LECTINAS EN LA NANOFARMACIA.	82
CONSIDERACIONES FINALES	84
REFERENCIAS	101
CONTESTACIÓN DEL EXCMO. SR. DON FIDEL ORTEGA ORTIZ DE APODACA	102
TRAYECTORIA VITAL	104
ACTIVIDAD DOCENTE Y PROFESIONAL	105
ACTIVIDAD INVESTIGADORA	107
EXPERIENCIA EN GESTIÓN	108
COMENTARIOS AL DISCURSO DE INGRESO	109
CONSIDERACIONES FINALES	

# AGRADECIMIENTOS

*Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia*

*Excelentísimas e Ilustrísimas Señoras Académicas*

*Excelentísimos e Ilustrísimos Señores Académicos*

*Señoras y señores:*

Es para mí un grandísimo honor ser admitido en la Real Academia Nacional de Farmacia y poder dirigirme hoy a ustedes en el discurso de ingreso. Por eso en primer lugar quiero expresar públicamente mi profundo agradecimiento al brindarme la posibilidad de pertenecer a esta institución de excelencia como Académico de Número lo que exige un alto nivel de compromiso con lo que es y significa la Real Academia y sus distinguidos miembros. Quiero hacerme acreedor a la alta distinción que se me otorga con mi participación y contribución en las tareas que la institución tenga a bien encargarme, con mi experiencia y con la dedicación de que sea capaz para los fines de la Academia.

Me gustaría también que mis primeras palabras en este acto tan solemne de toma de posesión sean de un agradecimiento particular a los miembros de la Academia, que con su generosidad me han aceptado en la institución y en especial a los excelentísimos señores D. Angel María Villar del Fresno, D. Sebastián Cerdán García-Esteller y D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca que han tenido la generosidad de avalar mi solicitud para acceder a la Academia como miembro de número. Se lo agradezco profundamente.

Permítanme unos breves comentarios biográficos. Mi vida de adolescente estuvo marcada por mi incorporación al mundo del trabajo al cumplir los catorce años de la mano de mi padre, y en el poco tiempo que me quedaba, por la lectura de biografías de grandes científicos y ello indudablemente orientó mi elección a las ciencias como carrera profesional. En mi casa no había tradición académica pues mis padres no tenían estudios por lo que no podían aconsejarme. Yo fui el primero de mi familia con estudios superiores. No obstante, mi madre me empujaba hacia la Medicina, y lo que tiene la juventud, elegí la Química, especialidad Bioquímica y después de muchos años la Farmacia.

Mi vida profesional ha estado muy influida por muchos traslados a distintas residencias, oposiciones y un arrancar continuo tanto en la docencia como en la investigación. He montado desde cero tres laboratorios de investigación en distintas facultades. Podría decirse que he sido un valenciano errante, aunque de valenciano solo tengo los primeros doce años de mi vida. La mitad de ella la he pasado en Valladolid y como se suele decir “*se es de donde se paca*”. Cuando obtuve la recién creada cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, allá por 1986, pensaba que era para unos pocos años antes de dar el salto a Madrid, donde residían mi familia y la de mi esposa. En 2007 cambié de área de conocimiento al área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina y siempre he tenido la esperanza de que algún día podría incorporarme a alguna de las universidades madrileñas.

Durante todo este tiempo he contado en mi trabajo con la inestimable ayuda de mi esposa Pilar, así como de discípulos, colegas de otras disciplinas químicas y físicas, y amigos sin cuyo trato enriquecedor muchas veces hubiese renunciado a la dura labor que supone la dedicación simultánea a la docencia y a la investigación, como ustedes saben muy bien, y más en universidades de provincias. Cuando me incorporé a la Universidad de Valladolid, en relación con temas biológicos, solo estaban la Facultad de Medicina y la Escuela de Enfermería.

Quiero rendir reconocimiento hoy aquí al Dr. David Vázquez Martínez, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), desaparecido prematuramente en 1986 por una grave enfermedad, quien me orientó hacia el estudio de la biosíntesis de proteínas, tema este que ha ocupado prácticamente toda mi vida científica, de una u otra forma, y agradecerle la oportunidad única e inestimable que me brindó allá por 1973 de entrar en su laboratorio del Instituto de Bioquímica de Macromoléculas del Centro de Biología Celular perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Agradezco también al Dr. Juan Modolell Mainóu, por entonces Investigador Científico del CSIC, su acogimiento y su dirección en mi etapa predoctoral. Destaco en él sus conocimientos, su generosidad en las explicaciones para conmigo y su rigor científico, así como su ejemplo de dedicación absoluta a la investigación, a pesar de que podría haber destacado también en cualquier otra actividad. Biólogo y después químico sabe conjugar de manera magistral todos los aspectos de la Biología. A

pesar de que su magisterio fue corto, fue muy intenso y fructífero y me ha influido muy positivamente en mi actividad científica.

Mi agradecimiento se extiende también al Prof. D. Roberto Parrilla Sánchez, ya fallecido, Catedrático de Fisiología y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, quien me dio la oportunidad de incorporarme a la Universidad Autónoma de Madrid en 1979, al volver del servicio militar. Roberto Parrilla era en ese momento Profesor Agregado en la Cátedra de D. Alberto Sols en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. El Profesor Parrilla me ofreció una plaza de Ayudante de Biofísica que precisamente quedaba vacante en ese momento, y que acababa de dejar un ilustre compañero Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, D. Sebastián Cerdán García-Esteller, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas con el que tengo una enorme deuda de gratitud ya que cuando en 1983 me incorporé al Departamento de Patología del Hospital Universitario Hahnemann de Filadelfia en E.E.U.U., al llegar, él y su esposa Paloma nos acogieron generosamente a mi esposa y a mi en su casa unos días.

El trato con Roberto Parrilla, ya en la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura, me facilitó adquirir una visión de conjunto de los procesos fisiológicos de los seres vivos. En cuanto a la vida académica aprendí mucho de él, de su visión inteligente de todos los problemas académicos que abordaba. Con él estuve solo tres años, pero fueron también muy intensos, y por todo ello le estoy también muy agradecido.

Desafortunadamente estuve poco tiempo con estos maestros, pero su huella en mi actividad profesional ha sido indeleble porque marcó el estándar que tenía que seguir. Desde 1983 he caminado solo por distintas disciplinas, facultades y universidades, y hoy cumpla uno de mis sueños al entrar en la Academia como Académico de Número por el grupo de Doctores en Farmacia y nada menos que sucediendo en la medalla número 5 al Profesor D. Manuel Ortega Mata.

# MI RELACIÓN CON FARMACIA

Conocí al Prof. D. Vicente Vilas en 1979 en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, al volver del servicio militar. D. Vicente era amigo de mi suegro y ello le llevó a ayudarme a buscar un sitio donde ubicarme en aquellos momentos, lo que siempre le agradecí.

Mi contacto con el Profesor D. Manuel Ruiz Amil se remonta a 1984 cuando era vocal del tribunal que juzgó la plaza de Profesor Agregado de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, oposición a la que me presenté y no saqué. Pero aquello inició una muy buena amistad que me llevó a partir de 1986, ya como Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, a proponerle como Presidente de varios tribunales de Tesis Doctorales elaboradas por mi grupo de investigación. He de decir que todos los doctorandos alabaron su actuación y bonhomía. Con él establecí una profunda amistad y siempre que iba a Madrid buscaba un momento para ir a saludarle al despacho en el Departamento de Bioquímica de la Facultad, y hablar con él de la vida universitaria e investigadora. Con él recuperaba muchas veces la ilusión y la fuerza para poder continuar.

En 1999 D. Manuel, junto a los Profesores D. Juan Tamargo Menéndez y D. Antonio Portolés Alonso, tuvo la gentileza de presentar mi candidatura a Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y en noviembre leí mi discurso de entrada en la institución, que versó sobre la lectinas del saúco. Mi profundo agradecimiento también para ellos.

Desde entonces, como lluvia fina, D. Manuel me aconsejaba que terminase los estudios de Farmacia que inicié en 1974 y que dejé por la vorágine de la Tesis Doctoral y el servicio militar después. En 2001, siguiendo su sabio consejo y a pesar de tener ya 50 años y mucho trabajo en la universidad y en el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad, me matriculé en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y en 2006 obtuve el ansiado título de Licenciado en Farmacia. Quiero manifestar aquí mi profundo agradecimiento a todos los profesores que he tenido la suerte de conocer en la Facultad por su generosa ayuda, facilidades y ánimo en todo momento.

En esta etapa de nuevo estudiante coincidí con profesores que después han sido y son amigos como el Profesor D. Angel Villar del Fresno, maestro conocedor de los secretos de la química de las plantas y con el que compartí, junto con profesoras de su Departamento como Pilar-Gómez Serranillos y Emilia Carretero un inolvidable congreso de la Sociedad de Farmacia del Mediterráneo Latino en 2002 en Tours. Cuando estaba en Madrid, siempre que podía me acercaba a visitarle para hablar de nuestras cosas universitarias.

Con el profesor D. Manuel Córdoba Borrego establecí una muy buena amistad. Del Profesor Córdoba quiero resaltar sus conocimientos, su amplia experiencia y sus valiosísimos consejos. Esta amistad se amplió después a sus hijos Manuel y Damián, con los que he colaborado y colaboro en diversos trabajos de investigación, y a la profesora María de Cortes Sánchez Mata y a D. Daniel Sánchez Mata recientemente elegido como Académico de Número de esta Real Academia.

Establecí también una buena relación con el Profesor Rafael Lozano y la Profesora Irene Iglesias, ambos Decanos de la Facultad de Farmacia. El Profesor Lozano fue luego Presidente de mi tribunal de Tesis Doctoral en 2009. Coincidí también con las Profesoras Esperanza Torija y Carmen Diez del área de Nutrición y Bromatología, que me influyeron notablemente en mi cambio de área desde Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias al área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, que en aquel momento tenía un fuerte déficit de profesores. Conocí también al Profesor Antonio Ramón Martínez y a las profesoras Rosa Basante, Carmen Francés y Carmen Avendaño que siempre me trataron con gran afabilidad y consideración.

Conocí a la Presidenta de la Academia la Profesora Maria Teresa Miras y a los presidentes Profesores Mariano Esteban y Antonio Doadrío. Ya en la Academia conocí al Profesor D. Fidel Ortega que ha tenido la gentileza de avalar mi solicitud y de dar el discurso de contestación de la Real Academia Nacional de Farmacia. Pero no quiero olvidarme de ninguna persona con la que he tenido la ocasión de relacionarme, por lo que reitero mi profundo respeto y agradecimiento a todos.

En la Academia he tenido el honor de conocer a muchos ilustres compañeros y compañeras que, a la par de grandes personalidades científicas e intelectuales, han ejercido un importante magisterio y con los que me hubiese gustado compartir sus importantes experiencias investigadoras.



# **RECUERDO BIOGRÁFICO DEL EXCMO. SR. D. MANUEL ORTEGA MATA**

Vengo a ocupar la medalla número cinco que ocuparon antes los Doctores Salvador Serra Abril en 1932, el Doctor Antonio Bartolomé Pizarroso Villarejo en 1964 y finalmente el Doctor D. Manuel Ortega Mata en 1977. Como es preceptivo voy a realizar una breve glosa de la vida y la extraordinaria dedicación a la docencia e investigación farmacéutica del Profesor Manuel Ortega Mata, hombre de bien y cuya vida ejemplar es digna de resaltar.

Le conocí poco, pero aprecié enseguida su prestigio e importancia en esta Academia. Tuve la ocasión de leer, por curiosidad, su discurso de entrada como Académico de Número y me interesó extraordinariamente por cuanto al hablar de las fitohemaglutininas defendía la importancia de la búsqueda sistemática de actividades en gran número de plantas. Este fue un consejo que me brindó el Profesor Fiorenzo Stirpe, del Departamento de Patología Experimental de la Universidad de Bolonia, allá por 1989 y que yo he intentado inculcar en mis colaboradores de la Universidad de Valladolid.

D. Manuel Ortega Mata nace en Málaga en 1923 en una familia de cinco hijos y cuyo padre falleció prematuramente siendo él todavía un niño. En 1953 se instaló en Madrid. Fue un estudiante extraordinario que cursó la Licenciatura de Farmacia y por sus calificaciones obtuvo el Víctor de Plata al mejor expediente de 1945. Se financió sus estudios compaginándolos con trabajo como profesor impartiendo clases particulares, lo cual dice mucho de su naturaleza. Se inicia en la investigación con una beca de la Fundación “Conde de Cartagena de Indias” de la Real Academia de Medicina en 1945. Entre 1946 y 1953 fue becario de varios institutos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, como el Instituto Alonso Barba, el Instituto Antonio de Gregorio Rocasolano y el Instituto Ramón y Cajal.

Disfrutó de tres becas de estancia en el extranjero, una para la Universidad de Upsala para los años 1951 y 1952, y otra para el Centro de Transfusión Sanguínea y Desecación de Plasma en París en 1955. En Upsala tuvo el enorme privilegio de trabajar con dos Premios Nobel de Química, Theodor Svedberg y Arne Tiselius. Svedberg dio nombre a la unidad de sedimentación en ultracentrifugación y Tiselius fue el introductor de la electroforesis como herramienta analítica.

El Prof. Ortega no podía tener mejores introductores en la investigación, ya que en su vuelta a España incluso introdujo innovaciones notables en la técnica electroforética como el uso de nigrosina en la tinción de proteínas lo que le permitió publicar 1957 en la revista *Nature*, extraordinario mérito y mucho más por aquel entonces y sobre todo desde España.

El Profesor Ortega poseía una visión multidisciplinar del contexto farmacéutico, desde el ejercicio de la profesión en oficina de farmacia hasta la docencia universitaria pasando por la industria farmacéutica. Su actividad fue extraordinaria, ya que fue funcionario por oposición de tres ministerios, el de Educación y Ciencia en la Universidad, el de Gobernación en el Instituto Español de Hematología y Hemoterapia y el de Justicia en el Instituto Nacional de Toxicología. Ya en 1968 obtuvo la plaza de Profesor Agregado en la Universidad Complutense de Madrid.

Su vida universitaria transcurrió entre la Universidad Complutense y la Universidad de Alcalá. Fue Catedrático de Técnicas Instrumentales en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá y Decano de la misma.

El Profesor Ortega fue un profesor ejemplar dedicado completamente a su actividad docente, investigadora y de gestión y a su familia. Su huella en ambas universidades, reconocida con numerosas distinciones, es indeleble. Como profesor hay que resaltar su actividad en la dirección de trabajos de investigación, tanto Tesis Doctorales como de Licenciatura como en publicaciones científicas de reconocido prestigio. Discípulos suyos son prestigiosos miembros de esta institución como el Profesor D. Vicente Vilas Sánchez y D. Benito del Castillo García, ambos Decanos de las Facultades de Farmacia de Alcalá de Henares y Complutense de Madrid.

Recibió muchos reconocimientos entre los que cabe destacar el Premio Extraordinario en la Licenciatura y Doctorado, la Medalla de Plata de la Facultad de Farmacia, la Medalla de Oro del Colegio de Farmacéuticos de Madrid, la Medalla de Plata del Consejo General de Colegios Farmacéuticos de España y la Medalla de Oro de la Universidad de Alcalá. Fue Académico Correspondiente de la Academia Peruana de Farmacia y Académico Correspondiente de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile. Entre los reconocimientos que recibió debemos resaltar la Medalla Carracido de Oro, máxima distinción que otorga la Real Academia Nacional de Farmacia a Académicos y Científicos de gran prestigio.

D. Manuel ingresó en la Academia el 24 de marzo de 1977 con un discurso de ingreso titulado “Aspectos biológicos de las fitohemaglutininas”. Su actividad investigadora en relación con el tema que nos ocupa es

significativa. Publicó diversos estudios de “*screening*” de plantas en busca de actividad fitohemaglutinina. En este sentido publicó con Fernández Galiano y Dolara un amplio estudio con 375 especies españolas en el que describió actividad fitohemaglutinina en 197 de ellas, destacando entre otras, tres especies de *Phlomis*, *P. purpurea*, *P. herba-venti* y *P. crinita*. Encontró también actividad en *Myrtus communis* y *Sambucus ebulus*. Quiero resaltar aquí que de *S. ebulus* mi grupo ha aislado numerosas proteínas nuevas pertenecientes a las categorías de homolectinas y proteínas inactivadoras de ribosomas. Aquí se hace realidad un pensamiento del genial compositor Bela Bartok: “*Todo lo nuevo y significativo debe basarse en las antiguas raíces, aquellas raíces auténticamente fecundas que deben escogerse con gran esmero de entre las que se limitan a sobrevivir*”.

## JUSTIFICACIÓN DEL TEMA ELEGIDO.

El magnífico discurso del Profesor D. Manuel Ortega Mata en su toma de posesión se tituló “*Aspectos biológicos de las fitohemaglutininas*” y abordó los aspectos fundamentales que en ese momento se poseía de estas proteínas vegetales conocidas con mayor amplitud como lectinas. Su disertación actualizó los conocimientos sobre su aislamiento y caracterización, los aspectos botánicos, su interacción con los glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y células tumorales. Resaltó también los aspectos microbiológicos y parasitológicos que derivan de la especificidad de la interacción de estas proteínas con bacterias, micoplasmas y virus. Después consideró las interacciones de las lectinas vegetales con células animales y finalmente comentó sobre las posibilidades de las lectinas en la terapéutica y la profilaxis.

Desde entonces este campo científico se ha desarrollado exponencialmente y cobrado un interés extraordinario habida cuenta de que hoy en día se considera a las lectinas como herramientas fundamentales en el flujo de información entre las células mediada por el denominado “código de azúcares”, que constituye el código para poder investigar gran número de mecanismos de transducción de señales informativas entre células y tejidos en lo que se ha dado en llamar “glicómica funcional”. Además, las lectinas están profundamente implicadas también en la agricultura, la medicina y la analítica.

Al considerar el tema de mi discurso de toma de posesión y en base a mi experiencia de los último treinta años, decidí seguir la senda marcada por el Profesor Ortega y desarrollar el tema de las lectinas con el título “*Lectinas: herramientas para el tercer código biológico*”. Coincido con él que en este tema es muy farmacéutico por lo que tiene de punto de convergencia de diversas disciplinas farmacéuticas, desde la botánica que marcó su nacimiento hasta la biología molecular pasando por la bioquímica, la fisiología, la microbiología, la parasitología, la farmacología, la tecnología farmacéutica y la analítica, entre otras.

Para enmarcar el tema elegido en mi actividad investigadora he de decir que mi experiencia en este campo arranca, al incorporarme al laboratorio del Doctor D. David Vázquez bajo la dirección del Doctor D. Juan Modolell en el Instituto de Bioquímica de Macromoléculas del Centro de Biología Celular C.S.I.C., con mis primeros trabajos en la biosíntesis de proteínas, en particular sobre el papel de la hidrólisis de GTP en la

elongación de las cadenas polipeptídicas (Girbes y cols., 1976) y la interacción del factor de elongación G con el ribosoma de *Escherichia coli* (Girbes y cols., 1977a), así como sobre el mecanismo de acción de distintos antibióticos sobre los ribosomas entre los que cabe destacar la estreptomicina, el ácido fusídico, la neomicina y la paromomicina, entre otros (Girbes y cols., 1977b).

Tuve entonces la ocasión de tomar contacto por primera vez con las fitohemaglutininas, en concreto con dos fitohemaglutininas clásicas extremadamente tóxicas, la ricina de *Ricinus communis* L. y la abrina de *Abrus precatorius* L., de las que, allá por 1972, se descubrió su capacidad inhibidora de la biosíntesis de proteínas en los ribosomas eucarióticos por Olsnes y Phil (Olsnes y Phil, 1972). Estos autores demostraron que las dos proteínas inhibían la biosíntesis de proteínas en extractos acelulares de lisados de reticulocitos de conejo dejando intacta la estructura de los polisomas o poliribosomas, por lo que concluyeron que actuaban sobre la elongación de las cadenas polipeptídicas (Olsnes y Phil, 1972; Olsnes, 2004).

En el laboratorio de David Vázquez coincidí por primera vez con Sjur Olsnes y su trabajo con ricina. Muchos años después, en 2010, tuve el honor de publicar con él y en colaboración con otros tres laboratorios, un trabajo sobre una nueva lectina tetramérica del tipo (A-B)<sub>2</sub> presente en la planta *Sambucus ebulus* L. perteneciente a la familia de la ricina, que manteniendo la actividad antiribosómica similar a la de la ricina, presenta alteraciones substanciales en las cadenas B que reducen su actividad sobre células intactas al seguir un tránsito intracelular distinto al seguido por la ricina (Iglesias y cols., 2010). Esta proteína forma parte de la actividad que detectó hace años el Prof. Ortega en un trabajo de “screening” en numerosas plantas realizado con su discípulo Angel López Dolara a mediados de los años sesenta.

Voy a desgranar los conceptos básicos sobre las lectinas como herramientas del tercer código biológico y dedicaré una parte a los aspectos más relacionados con mi experiencia investigadora.

# FLUJOS DE INFORMACIÓN Y ALFABETOS QUÍMICOS

*Decía Bernardo de Chartres que somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura.*

Juan de Salisbury, *Metalogicon*, 1159, (III, 4)

Esta reflexión defendida por Isaac Newton en el mundo de la ciencia reconoce que el trabajo de innumerables científicos ha permitido el avance discreto del conocimiento, jalonado por golpes de genialidad incubados en los ambientes propicios, en momentos críticos de la historia, siempre basados en las investigaciones anteriores. Ello ha permitido el ajuste y la aparición de nuevos paradigmas en la Ciencia.

Momentos estelares han sido los que han conducido al desciframiento de los códigos de información biológica, que desempeña un papel crucial en el avance científico. Hoy es vital saber cómo se produce el flujo de información en la materia viva para entender el complejísimo conjunto de interacciones de las moléculas, las células y los tejidos entre si y con el entorno y en consecuencia la respuesta biológica.

## EL CÓDIGO GENÉTICO.

El final de la segunda guerra mundial dejó un panorama excitante desde el punto de vista científico. En el plano de la biología irrumpía con toda vitalidad la bioquímica y el intento de explicar la biología en términos moleculares. Los estudios sobre los ácidos nucleicos y su función potencial en la transmisión de la información genética fue el primer impulso para descifrar el código que utiliza la materia viva para replicarse.

Los notables estudios cristalográficos de Franklin y Rosling (Franklin y Rosling, 1953), junto con los no menos notables de Wilkins, Stokes y Wilson (Wilkins y cols., 1953), permitieron a Watson y Crick (previo examen de las fotografías cristalográficas obtenidas por Rosalind Franklin de la sal sódica del ADN de timo de carnero), proponer una estructura de

tipo helicoidal del ácido desoxirribonucleico, tipo helicoidal que ya había sido propuesto por Pauling y Corey (Pauling y Corey, 1953), pero que como novedad proponía una hélice con dos hebras antiparalelas enrolladas entre sí, presentando un apareamiento de bases por enlaces de hidrógeno entre adenina y timina y guanina y citosina, siguiendo las reglas de Chargaff. En el artículo de 1953 de Watson y Crick en Nature hay un párrafo que resume la importancia del modelo propuesto, dice así: “*No se nos escapa que el apareamiento específico que hemos postulado sugiere inmediatamente un posible mecanismo de copia para el material genético*” (Watson y Crick, 1953).

Desde este momento se inició una frenética carrera para descifrar el código genético. Se llegó al conocimiento de que el ácido desoxirribonucleico se podía replicar *in vitro* y se descubrió que el ácido ribonucleico ARN participaba de alguna manera en el proceso. Crick propuso su papel central en la transferencia de información entre el ADN y las proteínas. Esto, junto con los descubrimientos en paralelo sobre el ARN mensajero y los incipientes estudios sobre el mecanismo de la biosíntesis de proteínas, le llevó a proponer el denominado “dogma central de la biología”, consistente en que el ADN contenía información que se autoreplicaba y se transfería, mediante el ARN mensajero a las proteínas en un proceso que se denominó transcripción.

Crick y otros investigadores pudieron determinar en 1961 que la transferencia de información desde el ADN se realizaba mediante triplete de nucleótidos (Crick y cols., 1961).

En este momento se inició una búsqueda frenética de los elementos que podrían intervenir en el desciframiento. El descubrimiento experimental de que el ácido ribonucleico podía actuar como intermediario o mensajero de la información entre el ADN y las proteínas significó un enorme avance.

A principios de los años 60 se supo que las proteínas se sintetizaban en partículas constituidas por ácido ribonucleico y proteínas, partículas denominadas posteriormente ribosomas, y se sentaron las bases para el estudio molecular del mecanismo de la biosíntesis de proteínas y como la información contenida en el ADN era transferida a las proteínas para que posteriormente estas ejerciesen su función estructural, enzimática y hormonal. Este proceso se denominó traducción. Se trataba de averiguar como el código genético era descifrado en términos moleculares por los ribosomas. En ello participaron en estos años una pléyade de investigadores muy notables que es imposible reseñar aquí.

Como resultado del proyecto Manhattan se disponía de gran cantidad de radioactividad y se decidió que podría ser útil desde el punto de vista analítico para el estudio de los procesos biológicos y podría permitir la preparación de biomoléculas marcadas con isótopos radioactivos.

La administración aminoácidos radioactivos permitió determinar que la radioactividad se acumulaba en las partículas ribonucleoproteicas conocidas como ribosomas. Entonces el grupo de Paul Zamenick empezó a utilizar sistemas acelulares y encontró la radioactividad de los precursores aminoácidos en las proteínas (Zamecnik y cols., 1956). Este hito fundamental en el uso de sistemas acelulares para estudiar los procesos biosintéticos *in vitro*, supuso un paso de gigante para profundizar en el estudio del mecanismo de biosíntesis de proteínas y de cómo la información contenida en los ácidos nucleicos podría traducirse en proteínas.

Zamenick, en colaboración con Hoagland descubrió que, en efecto, existían unas moléculas de ARN que en presencia de adenosin trifosfato formaban un complejo ternario (Hoagland y cols., 1956). Este complejo permitía la activación del aminoácido para poder participar en el proceso de biosíntesis de proteínas. Este ARN de transferencia era el que había predicho Crick.

Poco después de que Francis Crick propusiera el dogma central de la biología, propuso también que debería existir algún tipo de intermediario entre la información contenida en el ARN mensajero y las proteínas. Jacob y Monod descubrieron que la información contenida en el ADN y el sitio de síntesis de proteínas, el ribosoma, se transportaba mediante un ARN metastable que denominaron ARN mensajero (Jacob y Monod, 1961).

Uno de los avances más significativos en la carrera por el desciframiento de este primer código del flujo de información biológica, se produjo cuando Severo Ochoa y Marian-Grunberg Manago descubrieron que un enzima aislado de *Azotobacter vinelandii* catalizaba la síntesis de polinucleótidos altamente polimerizados (Grunberg-Manago y cols., 1956). Ello permitió a Ochoa la consecución del premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1959 junto a su discípulo Arthur Kornberg.

En paralelo, Nirenberg y Matthaei utilizaron ácido poliuridílico sintetizado con este enzima y extractos acelulares de la bacteria *Escherichia coli* para determinar que este polinucleótido sintético permitía la síntesis de polifenilalanina (Nirenberg y Matthaei, 1961). Por lo tanto, se concluyó que el triplete UUU codificaba a la fenilalanina. De manera simultánea, Govind Khorana, entre otros, sintetizó tripletes de nucleótidos que

permitieron el desciframiento del código genético. Por ello obtuvo el Premio Nobel de Medicina en 1968 junto a Holley y Nirenberg por, como dijo la Academia literalmente, “*su interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas*”.

El descubrimiento de que determinados virus contenían ARN en vez de ADN llevó al planteamiento de cómo podría traducirse la información contenida en el material genético de dichos virus una vez infectadas las células. Se descubrió que el proceso de transcripción de ADN a ARN, un paso clave del “dogma”, podría revertirse mediante un enzima denominada transcriptasa en reverso o retrotranscriptasa que permite la síntesis de ADN utilizando como molde el ARN viral. Un ejemplo clásico es el conocido virus del SIDA.

## **EL CÓDIGO DE AZÚCARES Y LA GLICÓMICA.**

La comunicación celular se produce en términos moleculares. A las biomoléculas informativas ácidos nucleicos y proteínas, hoy hay que añadir los azúcares en todas sus formas, monómeros, oligómeros y polímeros. Los azúcares son la fuente de energía que rige nuestras células, suponen los compuestos biológicos poliméricos más abundantes en la Naturaleza, como celulosa y quitina, y están en la superficie de todas las células formando parte de glicoproteínas y glicolípidos. Ello ha llevado a acuñar el término “*glicobiología*” que recoge el conjunto de fenómenos relacionados con los azúcares en el metabolismo celular y tisular.

Los azúcares sencillos son las letras del alfabeto de un nuevo lenguaje que trata de explicar cómo interaccionan las células intercambiando información de todo tipo. En este sentido pueden considerarse como el “tercer código o alfabeto de la vida” que se añade al primero, los nucleótidos y al segundo los aminoácidos (Kaltner y cols., 2019).

Dada la alta densidad de glicanos en la superficie celular en forma de glicoproteínas y glicolípidos, los glicanos constituyen una vía muy poderosa para presentar señales de reconocimiento celular en un espacio mínimo (Gabiús, 2009). La lectura de estas señales informativas se convierte en señales celulares.

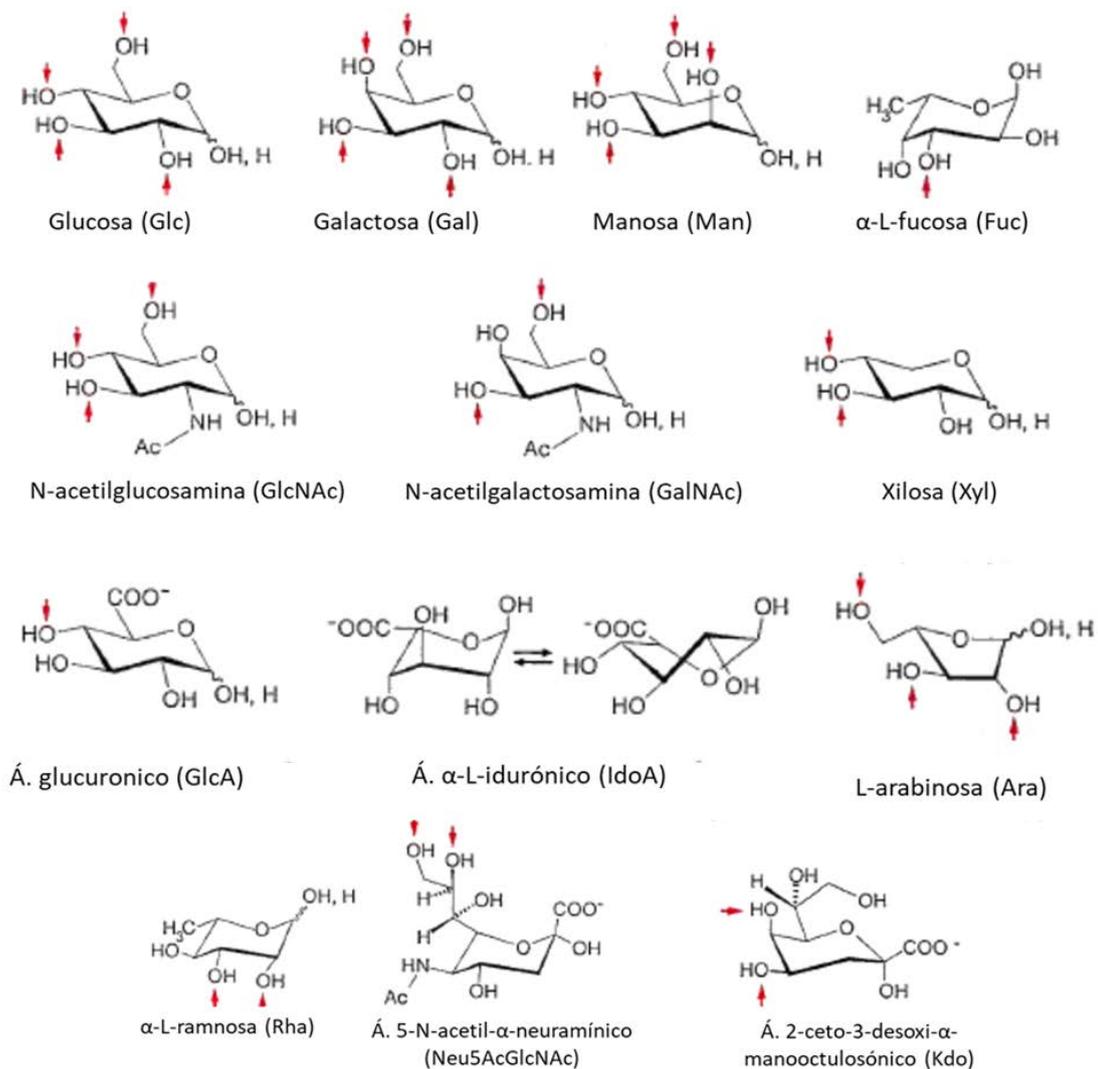
Las letras básicas del tercer alfabeto de la vida son las siguientes: Glucosa (Glc), Galactosa (Gal), Manosa (Man),  $\alpha$ -L-fucosa (Fuc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (N-Ac-Gal), Xilosa

(Xyl), á. glucurónico (GlcA), á.  $\alpha$ -L-idurónico (IdoA), L-arabinosa (Ara),  $\alpha$ -L-ramnosa (Rha), á. 2-ceto-3-desoxi- $\alpha$ -manooctulosónico (Kdo) y á. 5-N-acetil- $\alpha$ -neuramínico (Neu5AcGlcNAc) (Figura 1). El lenguaje que se puede escribir con este alfabeto mediante la adición de azúcares diferentes en la misma cadena, la ramificación y la formación de glicoconjugados es enorme y está presente de una u otra manera en todo tipo de organismos.

En comparación con los otros dos alfabetos, el alfabeto de azúcares es superior en capacidad de codificación ya que las posicionesceptoras de una desoxirribosa en los ácidos nucleicos y de un aminoácido en las proteínas son dos, mientras que en cada monosacárido son cuatro. En palabras de Winterburn y Phelps *“los carbohidratos son ideales para generar unidades compactas con propiedades informacionales explícitas dado que las permutaciones de los enlaces son mayores que las que se alcanzan con los aminoácidos y con la capacidad de ramificación”* (Winterburn y Phelps, 1972).

Comparativamente, en términos de capacidad de codificación, el número de combinaciones de seis letras (monómeros) para constituir una palabra (oligómero) es de 4.096 en oligonucleótidos,  $6,4 \cdot 10^6$  en péptidos y  $1,44 \cdot 10^{15}$  en los sacáridos (Laine, 1997). Claramente la difusión de la información contenida en el ADN se va amplificando según pasamos de un alfabeto a otro.

A diferencia de los ácidos nucleicos y de las proteínas que necesitan un molde para copiar la información, la síntesis de los glicanos depende de muchos factores que están controlados por el ambiente celular, como son la disponibilidad de sustratos donadores y aceptores, los transportadores y las enzimas en el contexto del microambiente local, lo cual permite una gran cantidad de cambios dinámicos simultáneos y ordenados altamente regulados. La altísima variabilidad estructural que se genera determina el perfil glicómico celular y por tanto las interacciones entre las células.



**Figura 1. Letras del tercer alfabeto.** Las flechas indican las posiciones aceptoras que permiten una amplísima gama de modificaciones, incluida la ramificación, para generar una multitud de estructuras (*adaptado de Kaltner y cols., 2019*).

El enorme caudal de información que contiene el perfil glicómico de una célula debe ser descodificado por moléculas capaces de “comprender” dicha información y transmitirla al interior celular para desencadenar los efectos moleculares oportunos. Dichas moléculas son las lectinas, proteínas capaces de interactuar con los polisacáridos de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular. Esta actividad lectina depende de la presencia de sitios específicos de unión a azúcares que definen la especificidad de las lectinas. Estos sitios se denominan dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD de: *carbohydrate recognition domain*”).

La amplísima diversidad de los glicanos debe tener una contrapartida en proteínas que la puedan interpretar y así definir un espectro de respuestas funcionales dependientes del reconocimiento glicano-proteína. Estos sitios

CRD se generan al plegarse las lectinas y conformar moléculas activas. Por lo tanto, vienen definidos por la información codificada en el ADN y que es transmitida en forma de estructura proteínica. El avance en la investigación de la denominada “*glicómica funcional*” ha sido y es posible gracias a la disponibilidad de lectinas de todos los orígenes, tanto de plantas, hongos y animales, que han sido y son utilizadas como herramientas analíticas.

## **BREVE RESUMEN HISTÓRICO DE HITOS RELEVANTES EN LA INVESTIGACIÓN SOBRE LAS LECTINAS.**

Voy a presentar un pequeño resumen histórico de los hitos más importantes en relación con la investigación sobre las lectinas, para después pasar a considerar diversos aspectos de interés de estas proteínas, su significación e importancia y sus aplicaciones.

La historia de la investigación sobre lectinas arranca aproximadamente en 1860 cuando Michell observó “coagulación” sanguínea por veneno de serpiente (Mitchell, 1860), que luego se demostró que en realidad no era coagulación si no agregación celular por una proteína que se llamó aglutinina.

En 1888, en el laboratorio de Kobert en Dorpat (Tartu, Estonia), Stillmark trabajando sobre ricina una proteína presente en las semillas del ricino de la que hablaremos posteriormente, observó que esta proteína aglutinaba los eritrocitos (Stillmark, 1988).

El término “fitohemaglutinina” fue introducido en 1898 por Elfstrand para las proteínas de plantas capaces de aglutinar los eritrocitos (Elfstrand, 1898). Entre 1902 y 1909 se desarrolló una intensa actividad investigadora que permitió descubrir diversas proteínas en bacterias y plantas con capacidad aglutinante de células sanguíneas.

En 1913, Kobert introdujo una mejora experimental en la investigación con lectinas, al utilizar por primera vez células intactas para el aislamiento de ricina y confirmó sin lugar a dudas que se trataba de una proteína (Kobert, 1913).

Entre 1919 y 1936, Sumner llevó a cabos numerosos estudios sobre la concanavalina A, que permitieron su cristalización y clasificación como globulina que precipitaba el almidón, el glucógeno y las mucinas (Sumner y

Howell, 1936). Entre 1941 y 1952 se detectaron las aglutininas víricas y se investigaron las interacciones entre distintas lectinas y los grupos sanguíneos.

En 1954 Boyd introdujo el término lectina (Boyd, 1954), y desde entonces el estudio de este tipo de proteínas adquirió una gran importancia en distintos campos de la Biología. Un hito importante desde el punto de vista experimental fue la introducción de la cromatografía de afinidad para el aislamiento de lectinas de todo tipo, la determinación de la secuencia de aminoácidos, su estructura tridimensional y la detección de la actividad insecticida de algunas lectinas y, más recientemente, el aislamiento de lectinas de tumores.

Desde el punto de vista de las técnicas instrumentales, en los últimos 25 años se han realizado enormes avances que han permitido por ejemplo el análisis ultraestructural de complejos lectina-ligando por resonancia magnética nuclear en 1995 y la profundización en el estudio de la selección diferencial de confórmers por lectinas de plantas, animales y hongos. En estos estudios han destacado los laboratorios de Hans-Joachim Gabius en el Instituto de Química Fisiológica de la Universidad de Munich, Alemania y de Irvin Goldstein en el Departamento de Química Biológica de la Universidad de Michigan en Ann Arbor, E.E.U.U., con el que tuve el honor de publicar en 1997 una nueva lectina tetramérica de corteza de *Sambucus nigra* que resultó ser específica de ácido siálico.

La denominada por los especialistas “lectinología” es una especialidad muy amplia y novedosa. Una búsqueda actual en la base de datos *Web of Science* con la palabra clave “lectin” rinde más de 75.000 trabajos recogidos desde 1954 que abarcan todos los aspectos sobre estas importantes proteínas y en un crecimiento exponencial.

El papel de las lectinas en el reconocimiento celular viene definido por dos aspectos, especificidad y afinidad, ambos extraordinariamente regulados y que en conjunto determinan la actividad y función biológica de las lectinas.

De acuerdo con Gabius se pueden definir seis niveles de regulación de la afinidad de las lectinas por los glicanos, de complejidad creciente (Gabius, 2011). El primero estaría en la interacción de la lectina con mono y disacáridos. El segundo estaría en la interacción de la lectina con los oligosacáridos incluyendo ramificaciones y sustituciones. El tercer nivel estaría relacionado con la forma del oligosacárido y su flexibilidad conformacional. El cuarto nivel se relacionaría con los parámetros espaciales que tiene que ver con el efecto agregado de las cadenas de glicano. El quinto nivel estaría relacionado con el efecto agregado de cadenas de glicano

distintas y vecinas presentes en la misma glicoproteína o en complejos glicoproteína-glicolípido (ejemplo: los complejos integrina-gangliósido). Finalmente, el sexto nivel estaría relacionado con el efecto agregado de distintos glicoconjugados sobre la superficie en vecindad espacial que permitiría formar microdominios de unión.

Estos niveles de regulación de la afinidad determinan la interacción final glicano-proteína. Así, mientras los valores de afinidad de las lectinas por los monosacáridos tienen una constante  $K_D$  de alrededor de  $10^{-3}$ , la afinidad por los oligosacáridos y los glicanos complejos está entre  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$ . En comparación, los anticuerpos tienen constantes de afinidad  $K_D$  de  $10^{-8}$  -  $10^{-12}$ .

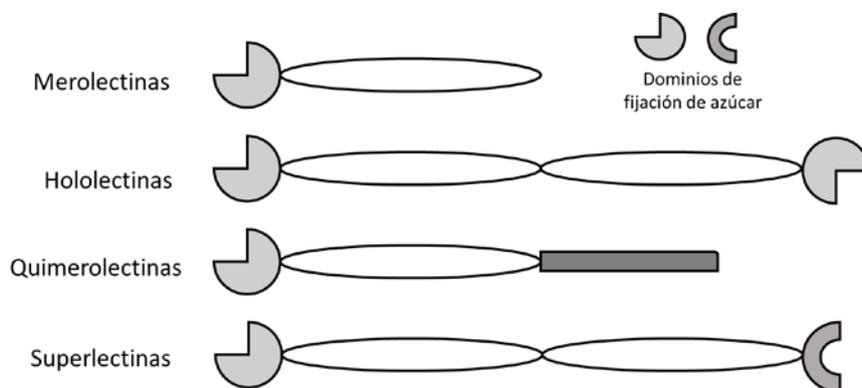
Con estas posibilidades de modulación de la afinidad en la interacción glicano-lectina puede haber diversas intensidades en las señales que determinen el efecto celular. Las fluctuaciones de la interacción glicano-lectina tanto extra como intracelulares influyen decisivamente en la transmisión de la señal informativa específica que lleva a la regulación de las actividades intracelulares.

## DISTRIBUCIÓN Y TIPOS DE LECTINAS.

Las lectinas están presentes como hemos comentado en una gran variedad de organismos habiéndose encontrado en plantas, microorganismos, animales vertebrados e invertebrados, hongos y virus (Sharon y Lis, 2004; Van Damme y cols., 2011; Barondes y cols., 1994; Loh y cols., 2017).

Se conocen una gran cantidad de lectinas, particularmente de plantas, lo que ha permitido todo tipo de estudios estructurales y funcionales. Mientras que en mamíferos se tiene una idea de la función de muchas de las lectinas en procesos celulares tales como adhesión, migración, señalización, apoptosis, etc., la función en las plantas y los hongos es menos conocida. No obstante, en plantas hay hipótesis sobre un papel de protección frente a parásitos y hongos (Van Damme y cols., 2011) y sobre las respuestas de las plantas al estrés hídrico, la congelación, los tóxicos y la radiación solar (Tsaneva y Van Damme, 2020).

Las lectinas pueden clasificarse de diversas maneras, por su localización subcelular, por su estructura molecular, por su secuencia de aminoácidos y por su abundancia. La clasificación más actualizada y que permite comprender mejor la naturaleza de estas proteínas es la basada en su estructura molecular (figura 2). Así, las lectinas pueden clasificarse en: 1) merolectinas, aquellas que contienen un solo dominio de fijación de azúcar; 2) hololectinas, las que tiene más de un dominio de fijación del mismo azúcar; 3) las superlectinas, las que tiene más de un dominio de fijación de azúcar diferente; 4) quimerolectinas, las que tiene un dominio de fijación de azúcar ligado a otro dominio de proteína con actividad biológica, a menudo enzimática.



**Figura 2. Clasificación de las lectinas en función de su tipo de estructura y dominios de fijación de azúcar y otra actividad biológica.**

En el caso de las quimerolectinas, la clasificación se puede ampliar a las de origen vegetal usualmente del tipo A-B y a las de origen bacteriano del tipo A-B<sub>5</sub>, en donde A es una actividad enzimática y B una lectina. Como ejemplos de las primeras están ricina, abrina y ebulina y de las segundas la toxina Shiga y las toxinas parecidas a la toxina Shiga (*SLT*).

# LECTINAS DE MICROORGANISMOS

Bacterias, virus, hongos y parásitos poseen lectinas en su superficie que se denominan adhesinas, que desempeñan un papel importante en su patogenicidad ya que interaccionan y colonizan las mucosas lo que conlleva la aparición de lesiones en los tejidos infectados. Participan en la fagocitosis mediando el reconocimiento de determinantes no inmunes y de la adhesión celular (Sharon y Lis, 2004).

Entre los microorganismos importantes desde un punto de vista patogénico que poseen lectinas en su superficie se encuentran *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Leishmania amazonensi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocitogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Plasmodium falciparum*, *Staphylococcus aureus* y *Tripanosoma cruzi*.

Determinados virus poseen también lectinas en su superficie que les permiten interaccionar con sus células blanco. Un ejemplo ilustrativo lo ofrece el virus de la influenza que posee una lectina que reconoce restos de ácido siálico terminales de polisacáridos de la superficie de las células.

Algunas bacterias producen y liberan al medio toxinas del tipo A-B<sub>5</sub> extremadamente tóxicas que atacan a los riñones y producen lesiones que pueden llegar a ser mortales (Jacewicz y cols., 1986). Mientras que la cadena A de las lectinas vegetales es una N-glicosidasa del ARN ribosómico, la cadena A de las lectinas bacterianas es una cadena polipeptídica que se hidroliza por la endopeptidasa furina, en las etapas iniciales de la endocitosis probablemente en los endosomas y el aparato de Golgi *trans*, en dos fragmentos A1 y A2 unidos por un puente disulfuro. La cadena A1 es la que retiene la actividad catalítica de ADP ribosilación dependiente de NAD del factor de elongación 2 (EF-2) en un aminoácido especial denominado diftamida, derivado de la histidina, y el dominio de interacción con el ribosoma. Este mecanismo de acción es compartido por otras toxinas bacterianas como la toxina diftérica y la toxina de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cadenas B de la toxina Shiga se unen a la parte de glicano del glicoesfingolípido globotriaosylceramide Gb3 (globósido trisialo) en la cara externa de la membrana de las células blanco en las células endoteliales (Jacewicz et al., 1986; Engedal y cols., 2011).

Las lectinas juegan también un papel central en la unión de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* con las raíces de las plantas (Van Damme y cols., 2011).

## LECTINAS ANIMALES

La presencia de lectinas en animales se conoce desde principios del siglo XX. La intensa investigación sobre las lectinas en animales ha permitido un extraordinario crecimiento de esta rama de la lectinología que implica a muy diversas disciplinas, en particular a la Biología Celular.

La primera lectina de origen animal que se aisló fue una presente en la anguila que resultó ser específica de L-fucosa (Watkins y Morgan, 1952). A mediados de los setenta del siglo pasado solo se habían aislado y caracterizado tres lectinas, de la anguila, del caracol y del cangrejo cacerola. Una de las lectinas de la anguila eléctrica resultó ser una lectina específica de galactosa y dio lugar a la familia de las galectinas (Teichberg y cols., 1975).

Desde entonces se han aislado y caracterizado una gran cantidad de lectinas que se clasifican como se indica en la tabla 3. Por su importancia en los procesos de comunicación intercelular vamos a centrarnos únicamente en dos familias de lectinas que por su importancia han concentrado una gran cantidad de investigaciones, como son las galectinas y las siglecs.

**Tabla 1. Lectinas animales agrupadas en familias.**

<b>Familias de lectinas</b>	<b>Ligando sacárido típico</b>	<b>Localización en la célula</b>	<b>Estructura del dominio lectina</b>
Calnexina y Calreticulina	Glc <sub>1</sub> Man <sub>9</sub>	ER	β-“sandwich”
Lectinas tipo M	Man <sub>8</sub>	ER	β-“barrel”
Lectinas tipo L	Varios	ER, aparato de Golgi	β-“sandwich”
Lectina tipo P	Man-6-fosfato	Ruta de secreción	β-“barrel”
Lectinas tipo C	Manósidos, galactósidos, ácidos siálicos y otros	Unidas a membrana y extracelular	Mezcla α/β / lectinas parecidas a las de tipo C
Lectinas de tipo	β-galactósidos	Citoplasma,	β-“sandwich”

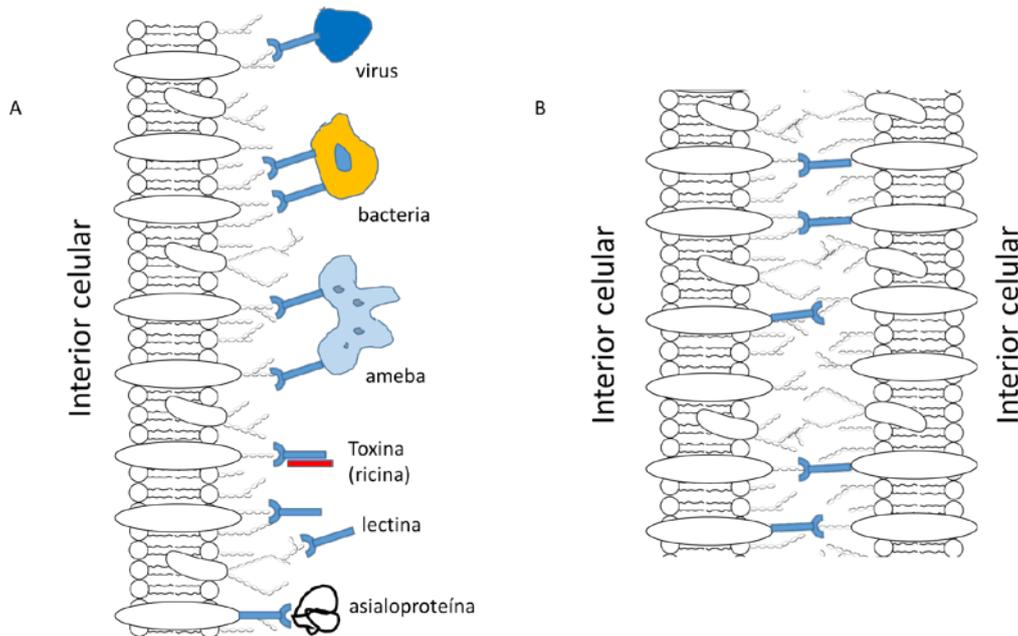
<i>S. Galectins</i>		extracelular	
Lectinas de tipo I. <i>Siglecs</i>	Ácido siálico	Unidas a membrana	$\beta$ -“sandwich”
Lectinas tipo R	Varios	Aparato de Golgi, unidas a membrana	Hoja de trébol $\beta$
Lectinas de tipo F	(GlcNAc) <sub>2</sub>	Citoplasma	$\beta$ -“sandwich”
Lectinas de tipo fibrinógeno	GlcNAc, N-Ac-Gal	Unidas a membrana, extracelular	ND
Lectinas de tipo Chi	Quito-oligosacáridos	Extracelular	$\alpha/\beta$ “barrel”/ TIM
Lectinas de tipo F	Oligosacáridos terminados en fucosa	Extracelular	$\beta$ -“sandwich”
Intelectinas	Galactosa, pentosas galactofuranosa,	Unidas a membrana, extracelular	Varias estructuras
Annexinas	Glicosaminoglicanos, heparina y sulfato de heparina	Unidas a membrana	ND

<sup>1</sup> TIM-“barrel”: plegamiento en forma de barril con ocho  $\alpha$ -helices y ocho bandas  $\beta$  paralelas que se alternan a lo largo de la estructura polipeptídica. TIM deriva de la estructura de la triosa isomerasa. N-Ac-Gal: N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: manose; ND, No determinada; ER: retículo endoplásmico.

Al igual que en vegetales, en animales existen diversos tipos de lectinas de localización citoplasmática y nuclear. Desde 2001 se conocen miembros de la familia HSP70 que se localizan en el núcleo, son capaces de fijar O-NAc-glucosamina y parecen estar implicadas en el transporte nuclear de proteínas glicosiladas y en el control de la calidad de las proteínas (Lannoo y Van Damme, 2010).

## **LAS LECTINAS COMO MOLÉCULAS DE RECONOCIMIENTO CELULAR.**

La interacción de las lectinas con los carbohidratos de la superficie celular media procesos de reconocimiento que se traducen en la adhesión necesaria para el proceso de infección por bacterias, virus y parásitos y de intercambio de información entre las células animales (figura 3).



**Figura 3. Interacciones lectina-carbohidrato en la superficie celular.** A: interacción de virus, bacterias, protozoos (parásitos), toxinas (ricina), lectinas libres, asialoproteínas, etc. B: Interacción de células vecinas mediante interacción de carbohidratos de la superficie celular con lectinas de la célula adyacente.

La interacción provoca procesos celulares que van desde la invaginación de la membrana para la internalización del microorganismo y de proteínas como toxinas, lectinas y sialoproteínas, entre otras, hasta la comunicación entre células vecinas del mismo tejido. Este último caso podría estar relacionado con la inhibición por contacto que aparece en el crecimiento de las células tumorales en donde se altera la localización de los receptores de lectinas y, en consecuencia, el intercambio de información que produce al final la pérdida de la inhibición por contacto.

Las lectinas de las plantas están relacionadas con los procesos de defensa frente a microorganismos patógenos, parásitos e insectos, así como los procesos de interacción específica que permite la asociación de bacterias fijadoras de nitrógeno en las leguminosas.

En los animales se han estudiado numerosos procesos biológicos en los que median las lectinas. Así, las chaperonas calnexina y calreticulina son específicas del retículo endoplásmico que dependen de la concentración citoplásmica de calcio e interactúan con dominios hidrofóbicos

expuestos impidiendo la agregación insoluble de las cadenas polipeptídicas lo que permite su conformación nativa correcta (Eggleton y cols., 2016; Yadav y cols., 2019).

Otra lectina del retículo endoplásmico es ERGIC-53. Esta lectina es específica de manosa y opera como transportador de glicoproteínas desde el retículo endoplásmico hasta el compartimento intermedio del aparato de Golgi, determinando de esta manera los transportes retrógrado y anterógrado, así como la acumulación de proteínas en el retículo endoplásmico de dichas glicoproteínas (Chen y cols., 2013).

Un grupo de lectinas denominadas colectinas y dectinas están relacionadas con la inmunidad innata y actúan sobre microbios favoreciendo su fagocitosis y destrucción (Murugaiah y cols., 2020). La molécula de colectina consta de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas conformando una triple hélice. Cada cadena posee un dominio de fijación de azúcar que le permite la fijación de polisacáridos específicos.

Se han descrito diversos tipos presentes en los distintos tejidos. En la inmunidad innata hay lectinas que reconocen polisacáridos presentes en la superficie de hongos patógenos como *Candida albicans* y *Pneumocystis carinii*. Entre ellas están dectina 1 que reconoce  $\beta(1-3)$  glucanos y dectina 2 que reconoce  $\alpha$  mananos presentes en la superficie del hongo. Dectina 1 reconoce *Pneumocystis carinii*. La interacción lectina-polisacárido promueve procesos tales como fagocitosis y producción de radicales libres como las especies reactivas del oxígeno (Saijo y Iwakura y cols., 2011). También relacionada con la inmunidad innata está la lectina receptora de manosa de los macrófagos que participa en la eliminación de hormonas glicoprotéicas.

Un grupo de lectinas denominadas selectinas están relacionadas con los linfocitos, tanto en la adhesión de los linfocitos circulantes a las células especializadas dentro de los órganos linfoides como en el tráfico a los sitios de inflamación (McEver, 2015).

Como vemos, el desarrollo de la glicómica ha permitido explicar muchos procesos de interacción celular y reconocimiento tanto extra como intracelular. Dos de las familias más importantes implicadas en los fenómenos de reconocimiento celular en las células animales son las galectinas y las siglecs.

## **GALECTINAS.**

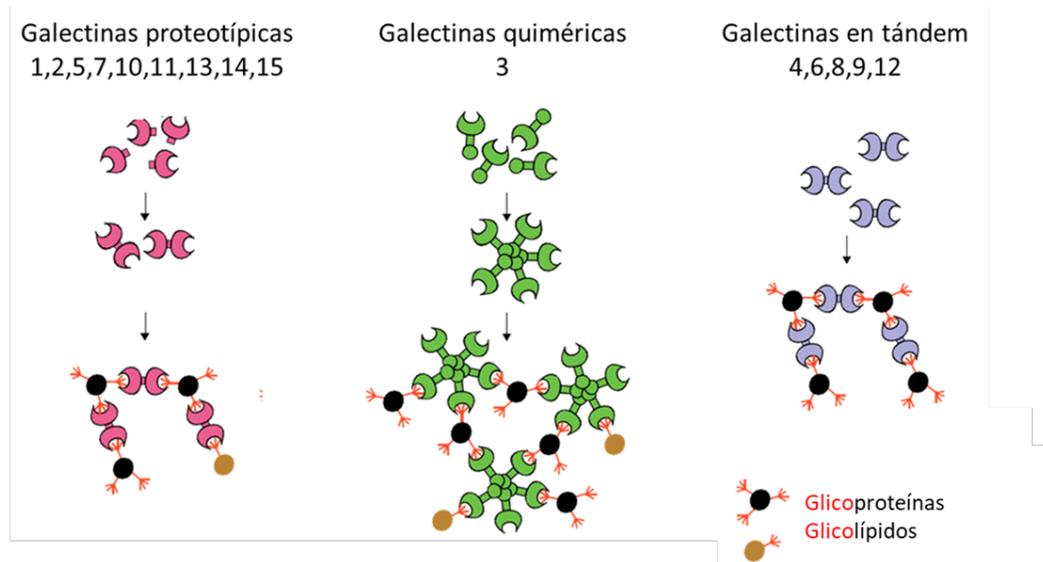
El término galectina se introdujo en 1994 como “*miembro de una familia de proteínas con afinidad por  $\beta$ -galactósidos y similitud secuencial de aminoácidos en el sitio de fijación de azúcar*” (Barondes y cols., 1994). Las galectinas incluyen un grupo de proteínas animales y algunas de hongos que cumplen estos criterios. El estudio de la estructura y función de estas proteínas ha venido a llamarse “*galectinómica*” (Cooper, 2002). Estas lectinas son las denominadas en terminología antigua las lectinas de tipo S.

Se descubrieron utilizando una tecnología similar a la utilizada para las lectinas vegetales, esto es, la cromatografía de afinidad de extractos de tejidos animales mediante resinas con cadenas de  $\beta$ -galactósidos unidos covalentemente que selectivamente fijan las proteínas con capacidad de lectina de galactosa. La elución se realiza con lactosa o asialofetuína. Dentro del grupo de galectinas se recogen hoy en día numerosas lectinas conocidas anteriormente y denominadas con otros nombres pero que cumplen con los criterios para ser clasificadas como galectinas (Yang y cols., 2008).

Las galectinas tienen características típicas de las proteínas del citosol, son sintetizadas sin peptido señal y están acetiladas en el extremo N-terminal. Algunas pueden estar fosforiladas, pero no parece que sufran procesos de modificación post-traduccional. Desde el citosol las galectinas son dirigidas hacia el núcleo u otros destinos subcelulares, así como al exterior de la célula por un proceso de secreción no clásico que no requiere paso por el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi.

Los ligandos de las lectinas más importantes presentes en la superficie de las células de mamífero son los N-glicanos ramificados que se encuentran formando parte de las moléculas de la membrana. La interacción de las galectinas con los glicolípidos y las glicoproteínas de la membrana forma un enrejado en la superficie celular responsable de la modulación de muchos procesos biológicos.

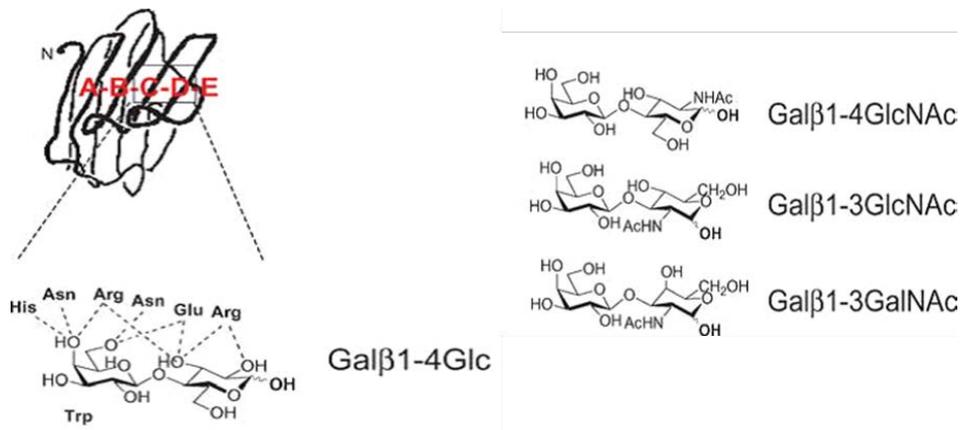
Las galectinas poseen uno o dos dominios de fijación de azúcar CRD dentro de una única cadena polipeptídica. En la figura 4 se presentan los tres tipos de galectinas según su estructura (Boscher y cols., 2011).



**Figura 4. Tipos de galectinas.** Las prototípicas poseen un dominio CRD pero pueden formar dímeros (izq.); las quiméricas poseen un dominio CRD y una porción de proteína N-terminal sin actividad lectina responsable de la oligomerización hasta formar pentámeros (cent.); las de tándem son equivalentes a las prototípicas cuando se dimerizan y poseen dos dominios CRD. (*adaptada de Boscher y cols., 2011*).

Las galectinas con un CRD se denominan prototípicas (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14 y 15), las que contienen un CRD y un dominio N-terminal no lectina, que le permite la oligomerización hasta formar pentámeros, se denominan quiméricas (galectina 3) y las que poseen dos CRD se denominan en tándem (galectinas 4, 6, 8, 9 y 12).

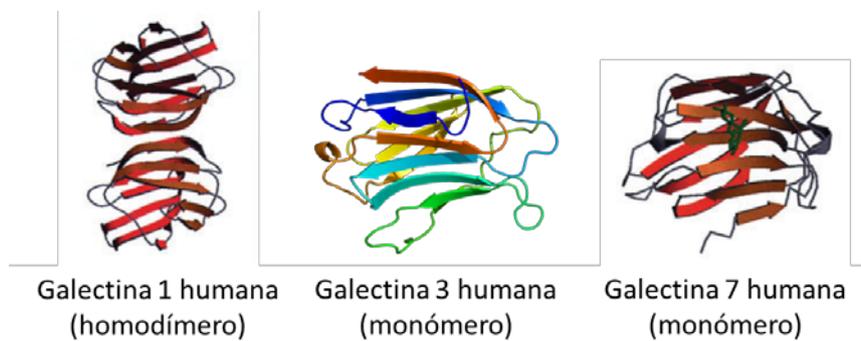
El sitio CRD de las galectinas es una estructura  $\beta$  en forma de “sandwich” de unos 135 aminoácidos. Las dos estructuras están un poco dobladas con seis tramos formando una concavidad (S1-S6) y 5 tramos formando una convexidad (F1-F5). En la concavidad se puede alojar hasta un tetrasacárido lineal. En este sitio pueden definirse 4 subsitios A, B, C y D y un subsitio de menor afinidad E (figura 5). Los subsitios C y D son los núcleos de fijación del disacárido en donde una molécula de lactosa interacciona con los aminoácidos de los subsitios C y D. Los subsitios C y D pueden fijar también otros disacáridos naturales como los indicados en la figura 5.



**Figura 5. Sitios de fijación de las galectinas.** La proteína presenta cuatro subdominios (A-D) de fijación de los terminales de carbohidrato conteniendo galactosa y un subsitio menos definido (E). Los subsitios C y D constituyen el denominado sitio núcleo de fijación indicado por un rectángulo. (*adaptada de Leffler y cols., 2004*).

Las relaciones entre los dominios CRD y la actividad biológica de las galectinas es extremadamente compleja por diversos factores entre los que cabe considerar la capacidad de oligomerización y la posibilidad de que las galectinas se unan simultáneamente a una serie de receptores distintos que a su vez disparen señales celulares distintas.

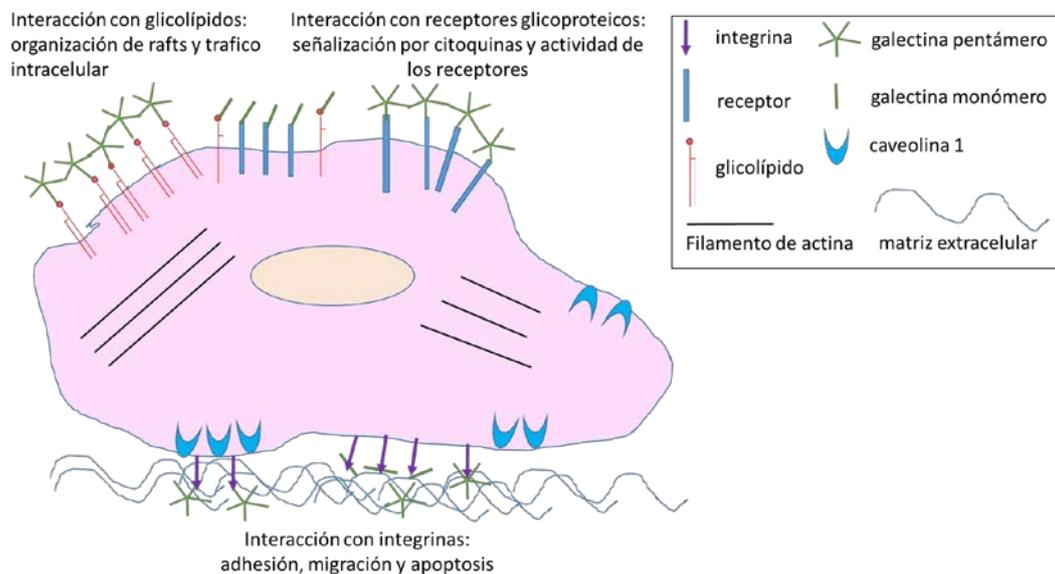
Los estudios sobre la estructura tridimensional de las lectinas en los últimos treinta años han revelado una sorprendente similitud de la estructura terciaria de lectinas de diferentes fuentes a pesar de las diferencias en su estructura primaria. La disposición espacial consiste en un enrollamiento generado por el plegamiento de la proteína en forma de cadenas de conformación  $\beta$  antiparalelas, distribuidas en dos hojas plegadas  $\beta$ . En la figura 6 se pueden observar las estructuras de las galectina humana 1 (homodímero), 3 (monómero) y 7 (monómero).



**Figura 6. Estructuras tridimensionales de tres galectinas humanas, 1, 3 y 7.** La distribución de las cadenas  $\beta$  conforma una estructura que se repite en diversas lectinas animales (ej. proteína amiloide del suero), vegetales (ej. concanavalina A) y proteínas sin actividad lectin (ej. sialidasa de *Vibrio cholerae*). (*gal 1 y 7 adaptada de Sharon y Lis, 2004; gal 3 adaptada de HGNC ID: HGNC:6563*).

Las galectinas 1 y 7 son prototípicas, mientras que la galectina 3 es quimérica lo que le permite formar pentámeros. Tanto las estructuras cuaternarias de la galectina 1 como la 7, se forman por interacción no covalente entre las cadenas polipeptídicas.

El enrejado creado por la interacción de las galectinas con los N-glicanos de la superficie celular genera una gran cantidad de señales que afectan prácticamente a toda la actividad celular. Como se indica en la figura 7 las galectinas 1, 4, 8 y 9 interaccionan con diferentes glicolípidos, especialmente el gangliósido monosialo 1 (GM1), favoreciendo su asociación con microdominios “rafts” de lípidos (Lingwood y Simons, 2010), y pueden estar implicados en la formación de los propios “rafts”, el tráfico intracelular de las proteínas a la superficie apical de las células epiteliales y la migración celular.



**Figura 7. Regulación de la señalización celular por el enrejado de galectinas.** Las galectinas en forma pentamérica pueden interaccionar con glicolípidos, glicoproteínas con función receptora y con integrinas y matriz extracelular. Las lectinas monoméricas interaccionan con glicolípidos y glicoproteínas receptoras. (adaptado de Boscher y cols., 2011).

Por otro lado, la interacción de las galectinas con receptores glicoproteicos modula la señalización celular por citoquinas y la propia actividad de los receptores. La interacción de determinadas galectinas y el glicocalix afecta a los procesos de adhesión y migración celular, así como a la apoptosis. Las galectinas presentan una combinación de actividades intra y extracelulares muy compleja. Incluso la misma galectina puede actuar en varios sitios y en varios procesos. Ello abre un amplio panorama de estudio que afecta a un gran número de procesos.

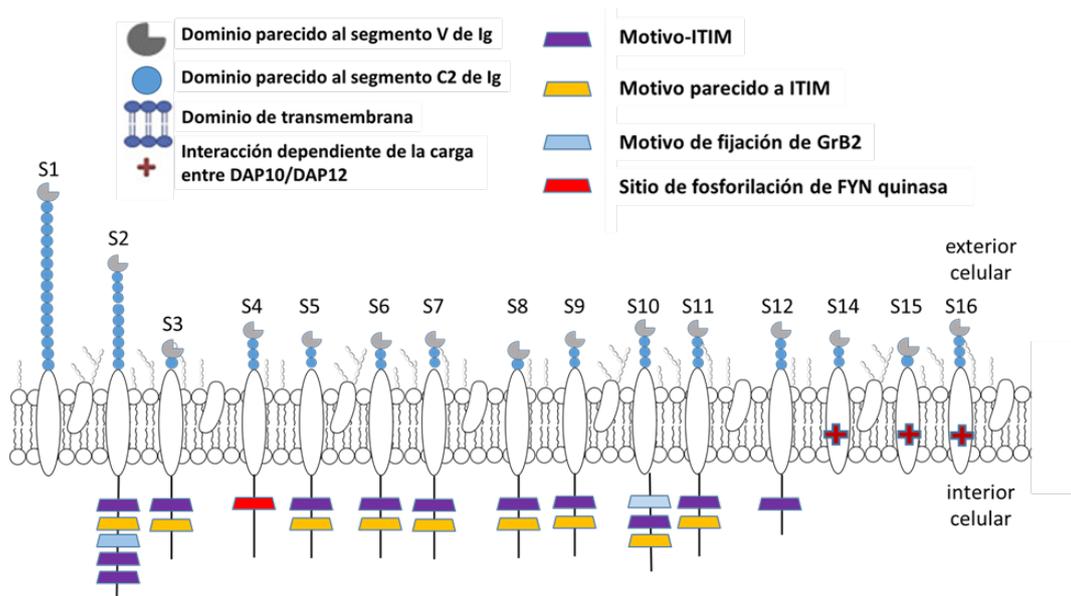
En base a los estudios realizados *in vitro* con cultivos celulares se han propuesto distintas funciones biológicas para el organismo *in vivo*, por ejemplo, en la regulación de la inmunidad y la inflamación (Almkvist y Karlsson, 2004; Levroney y col., 2005; Rabinovitch y cols., 2004), la progresión del cáncer (Yang y cols., 2008) y procesos de desarrollo (Chan y cols., 2006).

La regulación de la interacción de las galectinas con el glicocalix es de enorme importancia por lo que la deficiencia en la decodificación de la información contenida en los N-glicanos por las galectinas está implicada en el funcionamiento alterado de las células y por lo tanto está implicada también en numerosas patologías (An y cols., 2009).

## **SIGLECS.**

Las siglecs son una familia de lectinas parecidas a las inmunoglobulinas y que fijan ácido siálico (“*sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*”) que actúan como receptores reguladores inmunes localizados predominantemente en la superficie de las células del sistema hematopoyético (Lin y cols., 2021) y del sistema nervioso (Bornhöfft y cols., 2018; Linnartz-Gerlach y cols., 2014). Las siglecs transducen señales para regular las actividades inmunológicas e inflamatorias de estas células.

Se han identificado 15 siglecs humanas con contenido peptídico diferente (Figura 8). Todas las siglecs poseen un dominio variable (V) de inmunoglobulina extracelular, que es el que media el reconocimiento del ácido siálico presente en los diferentes glicoconjugados que pueden conducir a la activación o a la inhibición de la respuesta dependiendo de la siglet de que se trate, y dominios parecidos a los C2 de las inmunoglobulinas. El número de segmentos C2 varía desde 1 (siglet 3) hasta 15 (siglet 1).



**Figura 8. Estructura de las siglecs que se expresan en seres humanos.** (basada en la clasificación de Bornhöfft y cols., 2011). ITIM: inmunoreceptor con motivo inhibitor basado en tirosina. GrB2: proteína unida a factor de crecimiento.

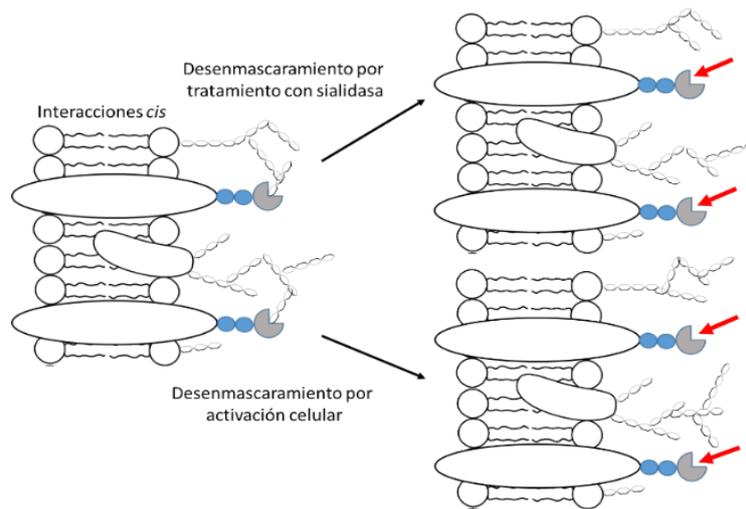
Las siglecs pueden ser activadoras e inhibitoras del sistema inmune. Las siglecs inhibitoras contienen los denominados motivos ITIM (“*immune receptor tyrosine-based inhibitory motif*”) que desactivan motivos activadores que inician la respuesta inmune denominados ITAM (“*immune receptor tyrosine-based activation motif*”). Las siglecs 14, 15 y 16 que no poseen dominios citoplasmáticos producen activación mediante la interacción con la proteína DAP 10/12 (Mrs 10-12KD) que incluye un dominio ITAM requerido para la producción de citoquinas proinflamatorias (Crocker y cols., 2007).

Las siglecs se localizan también en algunos casos en células no hematopoyéticas como en el caso de la galectina 4 que se localiza preferentemente en las células de Schwann y en los oligodendrocitos (Crocker y cols., 2007).

Usualmente el glicocalix de las células de mamífero presenta una elevada cantidad de restos de ácido siálico en los terminales de los glicanos, que participan en un gran número de procesos celulares. La función de los ácidos siálicos puede resumirse en dos tipos: i) como “máscara biológica” que protege a las otras macromoléculas de la membrana celular debido a su carga eléctrica electronegativa y carácter hidrófilo que previene la activación del sistema del complemento; 2) como sitios de reconocimiento

biológico actuando como ligandos de las lectinas de ácido siálico, las siglecs.

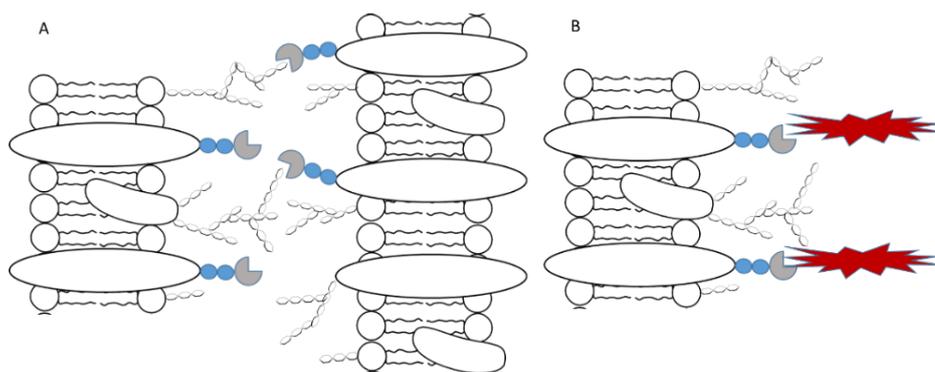
Los sitios de fijación de ácido siálico de las siglecs están enmascarados por la interacción *cis* con los ácidos siálicos de la propia célula (figura 9). El desenmascaramiento puede realizarse bien por acción de una sialidasa que elimina los restos de ácido terminal o por activación celular. En los dos casos los sitios quedan libres para la interacción *trans* con restos de ácido siálico de glicoproteínas y glicolípidos de células vecinas.



**Figura 9. Desenmascaramiento de los sitios de fijación de ácido siálico de las siglecs.**

El desenmascaramiento de los restos terminales de ácido siálico puede realizarse de dos maneras, por tratamiento con sialidasa (parte superior) o por activación celular (parte inferior).

Esta interacción *trans* es más fuerte que la *cis* porque las siglecs implicadas tienen mayor afinidad con los terminales de ácido siálico de las células vecinas. Por otro lado, los patógenos pueden interactuar con alta afinidad con las siglecs y deshacer parte de las interacciones *cis* (figura 10).



**Figura 10. Interacción trans entre siglecs, glicoproteínas de células vecinas y patógenos.** A: interacción *trans* entre siglecs y ácidos siálicos de células vecinas; B: interacción entre patógenos (detalle en rojo) y siglecs por desplazamiento de los terminales de ácido siálico de los sitios de unión de las siglecs.

El perfil de terminales de ácido siálico de las células normales y alteradas es detectado por las siglecs. Estas lectinas intervienen en la activación e inhibición celular tanto en el sistema inmune como en el sistema nervioso. El cerebro es uno de los órganos que expresa un nivel más alto de ácidos siálicos en glicoproteínas y glicolípidos que pueden actuar como posibles ligandos de las siglecs. Los sitios y procesos en los que actúan las sialoproteínas y los sialolípidos son innumerables e imposible abordar aquí.

## LECTINAS DE ORGANISMOS MARINOS.

Los organismos marinos también poseen lectinas y, aunque han sido estudiadas más recientemente, el volumen de información sobre ellas es también enorme (Ogawa y cols, 2011). Pondré algunos ejemplos. De Las esponjas se han aislado varias lectinas entre las que cabe citar la de *Aphrocallistes vastus* una lectina de tipo C (dependiente de  $Ca^{2+}$ ) específica de D-galactosa, la de *Axinella polypoides* que es específica de D-galactosa y de la familia de ricina y la de *Geodia cydonium* específica de N-Ac-lactosa y de la familia de las galectinas.

En los moluscos cabe citar *Tridacna máxima* (tridacina) específica de N-Ac- galactosamina y de tipo C, la de *Haliotis laevigata* específica de D-Gal/D-Man y de tipo C y *Pteria penguin* específica de D-galactosa y de la familia RBL (*Rhamnose-binding lectin*).

En los artrópodos cabe citar *Megabalanus rosa* específica de D-galactosa y del tipo C y *Tachypleus tridentatus* que contiene una colección de lectinas

de distintos tipos y especificidades entre los que se encuentran lipopolisacáridos y fucosa.

En equinodermos podemos citar *Cucumaria echinata* que contiene varias lectinas de tipo C y de la familia de ricina y especificidades de derivados de D-glucosa y D-galactosa, *Anthocidaris crassispina* con dos lectinas específicas de D-galactosa, de tipo C y de la familia de ricina y *Asterina pectinifera* con una lectina específica de N-Ac-lactosa de tipo C.

En procordados podemos citar las lectinas presentes en *Polyandrocarpa misakiensis*, una lectina específica de D-galactosa y de tipo C y *Botryllus schlosseri* con dos lectinas, una específica de L-ramnosa de la familia RBL y otra específica de D-glucosa).

En peces hay que destacar las diversas lectinas específicas de L-ramnosa presentes entre otros en *Silurus asotus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus leucomaenis* y *Plecoglossus altivelis*, todas ellas pertenecientes a la familia RBL. Hay que resaltar también las lectinas específicas de fucosa presentes en *Morone saxatilis*, *Dicentrarchus labrax* y *Lateolabrax japonicus*, las tres de la familia de lectinas de tipo F (fuclectinas).

## LECTINAS VEGETALES.

Las lectinas de plantas son las más estudiadas (Tsaneva y Van Damme, 2020). Se conocen más de 600 lectinas de plantas. En base a la estructura general, estas lectinas se clasifican en cuatro categorías: *merolectinas*, *hololectinas*, *superlectinas* y *quimerolectinas*. Las *merolectinas* son un tipo de lectinas con un solo sitio de fijación de azúcar y, por lo tanto, debido al carácter monovalente, no pueden aglutinar las células. Las *hololectinas* son las que contienen al menos dos sitios de fijación de azúcar idénticos, pudiendo ser diméricas o multiméricas y participan en la aglutinación de las células. Las *superlectinas* poseen sitios de fijación de azúcar distintos y por ello pueden aglutinar células mediante interacción con glicanos diferentes. Las *quimerolectinas* son proteínas híbridas que contienen una lectina unida covalentemente a otra proteína sin actividad lectina y con algún tipo de actividad catalítica. Un ejemplo de este tipo de quimerolectinas son las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs de "*ribosome inactivating proteins*") tales como las RIPs de tipo II.

En base a los sitios de fijación de azúcar las lectinas vegetales se clasifican en doce familias diferentes: 1) familia de las lectinas homólogas vegetales de *Agaricus bisporus*; 2) familia de las amarantinas; 3) lectinas homólogas a la quitinasa tipo V; 4) familia de la cianovirina; 5) familia de la lectina *Eunonymus europeus* y sus homólogas; 6) familia de la lectina de *Galantus nivalis* y sus homóloga; 7) lectinas con dominios de heveina; 8) jacalinas; 9) familia de lectinas con dominios de lectina de leguminosas; 10) lectinas con dominios de lisina; 11) familia nictaba (*Nicotiana tabacum*; lectinas del floema de las Curcubitaceas); 12) familia de la ricina.

El interés por este tipo de proteínas surge de su enorme utilidad en la investigación sobre los glicoconjugados, de su identificación, aislamiento y caracterización, tanto en glicoproteínas como en glicolípidos, su utilización en la investigación histoquímica y en el estudio de los complejos procesos que tienen lugar en la superficie celular en células y tejidos en estados normal y patológico. Además, está el estudio de su papel biológico como elemento de defensa de la planta contra patógenos e insectos.

Un empuje experimental importante en este tipo de estudios lo dió Irvin Golstein al introducir la cromatografía de afinidad sobre una matriz de dextrano para el aislamiento de la concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (Agrawal y Goldstein, 1965).

El advenimiento de la tecnología del ADN recombinante en la década de los setenta facilitó el análisis secuencial de las lectinas vegetales. La primera lectina cuya secuencia se publicó fue la concanavalina A (Edelman y cols., 1972). Esta fue también la primera lectina cuya estructura se estudió por cristalografía de rayos X de alta resolución y se publicó simultáneamente por los grupos de Edelman y Hardman (Edelman y cols., 1972; Hardman y Ainsworth, 1972). Posteriormente se estudió la lectina aislada de germen de trigo denominada WGA (Wright, 1977).

Como puede apreciarse en la tabla 2, existen distintas especificidades para los distintos tipos de lectinas vegetales. Las que más nos interesan en relación con la presente memoria son las del último grupo, el de la ricina, debido a que es la cabeza de la familia de unas lectinas conocidas como quimerolectinas que poseen la notable propiedad de presentar dos actividades completamente diferentes, una actividad enzimática en la cadena A y una actividad lectina específica de Galactosa/N-Ac-Gal, sialil-galactosa, y galactosa/N-Ac-Gal en la cadena B.

**Tabla 2. Familias de lectinas vegetales.**

<b>Tipo de lectina de plantas</b>	<b>Ligando sacárido típico</b>	<b>Localización en la célula</b>	<b>Estructura del dominio lectina</b>
Lectinas tipo lectina de <i>Agaricus bisporus</i> (ABA)	N-Ac-Glc/N-Ac-Gal, galactosa, antígeno-T	Núcleo, citoplasma	$\beta$ -“sandwich”
Amarantina	N-Ac-Gal, antígeno-T	Núcleo, citoplasma	Hoja de trébol $\beta$
Aglutinina relacionada con la quitinasa (CRA)	N-glicanos con alto contenido de manosa	Vacuola, unidas a membrana	TIM-“barrel” <sup>1</sup>
Cianovirina	Manosa, N-glicanos con alto contenido de manosa	Núcleo	Triple hebra de hoja $\beta$ y hairpina $\beta$
Lectina de <i>Euonymus</i>	Galactosidos, N-glicanos con alto contenido de	Núcleo, citoplasma	ND

<i>europaeus</i> (EUL)	manosa		
Lectina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manosa, oligosacáridos de manosa, N-glicanos de alto contenido en manosa	Vacuola, núcleo, citoplasma o unidas a membrana	Prisma $\beta$
Heveina	Quitina, (N-Ac-Glc) <sub>n</sub> , ácido siálico	Vacuola	Motivo de 30-43 aa rico en Gli y Cys alrededor de cuatro puentes disulfuro
Jacalina	Manosa, N-glicanos de alto contenido en manosa, N-glicano con alto contenido en galactosa	Núcleo, citoplasma, vacuola	Prisma $\beta$
Lectinas de leguminosas	Manosa/glucosa, galactosa/N-Ac-Gal, (N-Ac-Glc) <sub>n</sub> , fucosa, ácido siálico, N-glicanos complejos con alto contenido en manosa	Vacuola, núcleo, citoplasma o unidas a membrana	$\beta$ -“sandwich”
LysM	Quitina, (N-Ac-Glc) <sub>n</sub> , peptidoglicano	Vacuola, núcleo, citoplasma o unidas a membrana	Estructura $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$
Lectina de <i>Nicotiana tabacum</i> (Nictaba)	(N-Ac-Glc) <sub>n</sub> , N-glicanos complejos con alto contenido de manosa	Núcleo, citoplasma	ND
Ricin-B	Galactosa/N-Ac-Gal, sialil-galactosa,	Vacuola, núcleo, citoplasma	Hoja de trébol $\beta$

	Galactosa/N-Ac-Gal		
--	--------------------	--	--

<sup>1</sup> TIM-“barrel”: plegamiento en forma de barril con ocho  $\alpha$ -helices y ocho bandas  $\beta$  paralelas que se alternan a lo largo de la estructura polipeptídica. TIM deriva de la estructura de la triosa isomerasa. N-Ac-Gal: N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; N-Ac-Glc: N-acetilglucosamina; Man: manose; ND, No determinada; ER: retículo endoplásmico.

Un caso especialmente importante son las lectinas nucleocitoplásmicas que han sido muy poco estudiadas hasta el momento.

### **RILS (“RIBOSOME-INACTIVATING LECTINS”).**

Mi experiencia investigadora desde 1992 se ha centrado en el estudio de las quimero-lectinas vegetales en particular las que presentan actividad anti-ribosómica y por ello se conocen como proteínas inactivadoras de ribosomas acrónimo de “*ribosome-inactivating proteins*” (RIP). En esta parte de la memoria hablaré de ellas, en particular de la ricina y de las proteínas de *Sambucus*. Por claridad y comodidad denominaré a estas RIPs como RILs de “*ribosome-inactivating lectins*”.

Las RILs son proteínas de origen vegetal en su mayor parte, aunque existen también RILs de origen bacteriano y de algas y se ha citado también actividad en animales, que además de fijar azúcares sencillos y complejos, provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por ribosomas de mamíferos, hongos, algunas plantas y algunas bacterias (Girbes y cols., 2004).

Las RILs se denominan RIPs de tipo 2 y están formadas por dos cadenas polipeptídicas disimilares, una cadena inhibidora de síntesis de proteínas que se denomina cadena A y una cadena con propiedades de lectina que se denomina cadena B. Las RIPs de tipo 2 pueden estar formadas también por dímeros unidos por fuerzas no covalentes, siendo cada dímero una molécula de dos cadenas polipeptídicas, equivalente a una RIP de tipo 2.

Las lectinas antirribosómicas pueden ser extremadamente tóxicas como ricina, abrina, modeccina, volkensina y viscumina, entre las más conocidas, debido a que pueden internalizarse en las células al reconocer y unirse a receptores de membrana plasmática, entrar al citoplasma, alcanzar el aparato de Golgi y llegar al retículo endoplásmico rugoso, en donde son transferidas al citosol y allí interaccionan con los ribosomas ligados al retículo

endoplásmico rugoso, lo que provoca su acción inhibidora (Girbes y cols., 2004).

En la tabla 3 se presenta la clasificación de las RILs según su estructura y toxicidad, incluyendo algunos ejemplos, como ricina aislada de las semillas del ricino (*Ricinus communis* L.), que es con mucho la lectina toxica más investigada hasta el momento y RILs *no-tóxicas* para células humanas cultivadas y para ratones, en comparación con ricina, como ebulinas y nigrinas (Barbieri y cols., 1993; Stirpe, 2004; Girbes y cols., 2004).

**Tabla 3. Clasificación de las lectinas inactivadoras de ribosomas de origen vegetal en función de su estructura molecular general y toxicidad.**

RILs de tipo 2 A-B	muy tóxicas	ricina, abrina, modeccina, volkensina, viscumina, etc.
	poco tóxicas	nigrina, ebulina
RIPs de tipo 2 (A-B) <sub>2</sub>	algo tóxicas	aglutinina de <i>Viscum album</i> (VAA).
	no tóxicas	aglutinina de <i>Ricinus communis</i> (RCA), aglutinina de <i>Abrus precatorius</i> (APA), aglutinina de <i>Momordica charantia</i> , etc.

### **BLANCO DE LA ACCIÓN INHIBIDORA DE LAS LECTINAS ANTIRRIBSÓMICAS.**

A pesar de que la ricina se descubrió en 1888 por Stillmark (Olsnes, 2004), no fue hasta 1987 cuando se elucidó el mecanismo molecular mediante el cual la ricina y otras RILs ejercen su acción inhibidora sobre la biosíntesis de proteínas por inactivación de los ribosomas.

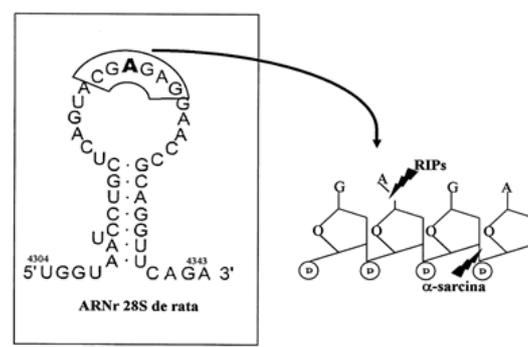
La elongación de las cadenas polipeptídicas es un complejo proceso (Kaczanowska y Rydén-Aulin, 2007; Youngman, y Green, 2007; Wilson y Nierhaus, 2006), que consta de tres etapas parciales (siguiendo el modelo de Watson de los dos sitios funcionales): a) fijación de aminoacil-tRNA al sitio ribosómico aceptor o sitio A, que se encuentra vacío; b) formación del enlace peptídico entre el peptidil-tRNA presente en el sitio ribosómico donador o sitio P, y el aminoacil-tRNA presente en el sitio ribosómico A; c) translocación del nuevo peptidil-tRNA desde el sitio A al sitio P, que

curso con la eyección del tRNA deacilado presente en el sitio P y el avance del ribosoma respecto al ARN mensajero en la longitud de un codon.

La fijación de aminoacil-tARN se produce en forma de complejo ternario con factor de elongación 1 en eucariontes y Tu en procariontes, y GTP con una estequiometría de 1:1:1. En este proceso se hidroliza GTP a GDP y ortofosfato, utilizándose la energía liberada en la separación rápida de los factores de fijación 1 (EF-1) o Tu (EF-Tu). Una vez emplazado el peptidil-tARN en el sitio donador y el nuevo aminoacil-tARN en el sitio aceptor, se produce la formación del enlace peptídico entre el peptidilo y el aminoacilo rindiendo un peptidil-tARN con un aminoácido más y que está localizado en el sitio A. Después se produce la translocación promovida por el factor de elongación 2 (EF-2) en eucariontes y G (EF-G) en procariontes, en ambos casos en forma de complejo binario con GTP. Después de la translocación se produce también la hidrólisis de GTP a GDP y ortofosfato y, al igual que en la etapa de fijación de los factores de fijación, la energía de hidrólisis se utiliza en la liberación de los factores de translocación 2 y G (Girbés y cols., 1996), en forma de complejos binarios que pueden ser estabilizados como complejos cuaternarios con el antibiótico ácido fusídico y ribosomas (Girbés y cols., 1997).

## ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Las RILs actúan como N-glicosidasas sobre el ARN mayor de los ribosomas de mamíferos y, en algunos casos, de plantas, bacterias y hongos (Barbieri y cols., 2004; Girbes y cols., 2004). El mecanismo de acción molecular es similar en todos estos sistemas y transcurre mediante un proceso de depurinación del ácido nucleico (figura 11).



**Figura 11. Blanco molecular de acción de las lectinas antirribosómicas.** estructura secundaria del ARNr 28S de rata, en el cual la adenina (señalada en negrita) se elimina por acción de la RIP.

En los casos bien estudiados, se trata de la eliminación de al menos una adenina (A<sub>4324</sub> en el ARNr 28S de rata) localizada en el centro de un bucle altamente conservado a lo largo de la evolución (figura 12).

<b>Animales</b>	
<i>Rathus norvegicus</i>	UGGU <u>AA</u> UCCUGCUCAGUACGAGAGGAACCGCAGGUUCAGA
<i>Homo sapien</i>	UGGU <u>AA</u> UCCUGCUCAGUACGAGAGGAACCGCAGGUUCAGA
<i>Xenopus laevis</i>	UAGU <u>AA</u> UCCUGCUCAGUACGAGAGGAACCGCACCUUCAGA
<b>Levaduras</b>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UAGU <u>AA</u> UUGAACUCAGUACGAGAGGAACAGCACCUUCGGA
<b>Plantas</b>	
<i>Cucumis melo</i>	CAGU <u>AA</u> UUCAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCGGA
<i>Cucumis sativus</i>	UAGU <u>AA</u> UUCAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCACA
<i>Triticum aestivum</i>	CAGU <u>AA</u> UUCAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCACA
<i>Vicia sp.</i>	UAGU <u>AA</u> UUCAACCUAGUACGAGAGGAACCGUUGAUUCACA
<b>Bacteria</b>	
<i>Escherichia coli</i>	GGGGGGCUGCUCCUAGUACGAGAGGACCGGAGUGGACGCA
<i>Agrobacterinn tumefacilus</i>	CAGGAUCUGUCCCUAGUACGAGAGGACCGGGAUGGACAUA
<i>Streptomyces lividans</i>	GAAGGGCUGUCCCUAGUACGAGAGGACCGGGACGGACGAA

**Figura 12. Secuencia de nucleótidos del bucle altamente conservado del ARNr sobre el que actúan las RIPs.** En la figura se muestran las secuencias homólogas pertenecientes a ribosomas sensibles a la acción de las RIPs. Los nucleótidos subrayados a la derecha de la adenina son complementarios de los situados a su izquierda, de manera que al hibridarse ambas secuencias se conforma el bucle que interacciona con los factores de elongación (Ferrerías y cols., 2000).

La adenina afectada por estas proteínas es adyacente al sitio de actuación de un grupo de ARNasas de hongos altamente específicas, como la  $\alpha$ -sarcina de *Aspergillus giganteus* y las proteínas relacionadas (Endo y Wool, 1982). Este bucle del ARNr, en el que las RIPs ejercen su efecto mínimo de monodepurinación, está implicado en la interacción del ribosoma con los factores de elongación 2 (EF-2) en eucariontes o G en procariontes (Girbes y cols., 2004). La depurinación del ARNr impide al ribosoma fijar estos factores, de modo que se interrumpe la síntesis de proteínas en la etapa de traslocación de las cadenas polipeptídicas (figura 12).

Aunque la eliminación de una adenina es condición necesaria, existen RIPs que eliminan más de una adenina, si bien no se sabe que significación funcional pudiera tener este proceso de multidepurinación (Iglesias y cols., 1993a).

En los últimos años se ha podido determinar que las RIPs pueden actuar sobre ácidos nucleicos no ribosómicos, oligonucleótidos y ADN (Barbieri y

cols., 2004; Girbes y cols., 2004). Debido a ello, la tendencia actual es la denominación de las RIPs como N-glicosidasas y se las clasifica ya como ARNr N-glicohidrolasa, EC 3.2.2.22 (Barbieri y cols., 2004).

## **RICINA.**

Desde tiempos inmemoriales se ha reconocido la toxicidad de las semillas del ricino. Estas semillas son ricas en aceite cuya extracción por expresión aísla el principio tóxico en las tortas de residuo. La planta del ricino se menciona en el Papiro de Ebers (Universidad de Leipzig, Alemania), en el que se recogen diversos usos terapéuticos de preparados del ricino (Franke y cols., 2019). Semillas de esta planta se han encontrado en sarcófagos egipcios y se han utilizado en la medicina clásica egipcia y griega, e incluso se describen en la medicina ayurvédica. En la Biblia, en el libro de Jonás, se describe como éste, camino de Nínive, se protege del sol bajo un arbusto de ricino que hizo crecer Jahvé en una noche. Avicena, en su obra *Urğūza fi 'T-Ṭibb* conocido en árabe como “*Alfiyya*” y en español “*Poema de la Medicina*”, describe en la línea 1.050 del texto al ricino como droga que produce calor y en la línea 1.088 describe al aceite de ricino como medicamento que dilata (Jabary y Salamanca, 1999).

Los principios tóxicos de las semillas de ricino se estudiaron a finales del siglo XIX en el laboratorio de Kobert en Dorpat (Tartu, Estonia). Hermann Stillmark, bajo la dirección de Kobert, probó la naturaleza proteínica del principio tóxico del ricino. En su Tesis Doctoral, leída en 1988, describió el aislamiento y las propiedades tóxicas de la proteína. Stillmark descubrió que la ricina aglutinaba los eritrocitos de la sangre humana y promovía la precipitación de proteínas séricas. En paralelo Hellin, también en su Tesis Doctoral y también bajo la dirección de Kobert, descubrió la abrina en las semillas de *Abrus precatorius* y también que esta poseía las mismas propiedades que la ricina.

Durante los siguientes años se estudiaron estas proteínas con la notabilísima participación de Paul Ehrlich, el padre de la quimioterapia. En 1891 Paul Ehrlich publicó dos importantes trabajos sobre las propiedades inmunogénicas de ricina y abrina que abrieron nuevos cauces al estudio de la inmunidad (Ehrlich, 1881a; Ehrlich, 1881b).

En ellos demostró que la administración de pequeñas cantidades de estas toxinas vegetales producía títulos elevados de antitoxinas que tendían a neutralizarlas. Esta inmunidad era específica, aparecía aproximadamente a los 6 días y era de larga duración (García-Sánchez y cols., 2010). En su

artículo sobre la abrina (Ehrlich, 1881b, pag. 1.219), Ehrlich comenta sobre la diferencia de abrina y ricina y la aparición de antiabrina y antiricina: “*De ello se deduce, sin embargo, que los llamados materiales de partida, que requieren la formación de dos anticuerpos diferentes, son ellos mismos muy diferentes*”.

En estos estudios introdujo el principio de la quimioterapia: “*Corpora non agunt nisi fixata*” (las sustancias no actúan a menos que estén fijadas). Basándose en la actuación de ricina y abrina y de la toxina diftérica de la bacteria *Corynebacterium diphtheriae* propuso que este tipo de toxinas poseían dos elementos, un haptóforo o elemento conductor y un toxóforo o elemento tóxico de manera que la primera etapa en la interacción de estas proteínas con las células blanco era la fijación a su blanco.

Ello le llevó a la formulación del concepto de “*la teoría del proyectil mágico*” (*Zauberkuugel-Theorie; “magic bullet theory”*), base conceptual de lo que ha venido en llamarse modernamente terapia guiada al blanco o “*drug targeting*”, proceso mediante el cual se puede enviar un fármaco específicamente a su blanco o diana sin afectar demasiado a las estructuras adyacentes, lo que sin duda minimiza los efectos secundarios y favorece el diseño de fármacos (García-Sánchez y cols., 2010).

En la parte que nos concierne, hay que resaltar su “*teoría de las cadenas laterales*”. En ella introduce el concepto de ligando-receptor y sienta las bases de la moderna Inmunología e Inmunopatología. Desde entonces se ha investigado en profundidad el modo de acción de ricina, abrina y las proteínas relacionadas, tanto para explicar su toxicidad como por sus aplicaciones en la terapia.

## **LECTINAS ANTIRRIBOSÓMICAS DEL GÉNERO *SAMBUCUS*.**

Los saúcos contienen una colección de proteínas estructurales y funcionales, incluidas las enzimáticas, características de las plantas. De entre las proteínas del saúco investigadas hasta la fecha, son las proteínas inactivadoras de ribosomas y las lectinas las más significativas en estas plantas y de mayor incidencia y aplicación a la biomedicina, y de las que hablaré en apartados posteriores.

Desde antiguo se sabe que el consumo directo de corteza y frutos verdes o brotes de hojas de saúco (*Sambucus*) provoca náuseas y vómitos cuya intensidad es dependiente del grado de madurez de los frutos. Los efectos

pueden ser violentos e incluso llegar a causar serias intoxicaciones gastrointestinales que recuerdan a los provocados por la ingestión de semillas de ricino debido a la presencia de ricina (Olsnes, 2004). Efectos gastrointestinales parecidos, pero menos tóxicos se producen por la ingestión de corteza o brotes de hojas de saúco, que poseen un carácter fuertemente purgante.

Cuando iniciamos nuestros estudios se trataba de definir el patrón de lectinas de *S. nigra* L. que por aquel entonces contaba con cuatro lectinas descritas diferentes, las denominadas SNAI (SNA: *Sambucus nigra* agglutinin), SNAII, SNA III y SNA IV (Barbieri y cols., 1993). Como actividad biológica lo único que se sabía de ellas es que aglutinaban los glóbulos rojos de la sangre. Nuestros estudios iniciales se extendieron también a *S. ebulus* L.

La investigación de posibles actividades inhibitoras de la biosíntesis de proteínas nos llevó a investigar en profundidad ambas plantas con un enfoque de biología molecular, empleando sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas altamente complejos. Para ello nuestro grupo puso a punto diversos sistemas ribosómicos dirigidos por mensajero endógeno, algunos de ellos por primera vez, en especial los de plantas y algunas bacterias (Girbes y cols., 2004).

La nigrina b y la ebulina l fueron las primeras lectinas antirribosómicas descubiertas en el género *Sambucus*, ahora clasificado dentro de la familia *Adoxaceae* (Ran y cols., 2020). En la Tabla 4 se incluyen las lectinas con actividad antirribosómica descubiertas en *Sambucus*. En casi todos los casos se trata de isoformas parecidas que en algún caso difieren únicamente en algún aminoácido. No obstante, se aprecian cambios en la actividad enzimática que en algunos casos son notables.

### ***Ebulina l.***

Esta lectina antirribosómica se encuentra en diversas isoformas con pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos, en función de la parte de la planta de la que se aísla. La caracterización reveló una mucho menor toxicidad que la ricina y la abrina, que en ese momento eran los paradigmas de las quimerolectinas tóxicas (Girbés y cols., 1993b; Girbés y cols., 2004). Ebulina l junto con nigrina b constituyen un nuevo tipo de proteínas de la familia de la ricina, pero con una toxicidad 1.000-5.000 veces menor. Para su aislamiento se utilizó la cromatografía de afinidad en

matriz de Sepharosa-6B tratada con ácido clorhídrico, proceso que libera restos de galactosa terminales que unen la lectina. Posteriormente las lectinas que se fijan específicamente pueden ser eluidas con D-galactosa o lactosa y ser luego resueltas por cromatografía de filtración en gel.

Ebulina 1 (forma presente en las hojas) inhibe la biosíntesis de proteínas llevada a cabo en lisados de reticulocitos de conejo con una  $IC_{50}$  de 0,15 nM, cerca del valor para la ricina en las mismas condiciones ( $IC_{50}$  de 0,1 nM). Ebulina 1 inhibe también sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas de conejo y rata con una actividad similar (Girbes y cols., 1993).

Uno de los grandes contrastes existentes entre el nuevo tipo de quimerolectinas encabezado por ebulina y nigrina, y que las diferencia de las RIPs monocatenarias sin actividad lectina, es que no son activas sobre los ribosomas de plantas modelo, *Vicia sativa* L., *Cucumis sativus* L. y *Triticum aestivum* L., los dos primeros puestos a punto por primera vez por nuestro grupo de investigación.

**Tabla 4. Lectinas antirribosómicas de *Sambucus*\***. La letra a la derecha de la proteína significa la fuente de la que se aísla la lectina (tipo A-B).

Especie	Tejido	Proteína	Mr aparente	
			A chain	B chain
<i>S. ebulus</i>	Hojas	ebulin 1	26000	30000
	Frutos	ebulin f	26000	30000
	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 (A-B) <sub>2</sub>	30000	30000
	Corteza	SNA I' (A-B) <sub>2</sub>	32000	35000
	Hojas	nigrin 11	26000	34000
	Hojas	nigrin 12	26000	34000

	Frutos	nigrin f	26300	31600
	Semillas	nigrin s	26300	31000
<i>S. racemosa</i>	Corteza	racemosin	26000	32000
<i>S. sieboldiana</i>	Corteza	sieboldin b	27000	33000
	Corteza	SSA (A-B) <sub>2</sub>	32000	34000

\*Todas las lectinas antirribosómicas son del tipo A-B excepto SNA I, SNAI' y SSA que son del tipo (A-B)<sub>2</sub>.

Otras isoformas de ebulina son ebulina f, presente en frutos verdes, y ebulina r1 y ebulina r2, presentes ambas en la corteza del rizoma de *S. ebulus* L. (Girbes y cols., 2004). Estas isoformas tienen casi la misma secuencia de aminoácidos. No obstante, los pequeños cambios provocan cambios significativos en la actividad enzimática y en la antigenicidad.

La ebulina I está compuesta por dos cadenas polipeptídicas A (26 kD) y B (30 kD). La cadena A es la que presenta actividad enzimática responsable de la inhibición de la biosíntesis de proteínas, mientras que la cadena B presenta actividad lectina que a 51 µg/ml es capaz de aglutinar completamente eritrocitos humanos. La cadena A tiene homología con las RIPs monocatenarias de la familia *Cucurbitaceae* mientras que la cadena B tiene homología con la cadena B de la ricina y las merolectinas y homolectinas no antirribosómicas de *Sambucus*, especialmente SNA II y SNA IV (Ferrerías y cols., 2000).

Una característica diferencial entre ebulina y ricina, y que es compartida por la nigrina, es la baja toxicidad que presenta la ebulina sobre células animales en cultivo y animales de experimentación, ratones y ratas (Svinth y cols., 1998; Stirpe y Battelli, 2006). La IC<sub>50</sub> de ebulina I sobre células HELA es 64.3 nM (60.000 veces superior que la IC<sub>50</sub> de la ricina). La IC<sub>50</sub> de ebulina I a ratones es de 2 mg/kg de peso corporal (administración intraperitoneal), frente a la de ricina que es de 8 µg/kg.

La isoforma ebulina f se ha aislado de frutos verdes de *S. ebulus* L. y está ausente en los frutos maduros y es algo más activa que la ebulina I sobre los ribosomas de lisados de reticulocitos de conejo y también más tóxica que ebulina I sobre células HeLa (Citores y cols., 1998). Como hecho notable respecto a la isoforma de hojas puede decirse que se polimeriza mediante enlaces disulfuro dando lugar a agregados denominados poliebulina y que retiene completamente la actividad inhibidora de la

síntesis de proteínas y la capacidad aglutinante de glóbulos rojos (Girbes y cols., 2004).

### ***Nigrina b.***

Esta lectina antirribosómica se encuentra también en diversas isoformas en función de la parte de la planta de la que se aísla. Nigrina b fue la primera que se detectó en *S. nigra* L. y se caracterizó gracias a la utilización de una matriz cromatográfica como la Sepharosa 6B tratada con ácido, que tiene la propiedad de fijarla por afinidad (Girbes y cols., 1993).

Al igual que ebulina I, nigrina b inhibe la biosíntesis de proteínas en sistemas acelulares de biosíntesis de proteínas de mamíferos y no lo hace con los de plantas. Nigrina b es estructural y funcionalmente similar a la ebulina I, pero menos tóxica, y a su vez es 1.500 veces menos tóxica para los ratones que la ricina (Girbes y cols., 2004; Stirpe y Battelli, 2006). La nigrina b se acumula más en primavera y verano y casi desaparece en invierno y se acumula más en la corteza secundaria (Tejero y cols., 2015).

La corteza de *S. nigra* contiene también una proteína relacionada con la nigrina b y las lectinas relacionadas con nigrina b, pero a diferencia de ellas ha perdido la capacidad de fijar azúcares por lo que no tiene actividad hemoaglutinante y no se le considera como lectina (de Benito y cols., 1997). La actividad molecular sobre el ribosoma es la mayor conocida en este tipo de enzimas ( $IC_{50} = 0.3 \text{ pM}$ ). La ausencia de actividad lectina, probablemente por alguna alteración en el sitio de fijación de azúcares, la convierte en completamente inocua desde el punto de vista tóxico para células animales en cultivo y ratones. Esta proteína posee también actividad multidepurinante del ARN y permite la conversión de ADN superenrollado a las formas circular-relajada y lineal; el contenido de la corteza en nigrina b básica se encuentra en los 0,9 g/kg en septiembre-octubre lo que la coloca entre las RIPs más abundantes (de Benito y cols., 1997).

Los frutos verdes de *S. nigra* L. contienen nigrina f, una isoforma de frutos de nigrina b, y SNA IVf (lectina monomérica), antes conocida como SNA III (Girbes y cols., 1996). SNA IVf parece ser la proteína mayoritaria en frutos y es una forma truncada de la nigrina f (Van Damme y cols., 1997; Citores y cols., 1996). La maduración conlleva un cambio dramático en el perfil de lectinas, así mientras que casi desaparece la nigrina f, la concentración de SNA IVf se mantiene aproximadamente constante (Citores y cols., 1996).

Las proteínas de *S. ebulus* L. presentan también variación estacional y dependiente del grado de madurez de los frutos. La ebulina f presente en los frutos verdes desaparece totalmente en los frutos maduros. La ebulina f es capaz de polimerizarse en conjunción con SELfd mientras que la de hojas no puede hacerlo con la correspondiente lectina SELld presente en las hojas (Citores y cols., 1998). Este hecho puede explicar la enorme toxicidad de los frutos verdes de *S. ebulus* L. que desaparece cuando maduran y desaparece la lectina, o bien si se cuecen y se inactiva la misma. Se ha encontrado que, en los frutos muy maduros, ebulina f, de hecho, desaparece por completo (Citores y cols., 1998). Tradicionalmente se ha asumido que se han producido casos de envenenamiento de personas por ingestión de frutos de *S. ebulus*, probablemente verdes o poco maduros.

### **SNA I.**

Esta lectina descubierta por el grupo de Peumans fue la primera que se detectó en el género *Sambucus* e inicialmente se describió como una homolectina dimérica de subunidades con valores de Mr 35.000 y 37.000 unidas por puentes disulfuro (Broekaert y cols., 1984). Se trata de una glicoproteína que reconoce de manera específica la parte N-Ac-Neu5( $\alpha$  2-6)Gal or N-Ac-Gal en glicoconjugados (Shibuya y cols., 1987a). Esta especificidad para los terminales de ácido siálico ha llevado a ser utilizada en numerosos estudios sobre glicoconjugados (Shibuya y cols., 1987b) y en la detección de células tumorales que expresan dichos terminales en los glicogonjugados de membrana (Dall'Olio y cols., 1991). Con esta lectina se ha construido también un biosensor para la detección selectiva del antígeno sialil-Tn asociado al cáncer (Silva y cols., 2014).

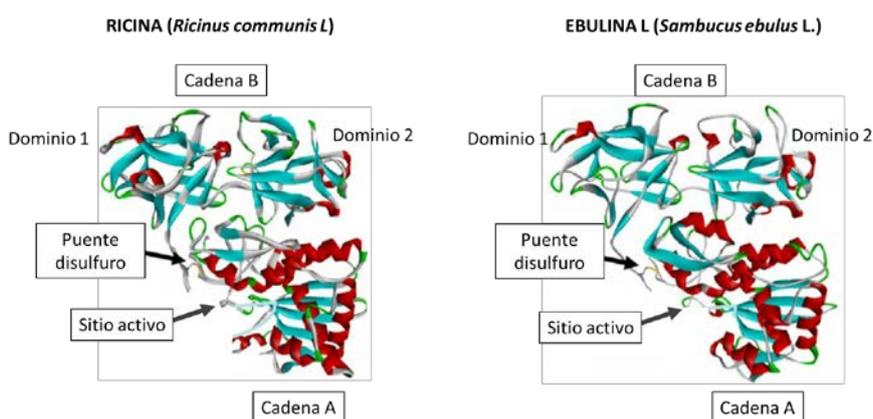
Posteriormente, como consecuencia de nuestros trabajos con las nuevas proteínas inactivadoras de ribosomas aisladas del género *Sambucus* y después de una sugerencia nuestra de que las preparaciones de la lectina de corteza de *Sambucus nigra* L. tenía actividad antirribosómica además de lectina, se reinvestigó esta proteína y se pudo comprobar que en realidad es una proteína inactivadora de ribosomas con actividad lectina (quimerolectina) con estructura básica (A-B)<sub>2</sub> de Mr 120.000 (Girbes y cols., 2004). El monómero A-B se dimeriza mediante puentes disulfuro a través de las subunidades B para dar la estructura (A-B)<sub>2</sub> que a su vez puede volver a dimerizarse por puentes de hidrógeno para dar el octámero [(A-B)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> de Mr 240.000.

## ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE EBULINA L Y ANÁLISIS COMPARADO CON RICINA.

Estudios recientes han permitido elucidar las estructuras de los genes que codifican a ebulina I (Pascal y cols., 2001) y nigrina b (Van Damme y cols., 1996) y compararlos con el que codifica a la ricina (Lord y cols., 1994). Estos estudios indican que muy probablemente, nigrinas y ebulinas se sintetizan y se procesan siguiendo el modelo encontrado para la ricina. El análisis de las secuencias de los genes correspondientes ha permitido determinar la secuencia proteica precisa de dichas lectinas. En el caso de la ebulina I además se ha determinado la estructura molecular por rayos X, a la escala de 2.8 Å, y encaja perfectamente con la determinada a partir de la secuencia del gen correspondiente (Pascal y cols., 2001). Ello ha permitido también el estudio de la interacción estructural comparada de los derivados de galactosa con los sitios de unión en la cadena B de la ebulina y de la ricina.

En la figura 13 se muestran las estructuras tridimensionales de ebulina I y ricina obtenidas por difracción de rayos X de cristales de ambas proteínas (Ferrerías y cols., 2011). Los datos cristalográficos indican que la ebulina I cristaliza en los sistemas ortorrómbico y trigonal. El análisis comparado de las estructuras de la ebulina I y de la ricina muestra que las distribuciones espaciales de los segmentos polipeptídicos son similares en las dos proteínas.

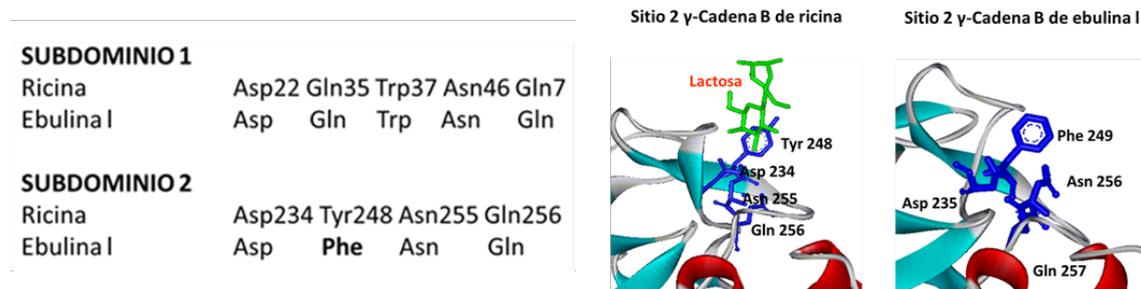
La ebulina consta de las dos cadenas A y B unidas por un puente disulfuro intercatenario y contiene porciones de  $\alpha$ -hélice, hoja plegada  $\beta$  y cadena en conformación estadística. La cadena B muestra los dos dominios fundamentales de fijación de azúcares  $1\alpha$  y  $2\gamma$ . La cadena A muestra el centro activo que está muy conservado en todas las RIPs tanto de una como en las cadenas A de las de dos cadenas. Por lo tanto, en términos generales la estructura de la ebulina I es como la ricina. La diferencia más notable está en los subdominios de fijación de azúcar.



**Figura 13. Estructura tridimensional de ebulina I y ricina determinadas por difracción de rayos X en cristales de las proteínas y las secuencias de aminoácidos.** (adaptada de Ferreras y cols., 2011).

Las cadenas B de las lectinas antirribosómicas es la responsable de la conducción de la proteína completa a través del citoplasma (Svinth y cols., 1998). Dichas cadenas poseen dominios específicos de interacción con los azúcares. La cadena B de la ricina posee dos dominios estructurales, cada uno con tres subdominios denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , de manera que existen 6 subdominios  $1\alpha$ ,  $1\beta$ ,  $1\gamma$ ,  $2\alpha$ ,  $2\beta$  y  $2\gamma$ , de los cuales solo los subdominios  $1\alpha$  y  $2\gamma$  tienen capacidad contrastada por cristalografía de rayos X de fijar galactósidos (Ferreras y cols., 2011).

Los aminoácidos de los subdominios de ricina y ebulina activos en fijación de galactosa de lactosa y galactósidos presentes en las cadenas B de ebulina I y ricina, se indican en la figura 14.



**Fig. 14. Dominios de los sitios de fijación de azúcar (izquierda) y comparación del subdominio  $2\gamma$  fijador de lactosa y galactósidos de ricina y ebulina I (derecha).** En el dominio  $2\gamma$  de alta afinidad de la ricina se permite la formación de los puentes de hidrógeno entre los amino ácidos del subdominio y la mitad galactosa de la lactosa y los galactósidos. En el dominio de la ebulina la tirosina se substituye por una fenilalanina. (adaptada de Ferreras y cols., 2011).

En la estructura del subdominio 2 la substitución de tirosina (Tir) por fenilalanina (Fen) es responsable de la menor afinidad por galactosa de ebulina que ricina (Pascal y cols., 2001). La ausencia de un grupo hidroxilo en el subdominio  $2\gamma$  afecta al establecimiento de puentes de hidrógeno entre la proteína y el azúcar dentro del subdominio que determinan la reducción de la afinidad por galactósidos y por lo tanto la capacidad de interaccionar con receptores de tránsito a través del retículo endoplásmico como la ricina. De esta diferencia parece derivarse la baja toxicidad *in vivo* de ebulina en comparación con la ricina.

En nuestro laboratorio también se obtuvieron las secuencias de los aminoácidos de dos lectinas obtenidas de *S. ebulus*, relacionadas con la cadena B de la ebulina, una monomérica denominada SELlm (Rojo y cols., 2003) y la otra dimérica denominada SELld (Citores y cols., 2008). En la figura 15 se presentan alineadas las secuencias de aminoácidos de estas lectinas junto a ebulina 1 y ricina. Ebulina 1 presenta una homología de secuencia de aminoácidos con las lectinas SELlm, SELld y ricina, muy notables. Como puede apreciarse existe una importante identidad entre las proteínas de *Sambucus* que deriva de un ancestro común (Ferrerías y cols., 2011), y una buena homología secuencial entre estas y la ricina.

SELlm	1	MRVVSGAMLH-LYIVVFAICSVGIQG----- <sup>▼</sup> -----IDYPSVSFNWAG	
SELld	1	MRVVAAMLG-LYIVVVAICSVGIQG-----RDYPSVSF----	
Ebulin 1	1	MRVVKAAMLY-LHIVLAIYSVGIQG-----IDYPSVSFNLAG	
Ricin	1	MKPGGNTIVIMYAVATWLCFGSTSGWSFTLEDNNIFPKQYPIINFTTAG	
SELlm	38	ALSATYRDFL-----	
SELld		-----	
Ebulin 1	38	AKSTTYRDFLKNLRDRVATGTYEVNGLPVLRRRESEVQVKNRFVLVRLTNY	
Ricin	51	ATVQSYTNFIRAVRGRLLTTGADVREHIVPLPNRVGLPINQRFILVELSNH	
SELlm	48	-----RMPNVFVGEDIKYNDGVTTYTSASETGNIIGRDGLCVDVR	20
SELld	34	-----KFNAIRMPHDFVGEDNKFNDGE-----RFTRQIIGRDGLCVDAR	20
Ebulin 1	275	VATKTTHNAIRMPHVLVGEDNKFNDGETCAIPAPFTRRIVGRDGLCVDVR	26
Ricin	295	APPPSSQFSLLRPVV---PN-FNADV-CMDPEP-IVRIVGRNGLCVDVR	24
		*	
SELlm	88	NGYDTDGTPIQLWPCGSQR--NQRWTFYEDGTIQSMRKCMTANGLNSGSY	68
SELld	73	TGCD-----IQLRPCGSQT--SQWTFYEDGTIRSMGKCMTANGFNSGSY	63
Ebulin 1	325	NGYDTDGTPIQLWPCGTQR--NQWTFYNDKTIRSMGKCMTANGLNSGSY	74
Ricin	339	DGRFHNGNAIQLWPKSNTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVY	74
		* * * *	
SELlm	136	IMIFNCSTAAEDA <sup>▲</sup> IKWEVTIDGSIINPSSGLVMTAPRAASRTLLLENNI	118
SELld	116	IMIFDCSSATENATKWEVTIDGSIINPSSGLVMTAPSGASGTTLVLENNI	113
Ebulin 1	373	IMITDCSTAAEDATKWEVLIDGSIINPSSGLVMTAPSGASRTLLLENNI	124
Ricin	389	VMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIINPRSSSLVLAATSGNSGTTLTVTQJNI	124
SELlm	186	LAASQGWTVSNDIQPNVTSIVGYKEMCLQANGENNNVWMENCDCG-SVQQQ	167
SELld	166	LAASQGWTVSNDVQPNVTLVGVYNNMCLKANGENNKVWMENCVSTSVQQQ	163
Ebulin 1	423	HAASQGWTVSNDVQPIATLIVGYNEMCLQANGENNNVWMECDVTSVQQQ	174
Ricin	439	YAVSQGWLPTNNTQPFVTTIVGLYLCLQAN--SGQVWIEDCSSEKAEQQ	172
SELlm	235	WALFGDRTIRVNSSRGLCVTSNGYVSKDLIIILKCOGLAS-QRWLFNSDG	216
SELld	216	WALFGDRTIRVNSSRDCLTSRGYVSKDIIISFTCQGLPT-QRWFFKSDG	212
Ebulin 1	473	WALFDDRTIRVNSSRGLCVTSNGYVSKDLIVIRKCOGLAT-QRWFFNSDG	223
Ricin	487	WALYADGSIRPQQNRDCLTSDSNIRETVVKILSCGPASSQQRWFFKNDG	222
SELlm	284	SVVNPNTTLVMDVRRSNVSLREIILYPSTGNPNQKWRTEVLPS	259
SELld	265	TIVNPNTTLVMDVKGS <sup>◆</sup> SVSLREIILYPVSGSSNQWKTEVLPS	255
Ebulin 1	522	SVVNLKSTRVMDVKESDVSLQEVIIIPATGNPNQQRWTPQVPI	266
Ricin	537	TILNLYSGLVLDVSRASDPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF---	262
		* * *	

**Figura 15. Secuencias de aminoácidos de las lectinas SELlm (monomérica), SELld (dimérica) y segmentos comparables de ebulina 1 y ricina.** Se han introducido huecos para optimizar la identidad de secuencias. Los aminoácidos idénticos en las 4 proteínas se indican en negrita. El sitio de hidrolisis del péptido señal está marcado con una flecha. La secuencia N-terminal de SELlm está subrayada con una línea fina y el punto de partida está señalado con cabeza de flecha. Las líneas de puntos indican la secuencia de

aminoácidos determinada por análisis de masas MALDI-TOF de péptidos trípticos. Los residuos clave de los sitios de fijación de azúcares se marcan con asteriscos y la tirosina en el dominio 2 $\gamma$  están marcados por una estrella hueca. Los sitios de glicosilación están marcados por una línea gruesa. Los números de la izquierda se refieren a los precursores mientras que los de la derecha se refieren a las cadenas B de SELlm, SELld, ebulina I y ricina. (*adaptada de Citores y cols., 2008*).

## **ASPECTOS MOLECULARES DE LA INTERNALIZACIÓN Y DEL TRÁFICO INTRACELULAR DE RICINA.**

Los receptores de la ricina en la membrana plasmática son de dos tipos, glicanos de galactosa/galactosamina terminales y glicanos de manosa terminal. La unión de ricina a estos receptores determina la cantidad de toxina que es derivada a la degradación lisosómica. Los primeros experimentos realizados para determinar los procesos moleculares asociados a la internalización de la ricina indicaron que esta se producía vía vesículas recubiertas de clatrina dependientes de la dinamina que es una proteína con actividad GTPasa que se requiere para la invaginación de dichas vesículas desde la membrana plasmática (Van Deurs, y cols., 1985). Posteriormente se descubrió que la internalización de ricina se producía también por una vía independiente de clatrina (Spooner y Lord, 2015).

Las células que expresan la molécula de dinamina normal son sensibles a la internalización de transferrina y de toxina diftérica y a la intoxicación por ricina, mientras que las que expresan una mutación dominante negativa de dinamina pierden la capacidad de internalización de transferrina y la internalización y toxicidad de la toxina diftérica, pero no la toxicidad de la ricina (Simpson y cols., 1998; Spooner y Lord, 2015). Ello claramente indica que la ricina se internaliza por dos vías, una dependiente de clatrina y otra independiente de ella.

Los estudios más importantes se han realizado en levaduras y células humanas (Sowa-Rogozińska y cols., 2019). En levaduras se necesita el complejo formado por las proteínas Syn8p y Snc1p para la captación de proteínas en forma de vesículas y su transporte al endosoma (Becker y cols., 2016). La fusión de las vesículas de los endosomas tempranos con el aparato de Golgi requiere el complejo de las proteínas Sso1p y Snc2p (Lewis y cols., 2002).

Después de la endocitosis la ricina contenida en las vesículas se dirige a los endosomas tempranos. Se ha calculado que la mayor parte de ricina captada (aprox. 95%) es reciclada a la membrana plasmática en forma intacta, un aparte es degradada en el lisosoma y el resto es canalizada al aparato de Golgi (Battelli y cols., 2004). La mayor parte de la ricina

degradada en los lisosomas es la internalizada a través de los receptores de manosa (Magnusson y cols., 1993).

La interacción del endosoma temprano que permite la transferencia de la ricina al aparato de Golgi-*trans* es un proceso complejísimo y requiere la participación de numerosos factores entre los que se encuentran, en células de mamífero, las proteínas Rab6 y sus isoformas, la SNARE Sintaxina 16 (STX16), TRAP, COG y derlina 1, además están involucradas otras moléculas como el colesterol, el AMPc, la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) de tipo II y las nexinas SNX2 y SNX4 y  $Ca^{2+}$  (Sowa-Rozinska y cols., 2019). Posteriormente, la ricina es transferida al retículo endoplásmico rugoso (RER) mediante vesículas derivadas del aparato de Golgi. Para la fusión de ambas estructuras son necesarias calreticulina, Ergic2 y dos proteínas en forma de complejo Erv46p y Erv41p que son importantes para la fusión de las membranas del aparato de Golgi y las del RER (Sowa-Rogozińska y cols., 2019).

La translocación de la ricina al citosol requiere la participación de una protein-disulfuro isomerasa (PDI) que reduce el puente disulfuro entre las cadenas A y B y que se incrementa notablemente por la acción del enzima tiorredoxina reductasa (TrxR), tiorredoxina (Trx), NADPH y tiorredoxina de transmembrana (TMX). Participa también el sistema glutarredoxina-glutación reductasa (Holmgren, 2000). Una vez reducida la ricina, la cadena A libre, sufre procesos de deplegamiento y replegamiento poco conocidos aún, pero en los que están implicadas las chaperonas clásicas Hsp 40, 70, 90 y 100. La cadena A de la ricina utiliza el sistema ERAD (*ER-associated degradation*) pero, a diferencia de los substratos que son degradados por el proteosoma, la cadena A se mantiene intacta y es retro-translocada al citosol.

Entre las proteínas que participan en todo el proceso de retro-translocación al citosol, están las chaperonas con actividad lectina que son calnexina y calreticulina y las lectinas de la familia EDEM, 1,2,3. Estas lectinas se unen a glicanos presentes en las cadenas de la ricina y facilitan la reordenación necesaria para que la cadena A interaccione con los tres tipos de translocones del retículo endoplásmico rugoso identificados en las células de mamífero, el complejo sec61, las derlinas, las ubiquitin quinásas en particular HRD1 y su cofactor SEL1L (Sowa-Rogozińska y cols., 2019).

Después de la retro-translocación de la cadena A de la ricina al citosol, la proteína debe plegarse de nuevo a su forma activa para ejercer sus efectos. Esto lo puede hacer de tres maneras: unión a chaperonas citosólicas, plegamiento mediado por el ribosoma e interacción con factores

ribosómicos y proteosómicos. En células de mamífero la mayor parte de las moléculas escapan a la degradación por el proteosoma 26S y retienen la conformación activa que les permite interactuar con los ribosomas mediante unos procesos muy complejos no bien entendidos todavía (Sowa-Rogozinska y cols., 2019).

La interacción de la cadena A de la ricina con el ribosoma se establece a través de las proteínas ribosómicas P0, P1 y P2 presentes en el tallo de la subunidad ribosómica mayor 60S. Estas proteínas forman un pentámero de estructura P0/(P1-P2)<sub>2</sub> (Lee y cols., 2012). Esta interacción permite a la cadena A de la ricina colocarse sobre el bucle del ARNr blanco de la toxina que resulta depurinado mediante la escisión de la A<sub>4324</sub> del 28S ARNs, el denominado bucle de la  $\alpha$ -sarcina (Girbes y cols., 2004).

## **COMPARACIÓN DEL TRÁNSITO INTRACELULAR DE RICINA Y EBULINA.**

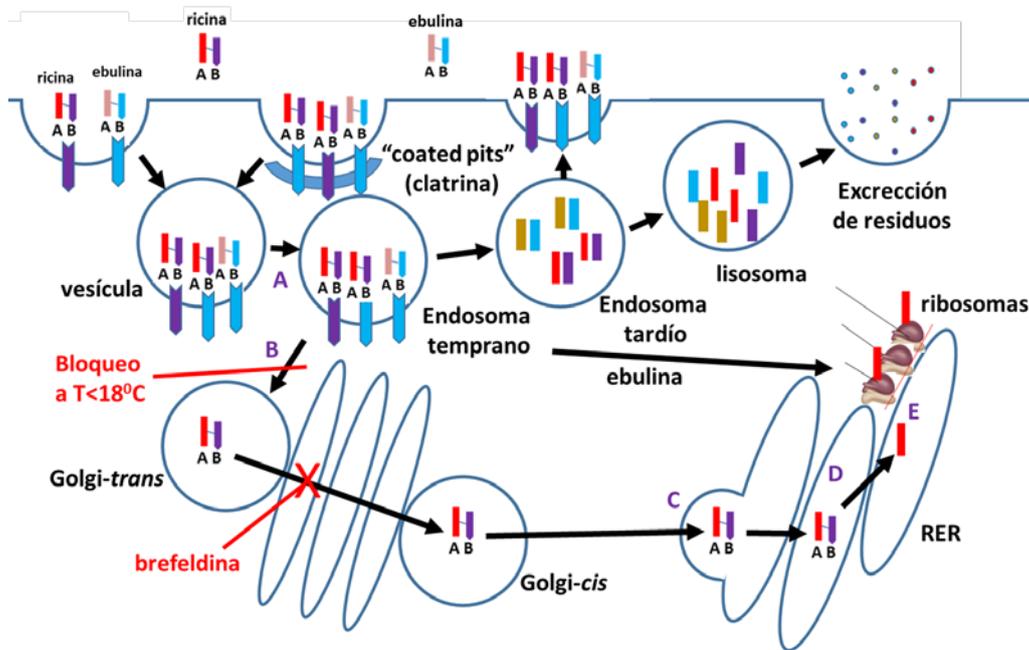
Como ya hemos comentado, las lectinas antirribosómicas ricina, abrina y proteínas relacionadas, son extremadamente tóxicas para las células intactas debido a la presencia de la cadena B lectina translocadora, que es capaz de internalizar al dímero que posteriormente entra en el citosol y se disocia liberando la cadena A, que es la especie activa sobre los ribosomas (Hartley y Lord, 2004; Sandvig y Van Deurs, 1999).

Como hemos visto, la diferencia entre ricina y ebulina reside únicamente en la cadena B, o cadena conductora, que es responsable de la interacción de estas RIPs con los receptores de membrana plasmática (Svinth y cols., 1998; Pascal y cols., 2001). De hecho, estudios cinéticos de captación dependiente de fase fluida y de toxicidad de la cadena A aislada de la ricina indican que ambos procesos son idénticos a los implicados en la internalización de las RIPs monocatenarias sin actividad lectina (Svinth y cols., 1998), y que la falta de toxicidad de ebulina puede ser debida a cambios en la cadena B respecto a la cadena B de la ricina, que disminuyen notablemente su afinidad por los galactósidos (Pascal y cols., 2002).

La investigación comparada de ebulina con ricina revela que estas proteínas siguen una ruta intracelular distinta. En la figura 16 se muestra un modelo hipotético general para el tráfico intracelular de estas proteínas. Las moléculas de ricina se internalizan y después pasan por compartimentos endosómicos sensibles al NH<sub>4</sub>Cl. Desde allí la ricina atraviesa compartimentos sensibles a temperatura que se bloquean a 18<sup>0</sup>C. Finalmente, una pequeña parte de la ricina es translocada en el aparato de Golgi en un

proceso que es sensible a la brefeldina, droga conocida por su efecto desorganizador del aparato de Golgi (Battelli y cols., 1997).

Ebulina se internaliza y se trasfiere a los endosomas. A partir de aquí la ruta seguida por la ebulina es diferente a la seguida por la ricina ya que los efectos antirribosómicos obtenidos a altas concentraciones son independientes de temperatura e insensibles a brefeldina. Prácticamente todas las moléculas de ebulina son transportadas desde los endosomas hacia los lisosomas, donde se degradan (Battelli y cols., 1997; Battelli y cols., 2004).



**Figura 16. Esquema general de las rutas intracelulares seguidas por ricina y ebulina.**

Girbes (2007). Premio Julio Moral de la Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid (*adaptada de Battelli y cols., 1997 y 2014 y Sowa-Rogozińska y cols., 2019*). Las moléculas participantes en cada etapa y citadas en el texto son: A) Syn8p, Snc1p, Snc2p; B) Rab6, colesterol, AMPc, PKA, calcio; C) calreticulina, Ergic; D) PDI, TrxR, Trx, NADPH, TMX; E) Grp94, EDEM1,2,3, Sec61, derlinas.

Solo a concentraciones 4 o 5 órdenes de magnitud superiores a la ricina se acumulan suficientes moléculas de ebulina en los endosomas como para que se produzca su translocación espontánea a favor de gradiente desde el endosoma al citosol. La razón de la diferente ruta intracelular seguida por la ricina y ebulina estriba en que los receptores pueden ser diferentes (Muñoz y cols., 2001).

# EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS LECTINAS.

## ACTIVIDAD APOPTÓPICA.

Algunas lectinas de plantas producen efectos apoptóticos y autofágicos, cómo ejemplo tenemos las lectinas de *Morus alba* y de *Bauhinia forficata*, que provocan activación de las caspasas, 3 y 9 respectivamente, en la línea celular MCF-7 derivada de cáncer de mama humano y la concanavalina A que activa la apoptosis mitocondrial en células de melanoma (A375) y de hepatocarcinoma (HepG2), también mediante la activación de caspasas (Hirabayashi y cols., 2013; Jiang, 2015).

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Las lectinas pueden afectar al crecimiento y la infección por bacterias patógenas, parásitos y virus. El mecanismo consiste en interferir con el bloqueo de la entrada, la infección, la adhesión y la migración bacteriana. La interacción se produce a través de los ácidos teicóicos, los peptidoglicanos, lipopolisacáridos y ácidos murámicos y N-acetil-murámicos. Un caso particular son las lectinas de leguminosas que poseen actividad contra patógenos como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus* (Coelho y cols., 2018).

Las lectinas presentan también actividad antiviral. Varias lectinas reconocen la glicoproteína gp120 presente en la cubierta del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1). Entre ellas cabe distinguir las lectinas de leguminosas, banana, lenteja, ortiga y tabaco. Algunas se fijan con suficiente afinidad cómo para inhibir la replicación del virus (François y Balzarini, 2012). Se ha descrito que determinadas lectinas son también activas frente a coronavirus (Keyaerts y cols., 2017). La cianovirina es una lectina producida por la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum* que presenta una fuerte actividad viricida sobre varios virus incluido el HIV-1 mediante la interacción de la lectina con las proteínas gp120 y gp41 (Coelho y cols., 2018) y el virus del Ebola mediante oligosacáridos presentes en la superficie celular (Garrison y cols., 2014).

# **APLICACIONES DE LAS LECTINAS**

Las lectinas están implicadas en numerosos procesos biotecnológicos y poseen un gran número de aplicaciones (Coelho y cols., 2017). Vamos a considerar brevemente algunas de las aplicaciones más importantes.

## **APLICACIONES EN AGRICULTURA.**

Las investigaciones más recientes indican que las lectinas están implicadas en numerosos procesos biológicos de las plantas, en particular aquellos relacionados con la respuesta al estrés abiótico, al estrés biótico y a la simbiosis.

## **IMPLICACIONES DE LAS LECTINAS EN ESTRÉS ABIÓTICO Y DESARROLLO.**

El estrés de las plantas se define como una condición que conduce a cambios en los procesos de crecimiento, rendimiento y adaptación. Ejemplos del estrés abiótico son la resistencia a la sequedad y a la temperatura y a la disponibilidad de nutrientes. Las plantas han desarrollado unos complejos sistemas de respuesta a estas circunstancias ambientales cambiantes con las fluctuaciones del clima.

Tanto los procesos adaptativos y de selección, así como la manipulación biotecnológica de los elementos relacionados con el tipo de respuesta ha permitido la obtención de plantas con mejores respuestas a los diferentes tipos de estrés. En los últimos años se ha podido comprobar la implicación de la inducción de lectinas, así como de quinasas parecidas a los receptores de lectinas en distintos procesos de estrés, como el salino, la sequedad, el frío y la respuesta al ácido abscísico (Jiang y cols., 2010).

La manipulación biotecnológica del contenido y tipo de lectinas en las plantas permite la creación de especies con mejores características de respuesta a los diferentes tipos de estrés abiótico. No obstante, hay que resaltar la hostilidad de parte de la opinión pública contra los organismos modificados genéticamente.

## **LECTINAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS BIÓTICO.**

El papel protector como insecticida de varias lectinas se ha investigado en los últimos años. En particular, las lectinas relacionadas con la lectina de *Galanthus nivalis*, las lectinas de leguminosas, heveinas, jacalinas y las lectinas de *Sambucus*, entre otras. Esta actividad insecticida se ha asignado a la fijación y toxicidad de estas lectinas a las células epiteliales del tubo digestivo, además de efectos específicos sobre la captación de nutrientes y la consecuente deficiencia nutritiva con efectos en el crecimiento, desarrollo y fecundidad (Vandenborre y cols., 2011). Diversas lectinas poseen también actividad antifúngica, pero menor que otras proteínas protectoras como las tioninas y las defensivas.

Mediante tecnología de ADN recombinante se ha conseguido sobreexpresar genes de lectinas que tienen actividad insecticida y se ha visto que estas plantas transgénicas aumentan su resistencia frente a los insectos, probablemente mediante los mecanismos descritos basados en la interacción de las lectinas con las células epiteliales del intestino del insecto (Van Holle y Van Damme, 2018).

# **APLICACIONES DE LAS LECTINAS COMO HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA GLICOBIOLOGÍA.**

## **HISTOQUÍMICA.**

La utilización de las lectinas en histoquímica para la caracterización celular y el estudio de la micromorfología es antigua. Ya Nicholson y Singer en 1971 introdujeron las lectinas marcadas como marcadores ultraestructurales. Posteriormente, la disponibilidad de anticuerpos frente a estas lectinas conjugados con enzimas tales como la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina o moléculas como la biotina, permitió el desarrollo de métodos poderosos de análisis. La posterior incorporación de lectinas marcadas con oro y de anticuerpos anti-lectina marcados con oro amplió extraordinariamente los estudios ultraestructurales y dio un impulso muy importante a la Biología Celular (Roth, 2011).

La utilidad de las lectinas en estos estudios se basa en su distinta especificidad por los glicanos celulares que permiten dibujar un mapa de los glicanos de células y tejidos normales y patológicos. En los estudios histoquímicos se utilizan diversas lectinas que se encuentran disponibles comercialmente. Entre las más importantes se encuentran entre otras las lectinas de *Arachis hypogaea*, *Canavalia ensiformis*, *Galanthus nivalis*, *Griffonia simplicifolia*, *Helix pomatia*, *Maackia amurensis*, *Sambucus nigra*, *Triticum vulgare* y *Ulex europaeus*, que cubren una gran cantidad de glicanos específicos.

Una de las técnicas generales más utilizadas en los procedimientos histoquímicos utiliza lectinas biotiniladas que se unen específicamente a los glicanos y después fijan el complejo estreptavidina-peroxidasa que al tratar con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina como sustratos genera un precipitado insoluble coloreado y visible por microscopía óptica.

## **MATRICES ANALÍTICAS CON LECTINAS PARA EL ESTUDIO DE GLICOCONJUGADOS (“ARRAYS” DE LECTINAS).**

Recientemente se han introducido los denominados “arrays” de lectinas. Consisten en matrices, habitualmente placas de poliestireno de 96 pocillos, en donde se fijan las glicoproteínas y se analiza la fijación de las distintas lectinas basada en las interacciones entre la parte polisacárida de la glicoproteína y la lectina. Las técnicas se denominan ELLA (“*enzyme-linked lectin assay*”) y ELLSA (“*enzyme-linked lectin-antibody assay*”). Son procedimientos con un fundamento similar al ELISA.

En el ELLA clásico, introducido en 1983, las glicoproteínas se fijan a la placa y después se fijan las lectinas conjugadas con una enzima marcadora. Después de incubar con el sustrato incoloro aparece el precipitado insoluble coloreado en función de la interacción glicoproteína-lectina. Este procedimiento se ha mejorado en varias maneras en esencia utilizando lectinas y anticuerpos. Estas técnicas junto con las técnicas proteómicas han dado lugar a la glicoproteómica, una disciplina que combina la especificidad de la interacción lectina–azúcar con la potencia de la proteómica (Narimatsu y cols., 2010; Ribeiro y cols., 2013).

Estos procedimientos permiten la investigación de oligosacáridos y de glicoproteínas, la caracterización de tipos celulares basados en la huella glicídica de superficie, la determinación de biomarcadores de las células tumorales y la metástasis, la cirrosis, etc., así el estudio de los cambios dinámicos de la glicosilación de la superficie en células superiores y bacterias (Zhang y cols., 2016).

## **BIOSENSORES.**

Las lectinas se han aplicado para la construcción de biosensores para el diagnóstico utilizando las técnicas de espectroscopia de impedancia electroquímica y distintos tipos de voltimetría. La lectina más utilizada en biosensores ha sido la concanavalina A. Dichos biosensores se han utilizado para la detección de glucosa en sangre en pacientes de diabetes y para la detección de glicoproteínas en pacientes infectados con el virus del dengue (Hong y cols., 2015). Otra de las lectinas utilizadas ha sido la lectina SNA I de *Sambucus nigra* acoplada a electrodos de oro. Este biosensor se ha utilizado para la detección del antígeno sialil-Tn en muestras de suero tanto en individuos sanos como en pacientes aquejados con distintos tipos de tumores en los que este macador está sobreexpresado (Silva y cols., 2014).

## **CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

La cromatografía de afinidad basada en la interacción lectina-glicano se describió en 1965 por Agrawal y Goldstein (Agrawal y Goldstein, 1965). Inicialmente se utilizó un dextrano entrecruzado covalente como el Sephadex G 200 que fija concanavalina A que posteriormente se eluye con glucosa. Este procedimiento permite fijar específicamente la proteína eliminando las que no lo hacen. El procedimiento general se ha mejorado sustituyendo los ligandos fijados covalentemente a las resinas soporte. Por ejemplo, en el aislamiento de las lectinas de *Sambucus* se ha realizado de dos formas, fetuina ligada a Sepahrosa 4B como soporte (grupo de Peumans) y Sepharosa 6B tratada con ácido para liberar galactosas terminales (nuestro grupo). En el primer caso solo se aíslan las lectinas específicas de ácido siálico, mientras que en el segundo se aíslan además las que son solo específicas de galactosa y N-Ac-galactosamina (Girbes y cols., 2004).

## **DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE GLICOPROTEÍNAS.**

La electroforesis en geles de poliacrilamida de gliconjugados permite separar las distintas especies en base a su peso molecular. La transferencia a membranas apropiadas bien de forma pasiva o por electrotransferencia y posterior detección con lectinas marcadas es una nueva tecnología muy potente ya que permite determinar el tipo de glicanos y posteriormente la aplicación de las técnicas proteómicas para la identificación precisa de las secuencias de aminoácidos (Etxebarria y cols., 2012).

# APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS LECTINAS.

Las lectinas de plantas tienen diversas aplicaciones en la Biomedicina, tanto en la investigación como en el diagnóstico y la terapia. Se sabe que varias lectinas poseen actividad mitogénica, apoptótica, moduladora de la inflamación, inhibidora del crecimiento de tumores, moduladora de la infección por bacterias virus y parásitos (Tsaneva y Van Damme, 2020).

El carácter mitogénico de algunas lectinas se conoce desde hace tiempo. La concanavalina A se cristalizó en 1919 y su carácter mitogénico se determinó en 1960. El efecto sobre la mitosis se inicia por la interacción de la lectina con el receptor de células T en la superficie celular. Esta interacción influye en los niveles de interleuquinas,  $\gamma$ -interferón, el factor de necrosis de tumores  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la expresión de diferentes quinasas (Coelho y cols., 2017).

Las lectinas se han utilizado en la diagnosis y el tratamiento del cáncer, en particular las lectinas de leguminosas, las lectinas relacionadas con la de *Galanthus nivalis* las lectinas de la familia de la ricina y la WGA y algunas están ya en estudios preclínicos (Shi y cols., 2017). Una lectina que se ha utilizado en clínica para la terapia del cáncer es la de *Viscum album* mediante extractos estandarizados de la planta (Ostermann y cols., 2020). También se utilizan para estudios de actividad antitumoral en formulaciones farmacéuticas tales como liposomas y nanoestructuras (Alavi y cols., 2019; Ardelean y cols., 2019; Chaturvedi y cols., 2019).

## **INMUNOTOXINAS: LOS PROYECTILES MÁGICOS DE EHRLICH.**

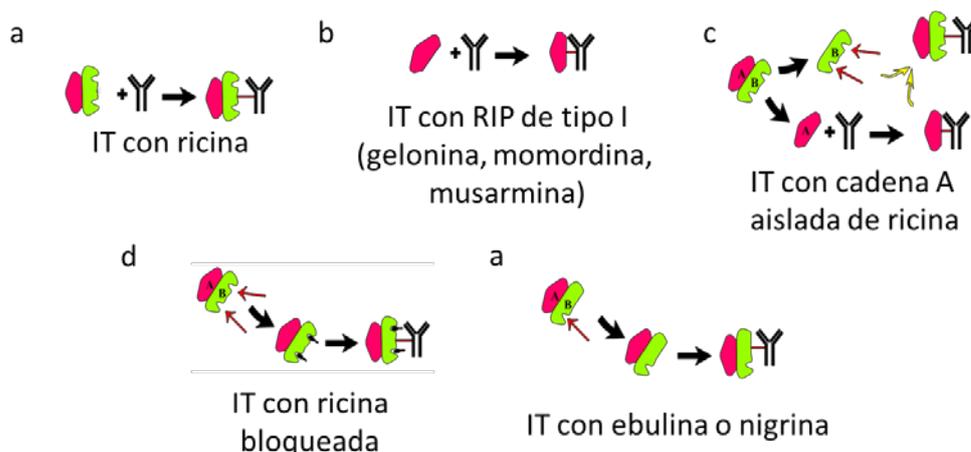
Una de las aplicaciones de las lectinas antirribosómicas que se han encontrado en los últimos años ha sido fundamentalmente la construcción de fármacos anticancerosos, en particular las denominadas inmunotoxinas (Girbes, 2019). Una inmunotoxina es una especie molecular producida artificialmente a partir de un anticuerpo (haptóforo o elemento conductor) y una toxina (toxóforo o elemento tóxico). El anticuerpo está dirigido contra un antígeno presente en la superficie de la célula blanco, y por ello las inmunotoxinas se convierten en los “*zauberkugel*” (proyectiles mágicos) de Ehrlich, al identificar y matar dichas células blanco (Ehrlich, 1981a; Ehrlich, 1981b).

Las patologías que pueden tratarse con inmunotoxinas son, en principio, todas aquellas basadas en la existencia de células enfermas con peculiaridades o motivos antigénicos (determinantes antigénicos) específicos (o en mayor concentración) en su superficie celular. Las enfermedades cuyo tratamiento con inmunotoxinas a nivel experimental y ensayos clínicos se ha iniciado son el cáncer, el SIDA y las enfermedades autoinmunes (Franke y cols., 2019).

## INMUNOTOXINAS CONVENCIONALES CON LECTINAS ANTIRRIBOSÓMICAS DE LOS SAUCOS.

No vamos a extendernos aquí sobre los tipos de inmunotoxinas convencionales formadas con ricina RIPs monocatenarias como saporina, momordina y musarmina, ya que tendríamos que introducir las que se preparan con fragmentos de anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y otras moléculas conductoras, así como las que se preparan con antibióticos como parte toxica (como ejemplo tenemos el conjugado gemtuzumab-ozogamicin) y que las grandes compañías farmacéuticas están ya desarrollando y aplicando a la clínica. Solo vamos a considerar aquellas que contienen proteínas de los saucos.

En la figura 17 se indican algunos de los modelos de inmunotoxinas construidos hasta la fecha. La ricina presenta una elevada toxicidad inespecífica que aumenta su dificultad en la construcción de inmunotoxinas.



**Figura 17. Inmunotoxinas.** a) inmunotoxinas con ricina intacta; b) inmunotoxinas con RIPs de tipo I o de una cadena; c) inmunotoxinas formadas con cadena A de ricina aislada de preparaciones de ricina intacta que pudieran contener pequeñísimas cantidades de cadena B; d) inmunotoxinas con ricina bloqueada; e) inmunotoxinas con

ebulina o nigrina. Las flechas en la IT con ricina bloqueada indican los sitios de unión a los azúcares presentes en los receptores de membrana plasmática. (Girbes, 2019).

Una forma antigua de atenuar la toxicidad inespecífica de la toxina ligada al anticuerpo era administrar la inmunotoxina de ricina simultáneamente con lactosa. De esta manera, al fijarse el azúcar a los dominios de fijación de azúcar, en particular el dominio  $2\gamma$ , se puede reducir la toxicidad inespecífica.

El bloqueo de los sitios de ricina con análogos de galactosa bloquea la toxicidad inespecífica de la ricina, pero inactiva en parte a la proteína. Uno de dichos sitios interacciona con receptores que siguen una ruta que incluye el transporte al *trans*-Golgi, después al retículo endoplásmico rugoso y finalmente la translocación al citosol.

El sitio de fijación de azúcares de ebulina I y nigrina b se une a receptores cuya ruta intracelular sigue la ruta endosómica-lisosómica y no incluye el *trans*-Golgi y ello es la causa de la baja toxicidad de ambas proteínas (Muñoz y cols., 2001; Citores y cols., 2002; Battelli y cols., 2004).

Un avance notable lo constituyó la utilización de inmunotoxinas construidas con la cadena A de la ricina como toxina, dado que es fácil separarla de la cadena B, pero la presencia de muy pequeñas cantidades de cadenas B como contaminante convierten a los conjugados con cadena A en extremadamente tóxicos e inespecíficos.

Para eliminar la toxicidad inespecífica de ricina de una manera más segura y sin necesidad de añadir D-galactosa o lactosa para bloquear el sitio de alta afinidad, se procedió a: (i) inactivar parcialmente la molécula de ricina por vía química; (ii) por mutagénesis dirigida; (iii) simplemente formando la inmunotoxina solo con la cadena A de la ricina. Todas estas alternativas tienen como consecuencia una notable reducción de la actividad de la ricina (Stirpe y Battelli, 2006). Otra posibilidad es la utilización de RIPs de tipo 1 como parte tóxica de las inmunotoxinas. Pero estos preparados son menos activos.

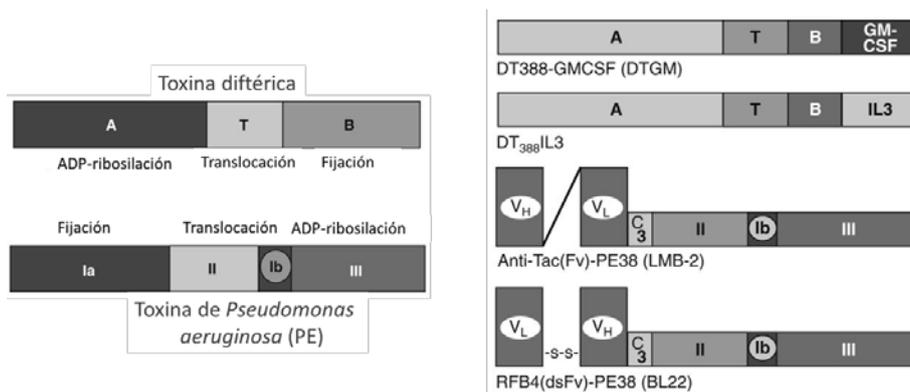
La rotura de una inmunotoxina con ricina intacta antes de alcanzar el blanco celular libera la toxina con efectos secundarios desastrosos. Por el contrario, con inmunotoxinas formadas con las lectinas antirribosómicas, ebulina I o nigrina b, la rotura las libera prácticamente sin consecuencias al no alcanzar la concentración extracelular tóxica. Por lo tanto, su utilización a dosis terapéuticas no ofrece el peligro que ofrecen los conjugados con ricina u otras

toxinas (Ferrerias y cols., 2011). Esto supone una enorme ventaja sobre las inmunotoxinas con ricina intacta o modificada.

Otro tipo de inmunotoxinas consiste en la conjugación de un anticuerpo monoclonal con una RIP de tipo 1 obtenido por vía recombinante. Tal es el caso reciente de la musarina 1 (*Muscari armeniacum*) recombinante por expresión en *Escherichia coli*, ligada al anticuerpo monoclonal MJ7 que reconoce la endoglina (CD105). La actividad resultante es del mismo tipo que otras inmunotoxinas construidas con otras RIPs de tipo 1 (Barriuso y cols., 2016). La ventaja es que se pueden obtener grandes cantidades de musarina recombinante simplemente por cultivo bacteriano.

## INMUNOTOXINAS RECOMBINANTES.

La producción de grandes cantidades de inmunotoxinas convencionales produce complicaciones técnicas de difícil solución y llevó a la preparación de inmunotoxinas por vía recombinante. Las más estudiadas han sido las preparadas con toxinas bacterianas toxina diftérica (DT) y la toxina de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) (Pastan y cols., 2006).



**Figura 18. Inmunotoxinas recombinantes formadas con toxinas bacterianas (toxina diftérica y toxina de *Pseudomonas aeruginosa*).** Izquierda: toxinas bacterianas con sus dominios activos; derecha: inmunotoxinas recombinantes. GM-CSF: factor de estimulación de colonias de granulocitos- macrófagos; IL3: interleuquina 3; V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> partes variables pesada y ligera de anticuerpo monoclonal; C3: conector Ala-Ser-Gly-Gly-Pro-Glu. (Pastan y cols., 2006).

Ambas toxinas provocan la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2), su inactivación y el bloqueo subsiguiente de la biosíntesis de proteínas. Ambas toxinas poseen tres dominios activos, uno de fijación a la membrana plasmática, otro de translocación a través de la membrana en compartimentos intracelulares y un tercero de ADP-ribosilación.

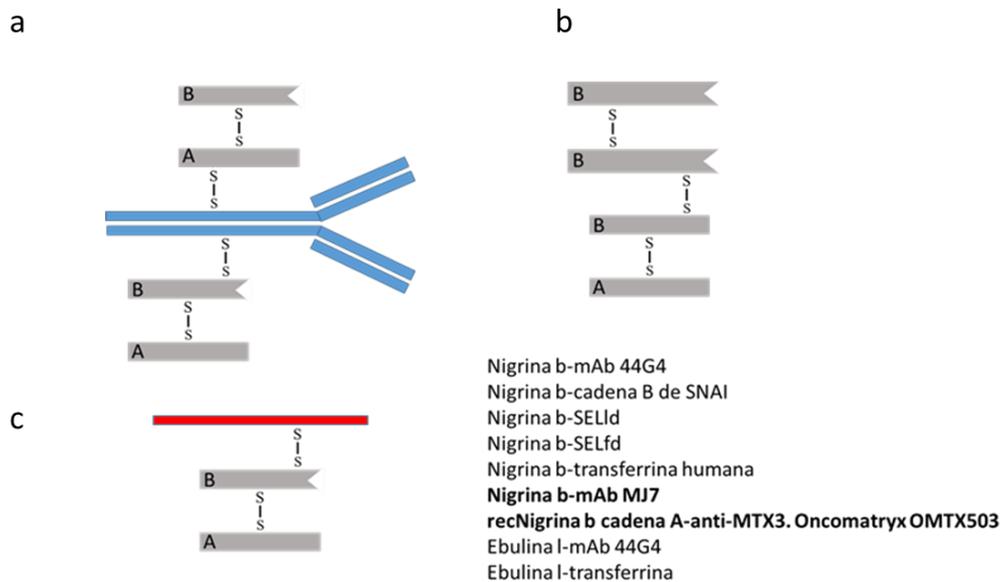
En estas inmunotoxinas recombinantes se respetan los tres dominios y se fusiona otro dominio que codifica a un elemento conductor que puede ser el factor de crecimiento o una interleuquina, en el caso de la figura 18 el factor GM-CSF y la IL3, o un fragmento ( $V_H$  o  $V_L$ ) de anticuerpo monoclonal específico para un detalle de la superficie celular, anti-Tac o RFB4 monoclonal antibody.

Por otro lado, también se han utilizado formas recombinantes de las RIPs vegetales. Las más utilizadas han sido la cadena A de la ricina y la gelonina que ha entrado en estudios clínicos con éxito variable (Akbari y cols., 2017; Lyu y cols., 2012).

## **INMUNOTOXINAS Y CONJUGADOS CON EBULINA L Y NIGRINA B.**

El uso de ebulina l y nigrina b en la construcción de inmunotoxinas tiene la ventaja de que preservándose su carácter de extraordinario inhibidor de la síntesis de proteínas sobre el ribosoma ( $IC_{50}$  hasta 80 veces menor que la ricina), no pueden translocarse al citosol por la vía de transporte retrógrado como la ricina y alcanzar los ribosomas de la célula. No obstante, la conjugación con los transportadores adecuados permite vehicular a las toxinas al interior celular siguiendo una ruta altamente productiva que sugiere la internalización y el tránsito a través del retículo endoplásmico.

Las inmunotoxinas y conjugados preparados con ebulina l y nigrina b se indican en la figura 19. Como conector entre las proteínas de *Sambucus* y los elementos conductores se ha utilizado en todo momento el N-succinimidil 3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP). Este conector químico se reduce en el interior celular liberándose la toxina que entra en el citosol lo que le permite atacar a los ribosomas e inhibir la biosíntesis de proteínas. Por otro lado, no se pueden descartar otros efectos tóxicos que pueden conducir a la apoptosis de las células afectadas.



**Figura 19. Inmunotoxinas y conjugados con proteínas de *Sambucus*.** a) inmunotoxina con anticuerpo monoclonal y nigrina o ebulina; b) conjugado SELId/SELfd-nigrina; c) conjugado transferrina-nigrina o ebulina. Se incluye un listado de inmunotoxinas y conjugados preparados en nuestro laboratorio. En negrita las inmunotoxinas ensayadas *in vitro* e *in vivo* (Ferrerías y cols., 2011; Muñoz y cols., 2007; Muñoz y cols., 2013). recNigrina b cadena A-anti-MTX3 (OMTX503) ha sido preparada y ensayada por la empresa Oncomatrix (Puerto-Camacho y cols., 2019).

### ***Nigrina b-mAb 44G4* y *ebulina l-mAb 44G4*.**

Como prueba de concepto del uso de nigrina b y ebulina l como parte tóxica de inmunotoxinas, se procedió a preparar inmunotoxinas contra marcadores de células cancerosas. Como marcador específico celular se escogió la endoglina (CD105). Este marcador se sobreexpresa en distintos tejidos de los mamíferos, especialmente aquellos relacionados con la proliferación de nueva vasculatura (neovasculatura). Particularmente interesante es el hecho de que CD105 se sobreexpresa en las células endoteliales de la neovasculatura tumoral (Bernabeu y cols., 2009) y también en células de cánceres de distintos tipos, en particular los melanomas (Santibáñez y cols., 2011).

En la tabla 5 se resumen los valores de citotoxicidad y de inhibición sobre la síntesis de proteínas de nigrina b y ebulina l y las inmunotoxinas 44G4 – Nigrina b, 44G4 – Ebulina l y Ng-MJ7 sobre células hCD105<sup>-</sup> y hCD105<sup>+</sup>. 44G4 es un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce específicamente el CD105 humano, mientras que el MJ7 es un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce el CD105 de ratón y por lo tanto reconoce a las células L929-rCD105<sup>+</sup> de ratón.

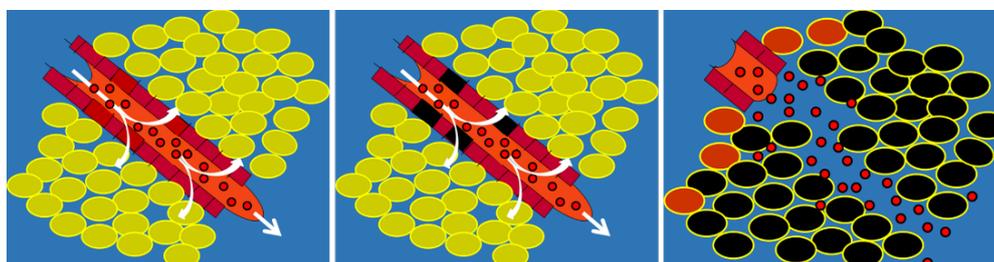
**Tabla 5. Toxicidad de las inmunotoxinas con anticuerpos monoclonales anti-endoglina humana y nigrina b o ebulina I sobre células que expresan endoglina humana.**

	IC <sub>50</sub> (pM)				
	Ng	Eb	44G4 – Ng	44G4 – Eb	Ng-MJ7
<b>Síntesis de proteínas</b>					
Lisado reticulocitos de conejo	25	150	88	150	-
L929	10.000	-	>10.000	-	-
L929(S) -CD105 <sup>+</sup>	14.500	-	188	-	-
<b>Viabilidad celular</b>					
L929-hCD105 <sup>-</sup>	200.000	>10.000	170.000	10.000	77
L929(S)-hCD105 <sup>+</sup>	240.000	>10,000	600	310	-
HUVEC-hCD105 <sup>+</sup>	200.000	-	6.400	-	-
L6E9-hCD105 <sup>-</sup>	-	>10.000	-	>10.000	-
L6E9(L)-hCD105 <sup>+</sup>	-	>10.000	-	4.000	-
B16MEL4A5-rCD105 <sup>+</sup>	>200.000	-	-	-	4.200

La síntesis de proteínas y la citotoxicidad se determinó después de la incubación de las proteínas e inmunotoxinas con las células durante 48h. L929 es una célula de ratón que sobre-expresa CD105 de ratón además de CD105 humano y es por tanto muy sensible a la Ng-MJ7 (Girbés y cols., 2004; Benitez y cols., 2005; Muñoz y cols., 2007).

### *Nigrina b-mAb MJ7 in vivo.*

Como prueba de concepto del uso de nigrina b como parte tóxica de inmunotoxinas *in vivo* se procedió a preparar la inmunotoxina nigrina b-MJ7 (Muñoz y cols., 2013).

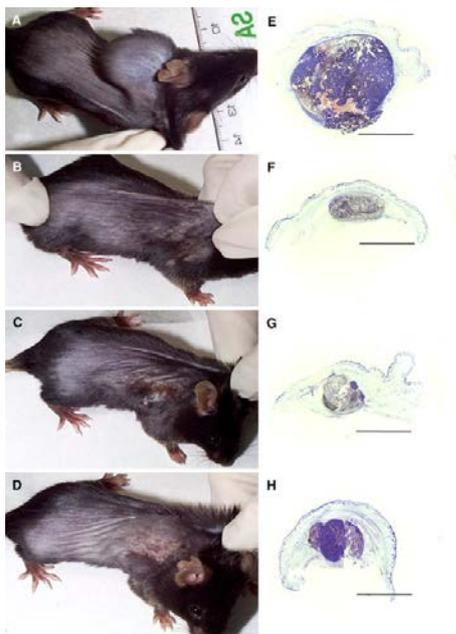


**Figura 20. Principio del funcionamiento *in vivo* de la inmunotoxina nigrina b-MJ7 sobre tumores palpables B16MEL4A5 generados por la implantación de las células tumorales en ratones C57BL/6J (Girbes, 2019).**

MJ7 reconoce específicamente y con alta afinidad al marcador de ratón (CD105r). Dado que el melanoma de ratón es uno de los cánceres que sobre-expresan rCD105r en la superficie de las células y en las células de la neovasculatura, la acción de la inmunotoxina *in vivo* se ejerce a dos

niveles, el celular, sobre las células tumorales y el vascular, sobre la neovasculatura tumoral. Como se observa en la figura 20, la destrucción de unas pocas células endoteliales destruye el vaso y provoca la liberación de la inmunotoxina, que pueden entonces actuar también sobre las células cancerosas CD105<sup>+</sup> y sobre las células endoteliales destruyendo los vasos y provocando la necrosis del tumor por falta de oxígeno y nutrientes. Por ello, las inmunotoxinas nigrina b-MJ7 son antiangiogénicas.

**Figura 21. Efecto *in vivo* de la inmunotoxina nigrina b-MJ7 sobre tumores palpables B16MEL4A5 en ratones C57BL/6J.** Izquierda: selección de ratones tratados que va desde la eliminación total (B), hasta la eliminación casi total (C) o hasta la eliminación parcial (D).



Derecha: cortes histológicos de los tumores teñidos con hematoxilina-eosina; en azul se aprecia la masa tumoral remanente (Muñoz y cols., 2013).

Para los estudios *in vivo* se realizaron pruebas para determinar la estequiometría de la inmunotoxina y su solubilidad, así como para determinar la dosis mínima de actuación sin provocar efectos letales. Para ello se desarrollaron

dos modelos, uno de cola de ratón y otro de ratón completo. En el primer modelo se produce una herida en la cola para que se sobreexpresen el CD105r y simultáneamente se administra la inmunotoxina. En el segundo se implantan células de melanoma B16MEL4A5 que provocan un tumor palpable entre 7 y 14 días después para provocar la sobreexpresión de CD105r. En ambos casos la inmunotoxina nigrina b-MJ7 conlleva la destrucción de los vasos sanguíneos afectados lo que provoca la necrosis de la cola y la de los tumores. En la figura 22 se presenta el efecto de la inmunotoxina sobre los ratones con tumores B16MEL4A5.

***recNigrina b cadena A-anti-MTX3 (OMTX503).***

La empresa ONCOMATRIX BIOPHARMA desarrolló una molécula de cadena A de la nigrina b por vía recombinante reduciendo su inmunogenicidad (recNigrina b-cadena A) y la acopló al anticuerpo monoclonal MTX5 que reconoce el CD105 humano. El conjugado resultante denominado recNigrina b cadena A-anti-MTX3 (OMTX503) resultó ser activo frente a células RM82 y xenoinjertos de sarcoma de Ewing derivados de pacientes, lo que representa un avance significativo en cuanto al uso de estas proteínas del saúco en la construcción de inmunotoxinas (Puerto-Camacho y cols., 2019).

# APLICACIONES DE LAS LECTINAS EN LA NANOFARMACIA

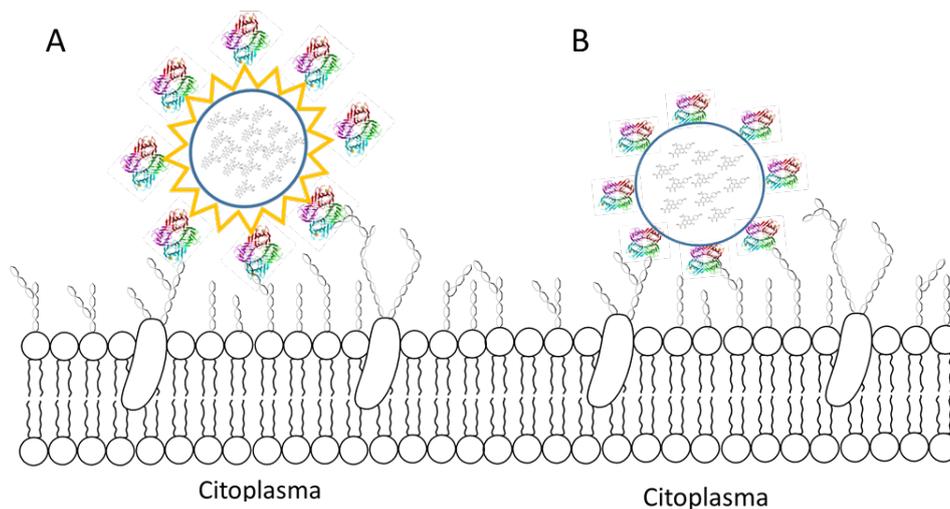
Para mejorar la administración de fármacos en la terapia utilizando herramientas de la nanofarmacia se han preparado distintos tipos de nanoestructuras, nanopartículas, nanocápsulas, micelas, dendrímeros, sistemas lipídicos nanoestructurados, nanoemulsiones, cristales líquidos y nanosuspensiones, liposomas, niosomas y etosomas (Ardelean y cols., 2019; Bruschi, 2019). La finalidad es alcanzar concentraciones terapéuticas de tales formulaciones en los sitios de acumulación y para ello es necesario aumentar la adhesividad de dichas preparaciones a las biomembranas de las células diana.

Una de las maneras es la conjugación o funcionalización de dichas nanoestructuras con lectinas. Las lectinas son más resistentes a la digestión gástrica (Jiménez y cols., 2013 y 2017), que otras proteínas conductoras, por ejemplo, los anticuerpos. Los conjugados con lectinas se unen a la parte glicídica de glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares, así como a las mucinas del epitelio intestinal en función de la especificidad de la lectina.

Son varias las lectinas utilizadas en la construcción de estas preparaciones. Aquí presentamos tres ejemplos de funcionalización, con concanavalina A, WGA (aglutinina de germen de trigo) y SELfd (lectina dimérica aislada de frutos de *S. ebulus*).

La concanavalina A se ha utilizado para funcionalizar nanopartículas cargadas con fármaco. Entre las innovaciones más recientes destaca la funcionalización de nanopartículas de materiales mesoporosos. En la figura 22 se presentan dos ejemplos de estas nanopartículas.

La preparada con el antitumoral doxorubicina (MSNConA@DOX) consta de un núcleo de material mesoporoso fabricado con sílice recubierto con un polímero degradable por ácido al que se le une la lectina de manera covalente. La lectina reacciona con restos de ácido siálico presentes en las células blanco (en este caso células de osteosarcoma humano que sobreexpresan restos terminales de ácidos siálico), se internaliza y al pH lisosómico (aprox. 5,3) se hidroliza el polímero y se libera el fármaco desde el núcleo mesoporoso.



**Figura 22. Nanopartículas formadas con material mesoporoso de sílice funcionalizadas con concanavalina A.** Las nanopartículas de material mesoporoso se prepararon para contener fármaco: A: doxorubicina; B: levofloxacino. En A la nanopartícula está recubierta por ácido poliacrílico al que se liga a la lectina y es sensible a cambios de pH. La lectina interacciona con los restos terminales de ácido siálico. (dibujos realizados según datos de *Martínez- Carmona y cols., 2018 y 2019*).

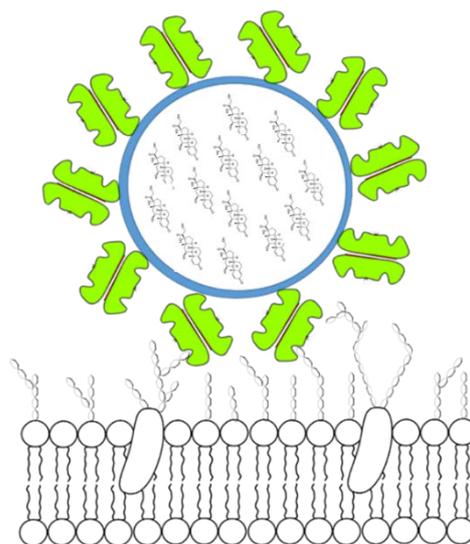
Este “nanosistema” permite concentrar el antitumoral en el entorno de las células cancerosas aumentando su efectividad y reducir así la dosis administrada y, por tanto, los efectos secundarios (Martínez-Carmona y cols., 2018). El otro nanosistema preparado con material mesoporoso consiste en un núcleo similar al anterior pero cargado con el antibiótico levofloxacino y se ha utilizado para destruir un biofilm bacteriano formado con *Escherichia coli*. La funcionalización se ha realizado también con concanavalina A. Este nanosistema permite la acumulación de antibiótico en el biofilm y por tanto aumenta su efectividad (Martínez-Carmona y cols., 2019).

La aglutinina de germen de trigo (WGA) se ha utilizado para funcionalizar microesferas de ácido poli-(ácido L-láctico-ácido glicólico) rellenas con un antígeno para la inmunoterapia oral de alergia de tipo I. Las microesferas se cargaron con alérgeno de abedul y se funcionalizaron con la lectina para promover la bioadhesión a la mucosa intestinal. Estos preparados resisten un 60% la digestión simulada y cuando se administran por vía oral a ratones se observa una respuesta más fuerte en niveles de IgG que cuando el alérgeno se administra en forma libre o encapsulado en microesferas no funcionalizadas (Walter y cols., 2004).

En la actualidad estamos realizando estudios con los Profesores Damián y Manuel Córdoba Díaz del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, encaminados a la obtención de nanocápsulas preparadas con quitosano

cargadas con prednisona y derivatizadas con la lectina SELfd de los frutos de *S. ebulus* L. (figura 23).

**Figura 23. Nanocápsulas de quitosano cargadas con prednisona y funcionalizadas con SELfd.** Las nanocápsulas de quitosano se preparan en presencia de prednisona y después se funcionalizan con la lectina SELfd de frutos de *S. ebulus* L. con glutaraldehído como agente conector quitosano-lectina.



Se ha escogido esta lectina por varias razones: 1) se trata de una lectina descubierta y caracterizada en nuestro laboratorio (Citores y cols., 1998); 2) presenta una actividad fijadora de mucina gástrica muy elevada (Citores y cols., 1998); 3) resiste bastante tiempo la digestión por pepsina en un fluido gástrico simulado, en comparación con la ebulina f, lo que puede permitir su tránsito gástrico en cantidad apreciable (Jiménez y cols., 2013); 4) posee buena capacidad conductora ya que permite la formación de conjugados citotóxicos para cultivos celulares de células COLO320 (Ferrerías y cols., 2011).

Estudios de fluorescencia intrínseca indican que la razón de esta mayor resistencia se debe a una mayor compactación estructural en el medio ácido (Carrillo y cols., 2017). El trabajo realizado hasta el momento ha permitido obtener nanocápsulas estables y con una buena carga de prednisona. Se han llevado a cabo estudios histoquímicos por el Prof. Garrosa del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología de la Universidad de Valladolid que indican que las nanocápsulas se fijan específicamente a la mucosa intestinal.

## CONSIDERACIONES FINALES

Se ha recorrido mucho camino desde que el Profesor Ortega Mata diese su discurso de ingreso sobre las fitohemaglutininas. Desde entonces las lectinas se han convertido en una disciplina, la lectinología, cuya proyección solo llegamos a atisbar.

Al reconsiderar los conocimientos adquiridos desde que en 1888 describiese el aislamiento de la ricina de las semillas del ricino, se aprecia cómo unos datos que pudieran parecer anecdóticos se han convertido en un material que tiene enormes implicaciones en el funcionamiento de las células y los tejidos por su actuación como sensores biológicos en el reconocimiento entre las células y los tejidos hasta su actuación como elementos de defensa de las plantas contra patógenos, insectos y gusanos, pasando por sus aplicaciones en la biomedicina y la tecnología analítica.

El futuro de la investigación y las aplicaciones de las lectinas viene marcado por el desarrollo de las tecnologías ómicas y el desarrollo de plataformas de alto rendimiento en el análisis de las interacciones con los azúcares receptores en la superficie celular y en los compartimentos intracelulares con el objeto de definir tanto la afinidad como la especificidad lectina-azúcar receptor. Por otro lado, el desarrollo de sus aplicaciones en la construcción de fármacos para la terapia dirigida abre nuevas vías de Investigación, en particular en la nanofarmacia.

El “*corpora non agunt nisi fixata*” de Paul Ehrlich cobra su máximo significado en el modo de acción de las lectinas. La fijación de las lectinas a sus blancos celulares permite la interrelación de las células y la transmisión de información entre ellas. La implicación de las lectinas en la Farmacología es un campo que merecería ser explorado. La interacción lectina-receptor podría alterar los microdominios relacionados con los receptores o los sistemas de captación de fármacos alterando su entrada al interior celular y por lo tanto pueden condicionar o definir la respuesta farmacológica, tanto en células normales como en células alteradas fisiológica o patológicamente y ello podría contribuir a la susceptibilidad al fármaco.

Permítanme una reflexión final. En estos tiempos de zozobra en los que nuestro mundo satisfecho de sus sistemas y sus logros ha sido golpeado duramente por la pandemia del coronavirus SARS-Cov-2 y la consecuente crisis económica, hoy más que nunca, se necesita ese impulso investigador que estimulado y financiado suficientemente resuelva de manera lo más

rápidamente posible los retos que están planteados para la supervivencia de nuestra sociedad tal y como la conocemos. Las dificultades económicas con las que se encuentra nuestro sistema de investigación no pueden ser un valladar insalvable que asfixie a nuestra sociedad, a nuestros jóvenes, a nuestro futuro. Tenemos los conocimientos, las personas y la sana ambición de poder contribuir al esfuerzo colectivo de conseguir un mundo mejor.

Quiero concluir reiterando mi agradecimiento y firme compromiso para con la Real Academia y espero llegar a ser merecedor del gran honor que se me hace al ser admitido como uno más de tan ilustre grupo de miembros de los que espero aprender con su trato y magisterio.

He dicho.

## REFERENCIAS

Agrawal, B. y Goldstein, I. (1965). Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *Biochem. J.*, 96: 23c-25c.

Akbari, B., Farajnia, S., Khosroshahi, S.A., Safari, F., Yousefi, M., Dariushnejad, H. y Rahbarnia, L. (2017). Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. *Int Rev Immunol.*, 36: 207-219.

Alavi M, Hamidi M. (2019). Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metab Pers Ther.*, 34(1). doi: 10.1515/dmpt-2018-0032.

Almkvist, J. y Karlsson, A. (2004). Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate J.* 19: 575–581.

An, H., Kronewitter, S., de Leoz, M. y Lebrilla, C. (2009). Glycomics and disease markers. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13: 601-607.

Ardelean, I., Fikai. D., Sonmez, M., Oprea, O., Nechifor, G., Andronescu, E., Fikai, A. y Titu, M. (2019). Hybrid magnetic nanostructures for cancer diagnosis and therapy. *Anticancer Agents Med Chem.*, 19: 6-16.

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

Barbieri, L., Ciani, M., Girbés, T., Liu, W., Van Damme, E., Peumans, W. y Stirpe, F. (2004) Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett.*, 563: 219-222.

Barondes, S., Cooper, D., Gitt, M. y Leffler, H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol.Chem.*, 269: 20807-20810.

Barriuso, B., Antolin, P., Arias, F., Girotti, A., Jiménez, P., Córdoba-Díaz, M., Córdoba-Díaz, D. y Girbes, T. (2016). Anti-Human Endoglin (hCD105) Immunotoxin-Containing Recombinant Single Chain RibosomeInactivating Protein Musarmin 1. *Toxins*, 8(6): art. 184.

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

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

Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. y Quintanilla. M. (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. Biochim. Biophys. Acta., 1792: 954-973.

Bornhöfft, K., Goldammer, T., Rebl, A. y Galuska, S. (2018). Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. Dev. Comp. Immunol., 86: 219-231.

Boscher, C., Dennis, J.W. y Nabi, I (2011). Glycosylation, galectins and cellular signaling. Curr Opin Cell Biol., 23: 383–392.

Breitenbach, L., Coelho, B., Silva, P., Lima, V., Pontual, E., Paiva, P., Napoleão, T. y Correia, A. (2017). Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological-Pharmacological and Therapeutic Applications. Evidence-Based Compl. Alternat. Med., Artículo ID 1594074.

Broekaert, W., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. y Peumans, W. (1984). A lectin from elder (*Sambucus-nigra* L.) bark. Biochem. J., 221: 163-169.

Bruschi, M.L. (2019). Lectins and Nanostructured Drug Delivery Systems. Curr. Drug Deliv., 16: 268-269.

Carrillo, C., Córdoba-Díaz, D., Córdoba-Díaz, M., Girbés, T. y Jiménez, P. (2017). Effect of Temperature, pH and Sugar Binding on the Structures of lectins Ebulin f and SELfd. Food Chem., 220: 324-330.

Castillo, R., Lozano, D., González, B., Manzano, M., Izquierdo-Barba, I. y Vallet-Regí, M. (2019). Advances in mesoporous silica nanoparticles for

targeted stimuli-responsive drug delivery: an update. *Expert Opin Drug Deliv*, 16: 415-439.

Chaturvedi, V., Singh, A., Singh, V. y Singh, M. (2019). Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Curr Drug Metab.*, 20: 416-429.

Chen, Y., Sanae, H., Naoki, M. y Yamamoto, K. (2013). Regulation of Mac-2BP secretion is mediated by its N-glycan binding to ERGIC-53. *Glycobiology*, 23: 904-916

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

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

Citores, L., Rojo, M., Jiménez, P., Ferreras, J., Iglesias, R., Aranguéz, I. y Girbes T. (2008). Transient occurrence of an ebulin-related-D-galactose-lectin in shoots of *Sambucus ebulus* L. *Phytochem.*, 69: 857-864.

Coelho, L., Silva, P., Lima, V., Pontual, E., Paiva, P., Napoleao, T. y Correia, M. (2017). Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/ pharmacological and therapeutic applications. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Art. 1594074, 1–22.

Coelho, L., Silva, P., Oliveira, W., Moura, M., Pontual, E., Gomes, E., Paiva, P., Napoleao, T. y Correia, M. (2018). Lectins as antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.*, 125: 1238–1252.

Cooper, D. (2002). Galectinomics: Finding themes in complexity, *Biochim Biophys Acta*, 1572: 209–231.

Crick, F., Barnett, L., Brenner, R. y Watts-Tobin, R. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 4809: 1227:1232.

Crocker, P., Paulson, J. y Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 7: 255-266.

Crompton, R. y Gall, D. (1980). Georgi Markov: death in a pellet. *Med. Legal J.*, 48: 51-62.

Dall'Olio, F., Malagolini, N., Di Stefano, G., Ciambella, M. y Serafini-Cessi, F. (1991). Alpha 2,6 sialylation of N-acetyllactosaminic sequences in human colorectal cancer cell lines. Relationship with non-adherent growth. *Int. J. Cancer*, 47: 291-297.

deBenito, F.M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Camafeita, E., Méndez, E. y Girbés, T. (1997) Isolation and partial characterization of a novel and uncommon two chain 64 KD ribosome-inactivating protein from the bark of elder (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett.*, 413: 85-91.

Edelman, G., Cunningham, B., Reeke, G. Jr., Becker, J., Waxdal, M. y Wang, J.L. (1972). The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 69: 2580–2584.

Eggleton, P., Bremer, E., Dudek, E., y Michalak, M. (2016). Calreticulin, a therapeutic target?. *Expert Opin Ther Targets.*, 20: 1137-1147.

Ehrlich, P. (1881a). Experimentelle untersuchungen über immunität I. Über ricin. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 17: 976–979.

Ehrlich, P. (1881b). Experimentelle untersuchungen über immunität II. Über abrin. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 17: 1218–1219.

Elba, V., Carvalho, E., Oliveira, W., Coelho, L. y Correia, M. (2018). Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. *Life Sci.*, 207: 152-157.

Endo, Y., y Wool, I.G. (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 257: 9054-9060.

Engedal, N., Skotland, T., Torgersen, M. y Sandvig, K. (2011). Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microb. Biotechnol.*, 4: 32-46.

Ettxebarria, J., Calvo, J., Martín-Lomas, M. y Reichardt, N. (2012). Lectin-array blotting: profiling protein glycosylation in complex mixtures. *ACS Chem. Biol.*, 7: 1729-1737.

Ferreras, J.M., Citores, L., Iglesias, R., Jiménez, P. y Girbés, T. (2011). Use of ribosome-inactivating proteins from *Sambucus* for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins*, 3: 420-441.

François, J., y Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3: 318-356.

François, K. y Balzarini, J. (2012). Potential of carbohydrate-binding agents as therapeutics against enveloped viruses. *Med. Res. Rev.* 32, 349–387.

Franke, H., Scholl, R. y Aigner, A. (2019). Ricin and *Ricinus communis* in pharmacology and toxicology—from ancient use and "Papyrus Ebers" to modern perspectives and "poisonous plant of the year 2018". *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 392: 1181-1208.

Franklin, R., y Gosling, R.G. (1953). Molecular Configuration of sodium thymonucleate. *Nature*, 4356: 740-741.

Gabius, H. (2009). Animal and human lectins. En "*The sugar code fundamentals of glycosciences*" (Gabius, H.-J., ed.), pp. 317–328, Wiley-VCH.

Gabius, H., Sabine, A., Jiménez-Barbero, J., Romero, A. y Solis D. (2011). From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem. Sci.*, 36: 298-313.

García-Sánchez, J.E., García, E. y Merino, M.L. (2010). Cien años de la bala mágica del Dr. Ehrlich (1909–2009). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 28: 521–533.

Garrison, A., Giomarelli, B., Lear-Rooney, C., Saucedo, C., Yellayi, S., Krumpe, L., Paragas, J., Bray, M., Olinger G., Huggins, J., McMahon, J. y O’Keefe, B. (2014). The cyanobacterial lectin scytovirin displays potent in vitro and in vivo activity against Zaire Ebola virus. *Antivir. Res.*, 112, 1–7.

Garrosa, M., Jiménez, P., Córdoba-Díaz, D., García-Recio, V., Gayoso, S., Rojo, M., Gayoso, M. y Girbés, T. (2018). In vivo toxicity of the ribosome-

inactivating lectin ebulin f in elderly mice. *Histol. Histopathol.*, 33: 979-986.

Garrosa, M., Jiménez, P., Tejero, J., Cabrero, P., Córdoba-Díaz, D., Quinto, E., Gayoso, M., y Girbés, T. (2015). Toxicity of the anti-ribosomal lectin ebulin f in lungs and intestines in elderly mice. *Toxins*, 7: 367-379.

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

Girbes, T. (2019). Discurso de ingreso en la Academia de Farmacia de Castilla y León. Academia de Farmacia de Castilla y León.

Girbes, T., Citores, L., deBenito, F., Iglesias, R. y Ferreras, J. (1996). A non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein co-exists with a structure-related monomeric lectin (SNA III) in elder (*Sambucus nigra*) fruits. *Biochem. J.*, 315: 343-344.

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

Girbés, T., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Muñoz, R., Rojo, M.A., Arias, F.J., García, J.R., Méndez, E., y Calonge, M. (1993a) 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, J. Arias, J. y Stirpe, F. (2004). Description, distribution, phylogenetic relationship and potential roles of ribosome-inactivating proteins in plants fungi and bacteria. *Minirev. Med. Chem.*, 4: 461-476.

Girbés, T., Vázquez, y D. Modolell, J. (1976). Polypeptide-chain elongation promoted by guanyl-5'-yl imidodiphosphate. *Eur. J. Biochem.*, 67: 257-265.

Girbés, T., Vázquez, D. y Modolell J. (1977a). Detection of guanosine-nucleotide elongation factor G complexes produced during the decay of guanosine-nucleotide elongation- factor G ribosome complexes. *Eur. J. Biochem.*, 81: 473-481.

Girbés, T., Campuzano, S., Vázquez, D. y Modolell, J. (1977b). Effects of cations, antibiotics and other agents on the turnover of guanosine-nucleotide elongation-factor G ribosome complexes. *Eur. J. Biochem.*, 81: 483-490.

Grunberg-Manago, M. Ortiz, P. y Ochoa, S. (1956). Enzymic synthesis of polynucleotides. I. Polynucleotide phosphorylase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 20: 269-285.

Hardman, K. y Ainsworth, C. (1972). Structure of concanavalin A at 2.4- Å resolution. *Biochemistry*, 11: 4910–4919.

Hartley, M. y Lord, J. (2004). Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim. Biophys. Acta-Protein and Proteomics*, 1701: 1-14.

Hirabayashi, J., Yamada, M., Kuno, A. y Tateno, H. (2013). Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem. Soc. Rev.*, 42: 4443–4458.

Holmgren, A. (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid. Redox Signal*, 2: 811–820.

Hoagland, M., Keller, E. y Zamecnik, P. (1956). Enzymatic carboxyl activation of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 218: 345-358

Hong, S., Kwon, J., Kim, D., Yang, S. (2015). A rapid, sensitive and selective electrochemical biosensor with concanavalin A for the preemptive detection of norovirus. *Biosens. Bioelectron.*, 64: 338–344.

Hussein, E., Zagho, M., Nasrallah, G. y Elzatahry, A. (2018). Recent advances in functional nanostructures as cancer photothermal therapy. *Int. J. Nanomedicine*, 13: 2897-2906.

Hwang, J, y Qi, L. (2018). Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem. Sci.*, 43: 593–605.

Iglesias, R., Citores, L., Ferreras, J., Pérez, Y. Jiménez, P., Gayoso, M., Olsnes, S., Tamburino, R., DiMaro, A., Parente, A. y Girbés, T. (2010). Sialic acid-binding dwarf elder four-chain lectin displays nucleic acid N-glycosidase activity. *Biochimie*, 92, 71-80.

Jabary, N. y Salamanca, P. (1999). Traducción del “*Urğūza fi ʿT-Ṭibb*“ de Avicena. Junta de Castilla y León. Consejería de Educación y Cultura.

Jacewicz, M., Clausen, H., Nudelman, E., Donohue-Rolfe, H. y Keusch, G. (1986). Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XI. Isolation of a *Shigella* toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J. Exp. Med.*, 163: 1391-1404

Jacob, F. y Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3: 318-356.

Jandus, C., Simon, H. y von Gunten, S. (2011). Targeting siglecs—a novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy. *Biochem. Pharmacol.*, 82: 323-333.

Jiang, Q., Zhang, S., Tian, M., Zhang, S., Xie, T., Chen, D., Chen, Y., He, J., Liu, J., Ouyang, L. y Jiang, X. (2015). Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Prolif.*, 48, 17–28.

Jiang, S., Ma, Z. y Ramachandran, S. (2010). Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evol. Biol.*, 10: art. 79.

Jiménez, P., Cabrero, P., Córdoba-Díaz, D., Córdoba-Díaz, M., Garrosa, M. y Girbes, T. (2017). Lectin digestibility and stability of elderberry antioxidants to heat treatment in vitro. *Molecules*, 22(1): art. 95.

Jiménez, P., Tejero, J., Córdoba-Díaz, D., Quinto, E., Garrosa, M., Gayoso, M. y Girbés, T. (2015). Ebulin from dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.): a mini-review. *Toxins*, 7: 648-658.

Jiménez, P., Tejero, J., Córdoba-Díaz, D., Cabrero, P. y Girbés, T. (2013). Differential sensitivity of lectins from fruits of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) to a simulated gastric fluid. *Food Chem.*, 36: 794-802.

Kaltner., H, Abad-Rodríguez, J., Corfield, A., Kopitz, J. y Gabius, H. (2019). The sugar code: letters and vocabulary, writers, editors and readers and biosignificance of functional glycan-lectin pairing. *Biochem. J.*, 476: 2623-2655.

Keyaerts, E., Vijgen, L., Pannecouque, C., Van Damme, E., Peumans, W., Egberink, H., Balzarini, J. y Van Ranst, M. (2007). Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antivir. Res.*, 75: 179–187.

Kobert, R. (1913). Beiträge zur Kenntnis der vegetabilischen Hämagglutinine. *Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen*, 70: 97–151.

Laine, R. (1997). The information-storing potential of the sugar code. En *Glycosciences: Status and Perspectives* (Gabius, H.-J. and Gabius, S., eds.), pp. 1–14, Chapman & Hall.

Lannoo, N. y Van Damme, E. (2019). Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1800: 190-201.

Lapadula, W., y Ayub, M. (2017). Ribosome Inactivating Proteins from an evolutionary perspective. *Toxicon*, 136: 6-14.

Lee, K., Yu, C., Chiu, T., Sze, K., Shaw, P. y Wong, K. (2019). Solution structure of the dimerization domain of the eukaryotic stalk P1/P2 complex reveals the structural organization of eukaryotic stalk complex. *Nucleic Acids Res.*, 40: 3172–3182.

Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. y Poirier, F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconjugate J.*, 19: 433–440.

Levroney, E., Aguilar, H., Fulcher, J., Kohatsu, L., Pace, K., Pang, M., Gurney, K., Baum, L. y Lee, B. (2005). Novel innate immune functions for galectin-1: Galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.*, 175: 413-442.

Linnartz-Gerlach, B., Mathews, M. y Neumann, H. (2014). Sensing the neuronal glycocalyx by glial sialic acid binding immunoglobulin-like lectins. *Neuroscience*, 275: 113-124.

Lingwood, D. y Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327: 46-50.

Liu, B., Bian, H. y Bao, J. (2010). Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett.*, 287, 1–12.

Loh, S., Park, J., Cho, E., Nah, S. y Kang, Y. (2017). Animal lectins: potential receptors for ginseng polysaccharides. *J. Ginseng Res.*, 41: 1-9.

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

Magnusson, S., Kjekken, R., y Berg, T. (1993). Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells. *Exp. Cell Res.*, 205: 118–125.

Martínez-Carmona, M., Izquierdo, I., Colilla, M. y Vallet-Regí, M. (2019). Concanavalin A-targeted mesoporous silica nanoparticles for infection treatment. *Acta Biomaterialia*, 96: 549-556.

Martínez-Carmona, M., Lozano, D., Colilla, M. y Vallet-Regí, M. (2018). Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment. *Acta Biomaterialia*, 65: 393-404.

McEver, R. (2015). Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res.*, 107:331-339.

Mitchell, S.W. (1860). Researches upon the venom of the rattlesnake. *Smithson Contrib. Knowl.*, XII: 89–90.

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

Muñoz, R., Arias, Y, Ferreras, J.M, Rojo, A. Jiménez, P y 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.

Muñoz, R., Arias, Y., Ferreras, J., Rojo, M., Gayoso, M., Nocito, M., Benitez, J., Jimenez, P., Bernabeu, C., y Girbes, T. (2007). Targeting a marker of the tumour neovasculature using a novel anti-human CD105-immunotoxin containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett.*, 256: 73–80.

Muñoz, R., Arias, Y., Ferreras, J., Jiménez, P., Langa, C., Rojo, M., Gayoso, M., Córdoba-Díaz, D., Bernabéu, C., y Girbés, T. (2013). *In vitro* and *in vivo* effects of an anti-mouse endoglin (CD105)-immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumours. *Cancer Immunol. Immunother.*, 62: 541-551.

Murugaiah V, Tsolaki AG, Kishore U. (2020). Collectins: Innate Immune Pattern Recognition Molecules. *Adv Exp Med Biol.*, 1204:75-127.

Narimatsu, H., Sawaki, H., Kuno, A., Kaji, H., Ito, H. y Ikehara, Y. (2009). A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS J.*, 277: 95-105.

Nielsen, K., y Boston, R.S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 785-816.

Nirenberg, M. y Matthaei, J. (1961). The dependence of cell- free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 47: 1589-1602.

Nsimba-Lubaki, M., y Peumans, W.J. (1986) Seasonal Fluctuations of Lectins in Barks of Elderberry (*Sambucus nigra*) and Black Locust (*Robinia pseudoacacia*). *Plant Physiol.*, 80: 747-751.

Ogawa, t., Watanabe, M., Naganuma, N. y Muramoto, K. (2011). Diversified Carbohydrate-Binding Lectins from Marine Resources. *J. Amino Acids*, Art. 838914.

Olsnes S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, 44: 361-370.

Ostermann, T., Appelbaum, S., Poier, D., Boehm, K., Raak, C. y Büssing A. (2020). A Systematic Review and Meta-Analysis on the Survival of Cancer Patients Treated with a Fermented *Viscum album* L. Extract (Iscador): An Update of Findings. *Complement Med Res.*, 27: 260-271.

Otte, S., Belden, W., Heidtman, M., Liu, J., Jensen, O. y Barlowe, C. (2001). Erv41p and Erv46p: New components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex. *J. Cell Biol.*, 152: 503–518.

Papaloucas, M., Papaloucas, C., y Stergioulas, A. (2008). Ricin and the assassination of Georgi Markov. *Pak J Biol Sci.*, 11: 2370-2371.

Pascal, J., Day, P., Monzingo, A., Ernst, S., Robertus, J., Iglesias, R., Pérez, Y., Ferreras, J., Citores, L. y Girbés, T. (2001). 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin I. *Proteins*, 43: 319-326.

Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. y Kreitman, R. (2006). Immunotoxin therapy of cancer. *Nature Rev. Cancer*, 6: 559-565.

Pauling, L y Corey, R. (1953). A proposed structure for the nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 39: 84-97.

Peumans, W. y Van Damme E. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, 109: 347-352.

Puerto-Camacho, P., Amaral, A., Lamhamedi, S., Menegaz, B., Castillo-Ecija, H., Ordóñez, J., Domínguez, S., Jordan, C., Díaz, J., Romero, L., Lopez, M., Civantos, G., Robles, M., Biscuola, M, Ferrer, C., Mora, J., Cuglievan, B., Schadler, K., Seifert, O., Kontermann, R., Pfizenmaier, K., Simón, L., Fabre, M., Carcaboso, A., Ludwig, J. y deÁlava, E. (2019). Preclinical efficacy of endoglin-targeting antibody-drug conjugates for the treatment of Ewing sarcoma. *Clin. Cancer Res.*, 25: 2228-2240.

Rabinovitch, G., Toscano, M., Ilarregui, J. y Rubinstein, N. (2004). Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses, *Glycoconjugate J.*, 19: 565–573.

Ran, H., Liu, Y., Wu, C. y Cao, Y. (2020). Phylogenetic and Comparative Analyses of Complete Chloroplast Genomes of Chinese *Viburnum* and *Sambucus* (*Adoxaceae*). *Plants- Basel*, 9 (9). Art. 1143.

Ribeiro, J. y Mahal, L. (2013). Dot by dot: analyzing the glycome using lectin microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17: 827-831.

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

- Roth, J. (2011). Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell. Biol.* 136:117–130.
- Saijo, S. y Iwakura, Y. (2011). Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol.*, 23: 467-472.
- Sandvig, K. y van Deurs, B. (1999). Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries. *FEBS Let.*, 452: 67-70.
- Santibañez, J., Quintanilla, M. y Bernabeu, C. (2011). TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.*, 121: 233-251.
- Shahidi-Noghabi, S., Van Damme, E., Iga, M., y Smagghe, G. (2010). Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. *J. Insect Physiol.*, 56: 1101-1107.
- Sharon, N. y Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53R-62R.
- Shi, Z., Li, W., Tang, Y. y Cheng, L. (2017). A Novel Molecular Model of Plant Lectin-Induced Programmed Cell Death in Cancer. *Biol. Pharm. Bull.*, 40: 1625-1629.
- Shibuya, N., Goldstein, I., Broekaert, W., Nsimba-Lubaki, N., Peeters, B. y Peumans, W. (1987b). Fractionation of sialylated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins on immobilized elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 254: 1-8.
- Shibuya, N., Goldstein, I., Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., y Peumans, W. (1987a). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac( $\alpha$  2-6)Gal/N-Ac-Gal sequence. *J. Biol. Chem.*, 262: 1596-1601.
- Silva, M., Gutiérrez, E., Rodríguez, J., Gomes, C. y David, L. (2014). Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen. *Biosen. Bioelectr.*, 57: 254-261.
- Simpson, J., Smith, D., Roberts, L. y Lord, J. (1998). Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp. Cell Res.*, 239: 293–300.

Sowa-Rogozińska, N., Sominka, H., Nowakowska-Gołacka, J., Sandvig, K., y Słomińska-Wojewódzka, M. (2019). Intracellular Transport and Cytotoxicity of the Protein Toxin Ricin. *Toxins*, 11, 350.

Spooner, R. y Lord, J. (2015). Ricin Trafficking in Cells. *Toxins*, 7: 49–65.

Stillmark, H. (1888). H. "Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen Euphorbiaceen". Tesis Doctoral. Dorpat (ahora Tartu, Estonia).

Stirpe, F. y Battelli, M. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 1859-1866.

Sumner, J., y Howell, S. (1936). Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.*, 32: 227–237

Svinth, M., Steinghardt, J., Hernandez, R., Duh, J.K., Kelly, C., Day, P., Lord, M., Girbés, T., y Robertus, J.D. (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

Teichberg, V., Silman, I., Beitsch, D., y Resheff, G. (1975). A  $\beta$ -D-galactoside-binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 72: 1383–1387.

Tejero, J., Jiménez, P., Quinto, E., Córdoba-Díaz, D., Garrosa, M., Córdoba-Díaz, M., Gayoso, M.J., y Girbés, T. (2015). Elderberries: a source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity. *Molecules*, 20: 2364-2387.

Tsaneva, M. y Van Damme, E. (2020). 130 years of plant lectin research. *Glucoconjugate J.*, 37: 533-551.

Untersmayr, E., Ellinger, A., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Gabor, F. y Jensen-Jarolim, E. (2004). Functionalisation of allergen-loaded microspheres with wheat germ agglutinin for targeting enterocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315: 281-287.

VanDamme, E., Barre, A., Rouge, P., VanLeuven, F. y Peumans, W. (1996). Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrin b), a N-Ac-Gal-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). *Eur. J. Biochem.*, 237: 505-513.

Van Damme, E., Fouquaert, E., Lannoo, N., Vandendorre, G., Schoupe, D., y Peumans, W. (2011). Novel concepts about the role of lectins in the plant Cell. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 705: 271-294.

Van Damme, E., Roy, S., Barre, A., Citores, C., Mostafapous, K., Rougé, P., Van Leuven., F., Girbés, T., Goldstein, I., y Peumans, W. (1997). Elderberry (*Sambucus nigra*) bark contains two structurally different Neu5Ac( $\alpha$ 2,6)Gal/N-Ac-Gal-binding type 2 ribosome inactivating proteins. *Eur. J. Biochem.*, 245, 648-655.

Van Deurs, B., Pedersen, L., Sundan, A., Olsnes, S. y Sandvig, K. (1985). Receptor-mediated endocytosis of a ricin-colloidal gold conjugate in vero cells. Intracellular routing to vacuolar and tubulo-vesicular portions of the endosomal system. *Exp. Cell Res.*, 159: 287–304.

Van Holle, S. y Van Damme, E. (2018). Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. *Biochem. Soc. Trans.*, 46: 217–233.

Vandendorre, G., Smagghe, G. y Van Damme, E. (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochem.*, 72: 1538–1550.

Walter, F., Schöll, I., Untersmayr, E., Ellinger, A., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Gabor, F. y Jensen-Jarolim, E. (2004). Functionalisation of allergen-loaded microspheres with wheat germ agglutinin for targeting enterocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315: 281-287.

Watkins, W. y Morgan, W. (1952). Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature*, 169: 825–826.

Watson, J. y Crick, F. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 4356: 737-738.

Wilkins, M., Stokes, A. y Wilson, H. (1953). Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature*, 4356: 738-740.

Winterburn, P. y Phelps, C. (1972). The significance of glycosylated proteins. *Nature*, 236: 147–151.

Wright, C. (1977). The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 Å. *J. Mol. Biol.*, 111: 439-457

Yadav, K, Yadav, A, Vashistha, P, Pandey, V. y Dwivedi, U. (2019). Protein Misfolding Diseases and Therapeutic Approaches. *Curr Protein Pept Sci.*, 20: 1226-1245.

Yang, R., Rabinovich, G. y Liu, F. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev. Mol. Med.*, 10:e17.

Zamecnik, P., Keller, E., Littlefield, J., Hoagland, M. y Loftfield, R.B. (1956). Mechanism of incorporation of labeled amino acids into protein. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 47: S81-S101

Zhang, L., Luo, S. y Zhang, B. (2016). The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins. *MAbs.* 8, 524–535.

CONTESTACIÓN DEL EXCMO. SR. DON FIDEL ORTEGA ORTIZ DE  
APODACA  
AL DISCURSO DE INGRESO  
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO  
DEL EXCMO. SR. DON TOMÁS GIRBÉS JUAN.

29 DE ABRIL DE 2021  
EN LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA.

# DISCURSO DE CONTESTACIÓN

Excmo. Sr. Presidente

Excmas. y Excmos. Sras. y Sres. Académicos

Señoras y Señores

Es un verdadero placer tener el privilegio y la oportunidad que me ofrece la corporación de poder presentar al Profesor **TOMAS GIRBÉS JUAN** en este acto solemne de su toma de posesión. Y quiero agradecer de modo especial a la Junta de gobierno mi designación para hacerlo por dos motivos. En primer lugar, por su confianza y además por tener la oportunidad de cederle el testigo de la medalla nº 5 que durante 40 años ostento mi padre D. Manuel Ortega Mata. (Aquí presente)

Para ello realizaré un recorrido sobre su trayectoria singular en la que intentaré glosar, no sólo los méritos académicos y científicos que concurren en su persona y que justifican su elección como Académico numerario, sino que procuraré también acercarme a la componente humana que no siempre se hace tan visible de manera explícita.

## TRAYECTORIA VITAL

Tomás Girbés Juan nació el 18 de Julio de 1951 en **Algemesí**. Y allí paso los primeros 12 años de su vida, que según sus propias palabras era como la de los otros niños. Sus padres Tomas, dedicado a la agricultura, y Ángeles a sus labores, no tenían estudios.

Los buenos recuerdos de su niñez, a los que retorna de manera recurrente, andan perdidos en las playas de “*El Perelló*” que marcan la salida de la Albufera de Valencia al mar.

Allí Asistió primero al colegio de los escolapios y después ya de manera más estable a los maristas.

En 1963 su familia se trasladó a Madrid y para no romper la línea educativa continuó sus estudios en el colegio San José de los Hermanos Maristas en la calle Fuencarral y después en el de Chamberí, donde cursó el

Bachillerato Elemental. No obstante, dejó el colegio a los 14 años, cuando su padre le puso a trabajar de lavacoches con él, en una estación de lavado y engrase de automóviles, por lo que continuó estudiando en el Instituto Cardenal Cisneros, en la calle de los Reyes, por libre, y con las dificultades imaginables.

Aun así, en 1968 cursó el preuniversitario, el famoso “Preu” y en 1969 inició sus estudios universitarios de Ciencias Químicas en la UCM que concluyó en 1974. Ese mismo año se matriculó, por primera vez, en la Facultad de Farmacia de la universidad Complutense para cursar la licenciatura, que abandonó temporalmente.

Tiene recuerdos entrañables de algunos profesores de la Facultad de Ciencias. Como los de **Ángel Martín Municio**, Catedrático de Bioquímica, quien siempre decía que había que tratar de hacer lo mejor posible todo lo que se abordase. Con el pasar de los años estableció una cordial relación con él. Otro profesor del que guarda buen recuerdo es el Prof. **Luis Franco Vera** que se encargaba entonces de las Técnicas Instrumentales Bioquímicas. En 1973 el Prof. Luis Franco le aconsejó que fuese a hablar con el **Dr. David Vázquez**, a la sazón Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Este le aceptó en su laboratorio para hacer la Tesina de Licenciatura bajo la dirección del Dr. **Juan Modolell Mainou**, y que trató sobre la obtención de polisomas endógenos de *Escherichia coli*. Este trabajo se publicó en 1979 en “*Methods in Enzymology*”

Realizó la Tesis Doctoral también bajo la dirección del **Dr. Modolell** sobre la utilización de análogos estructurales no hidrolizables de GTP en las etapas intermedias, que conducen a la biosíntesis de proteínas y el mecanismo mediante el cual el factor de elongación G (EF-G) podría interactuar con el ribosoma. Leyó la Tesis en septiembre de 1977 e inmediatamente se incorporó al servicio militar en el IMEC del Ejército del Aire en Zaragoza, donde estuvo dieciocho meses. Durante ese periodo optó a una oposición de colaborador del CSIC en el **Instituto de Fermentaciones Industriales**, que aprobó sin plaza.

Al acabar el servicio militar regresó a Madrid e inició su peregrinaje por los laboratorios que conocía, pasando por 2 institutos de investigación del CSIC y 4 universidades, antes de su adscripción definitiva a la universidad de Valladolid.

## ACTIVIDAD DOCENTE Y PROFESIONAL

Su primera actividad profesional fue en 1975 al acabar la Tesina de Licenciatura, como Contratado en el Instituto de **Bioquímica de Macromoléculas** del Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.). Después en el periodo 1975-1977 fue becario del Plan de Formación de Personal Investigador en el mismo instituto, ya perteneciente al Centro de Biología Molecular “**Severo Ochoa**”.

En 1979 el Dr. **D. Roberto Parrilla**, Profesor Agregado de Bioquímica en la Cátedra del Profesor D. Alberto Sols, de la Universidad Autónoma de Madrid, le ofreció un contrato como Ayudante de Biofísica en la Facultad de Medicina.

En 1993 realizó una estancia como *Research Fellow* en el Departamento de Patología del **Hospital Universitario Hahnemann** en Philadelphia, EEUU.

Desde sus comienzos como docente en 1979, el Prof. Girbés ha desempeñado todas las categorías de profesor universitario, Profesor Ayudante, Adjunto contratado y Agregado interino de Fisiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura; Adjunto Numerario de Bioquímica en la Universidad de León, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid y últimamente Catedrático de Nutrición y Bromatología en la Facultad de Medicina de la misma universidad.

Durante todo este tiempo ha impartido numerosas disciplinas de primero, segundo y tercer ciclo, en las áreas de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular y de Nutrición y Bromatología.

Se le han concedido 6 tramos de docencia (quinquenios) hasta diciembre de 2008.

En 1999 fue nombrado Académico Correspondiente de esta Real Academia Nacional de Farmacia, a propuesta de los profesores Ruiz Amil, Juan Tamargo y Antonio Portolés. El discurso de ingreso versó sobre las proteínas inactivadoras de ribosomas y se publicó en los Anales de la Real Academia de Farmacia.

En el año 2002 compareció en la **Comisión de Ciencia y Tecnología del Senado** en sesión informativa de la Ponencia para el estudio y la

valoración de la legislación española en el campo de la bioética y la biotecnología.

Su contacto con algunos miembros de la Academia y la continua y perseverante indicación del Profesor D. Manuel Ruiz Amil de que finalizara sus estudios de Farmacia, le llevó a matricularse de nuevo en septiembre de 2006, y a los 55 años, consiguió el **Título de Licenciado**, obteniendo en 2009 el **Título de Doctor** en el Programa de Farmacia, con mención de calidad, del **Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica** de la Universidad Complutense.

En 2007, por recomendación del Consejero de Educación del gobierno regional, solicitó el cambio de área de conocimiento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias al área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Medicina, que estaba con un solo Profesor Titular y era una disciplina de Farmacia.

En cuanto a premios, ha obtenido el premio **del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid en el 2002**, concedido por la Real Academia Nacional de Farmacia y el **premio Castilla y León 2002 de Investigación Científica y Técnica** concedido por la Junta de Castilla y León. Otros premios han sido el Premio **“El Norte de Castilla”** en 1996 a la investigación científica realizada en Castilla y León y el premio **“Julio del Moral Maestro”** 2007 de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid, de la que es Académico Correspondiente desde el año 2008.

Es también Académico de Número de la Academia de Farmacia de Castilla y León desde el año 2019.

## **ACTIVIDAD INVESTIGADORA**

El Prof. Girbés está en posesión de 6 tramos de investigación (sexenios) concedidos hasta diciembre de 2013.

Ha dirigido 29 Tesis Doctorales y tiene pendientes de lectura otras dos. Los estudios realizados por el Prof. Girbés se pueden agrupar en tres líneas de investigación básica y aplicada.

1. Estudios moleculares sobre la biosíntesis de proteínas y los efectos de antibióticos sobre el ribosoma de *Escherichia coli* (línea predoctoral).

2. Aislamiento, estudio Físico-químico, estructural y funcional, inmunológico y toxicológico de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs). (línea principal)

3. Construcción de inmunotoxinas y conjugados contra células tumorales con anticuerpos monoclonales, contra la neovascularización tumoral con proteínas inactivadoras de ribosomas. (línea adicional)

Fruto de esta actividad investigadora, marcada por varios cambios geográficos, han sido 120 trabajos en revistas científicas internacionales indexadas en el *Journal of Citation Reports* (2019) del ISI *Web of Knowledge*, sobre síntesis de proteínas, lectinas, toxinas vegetales e inmunotoxinas con 103 autorías principales, diversas publicaciones en revistas no indexadas y capítulos de libro científico, 25 patentes recogidas en *Espacenet Worldwide database* y más de 100 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales.

En cuanto a la financiación de esta actividad, ha dirigido 37 proyectos de investigación, contratos y convenios, que han sido financiados por instituciones públicas de ámbito nacional, autonómico y privadas.

Ha sido referee de más de 50 revistas científicas internacionales y miembro del comité editorial de 3 de ellas. Ha sido también evaluador de proyectos de investigación de las agencias nacionales y algunas internacionales (China, Italia, Sudáfrica, Uruguay y Bélgica).

Uno de los mejores momentos en su investigación fue cuando su equipo consiguió aislar y caracterizar un nuevo tipo de lectinas antirribosómicas del tipo de la ricina, pero mucho menos tóxicas que ésta.

Como dice el prof. Girbés: “Preparé dos manuscritos, uno con *nigrina* de corteza de *Sambucus nigra* que envié como manuscrito acelerado a la revista *Plant Molecular Biology* y el otro, con *ebulina* de hojas, a la revista *Journal of Biochemical Chemistry* para así evitar retrasos y bloqueos interesados, como después me encontré en varias ocasiones. Aceptaron los dos manuscritos tal y como estaban con un mínimo retoque de algunos errores del inglés. Ambos trabajos se publicaron en 1993”.

Otro de los momentos importantes de su grupo está relacionado con la remolacha azucarera.

En 1996, detectaron dos RIPs de una cadena polipeptídica que denominaron **beetins** en razón a su nombre latino *Beta vulgaris*. Después de su aislamiento, purificación y caracterización pudieron encontrar que se inducían por infección viral. Los resultados se publicaron en la revista *Nature*. Confiesa que los envió sin mucha convicción de que fueran aceptados, pensando que le serían devueltos a vuelta de correo. Pero para

su sorpresa el editor de la revista le comunicó que publicaría una versión más corta, con lo más relevante que ilustrase el mensaje de inducción vírica de las *beetins*.

## **EXPERIENCIA EN GESTIÓN**

En el año 2000 fue nombrado Presidente de la Subcomisión 1.2 de Ingeniería Molecular del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), del Instituto de Salud Carlos III, que incluía las áreas de *Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Inmunología, Genética y Oncología*, cargo que ocupó hasta principios de 2004, implicado en una intensa actividad organizativa y evaluadora.

En 2009, la ANECA le propuso como experto del **Programa ACADEMIA**. En enero de 2014 le propuso por concurso como vocal de la Comisión Nacional de Acreditación de Profesores Titulares de Ciencias de la Salud del Programa Academia de ANECA y después en julio de 2014 como Presidente de la Comisión, hasta finales de 2017.

En 2016 fue nombrado también Presidente de la Comisión Nacional de Acreditación de Profesores Titulares de Especialidades Sanitarias (B8) del Programa Academia de ANECA 3.0 y de la Sub-comisión de Catedráticos, con el encargo de liderar y coordinar la elaboración de los primeros nuevos criterios de acreditación para las comisiones de Ciencias de la Salud.

En palabras del Prof. Girbés, esta labor fue tan intensa y agotadora que, una vez finalizada, solicitó ser relevado en enero de 2018.

## **COMENTARIOS AL DISCURSO DE INGRESO**

El Profesor Girbés nos ha hablado en su discurso de ingreso de las lectinas y su papel de elemento transductor del flujo de la información celular y tisular. Su discurso se puede desglosar en varias partes.

En primer lugar, ha introducido el tercer alfabeto: **el de azúcares**. El primer código que se descifró fue el código genético.

El Prof. Girbés ha recordado los hitos más importantes que permitieron averiguar como la información contenida en el ADN se traduce en las proteínas. Nos ha introducido el código de azúcares y su papel en la denominada *glicómica funcional*. Los azúcares en todas sus formas, monómeros, oligómeros y polímeros se reconocen también como moléculas informativas y pueden considerarse como el “**tercer alfabeto de la vida**” que se añade al **primero**, los nucleótidos y al **segundo** los aminoácidos.

Nos ha explicado también que en términos de capacidad de codificación los glicanos ofrecen un potencial de codificación de muchos ordenes de magnitud, respecto al mismo número de nucleótidos del ADN. Por tanto, los glicanos constituyen una poderosa vía para presentar señales de reconocimiento celular en un espacio mínimo.

Los elementos de identificación de dichas señales son las **lectinas**. Dichas proteínas son capaces de interactuar con los polisacáridos de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular, gracias a lo que se conoce como dominios de reconocimiento de carbohidratos o CDR (de: *carbohydrate recognition domain*”).

Como bien ha expuesto el profesor Girbés, las lectinas están presentes en plantas, microorganismos, animales vertebrados e invertebrados y hongos. Se conocen una gran cantidad de lectinas, particularmente de plantas, lo que ha permitido todo tipo de estudios estructurales y funcionales. En mamíferos se conoce la función de muchas de las lectinas en procesos celulares, tales como *adhesión, migración, señalización, apoptosis, etc.*, y en general se las considera como moléculas de reconocimiento celular.

En las plantas y hongos juegan un papel de protección frente a patógenos. Nos ha hablado de las denominadas **quimerolectinas** en particular de las de plantas. Estas constan de dos cadenas del tipo A-B y A-B5, en la que A es un dominio catalítico con actividad enzimática y B una lectina. Las A-B son de plantas y las A-B5 son de bacterias.

En las lectinas de plantas la cadena A es una *N-glicosidasa del ARN ribosómico* y la cadena B *es una lectina*. Estas lectinas se denominan también RILs (de: *ribosome-inactivating lectins*).

Como ejemplo de RIL vegetal nos ha hablado de la ricina, que es con mucho la lectina toxica más investigada hasta el momento, de su estructura, su internalización vía retículo endoplásmico rugoso y de los procesos moleculares implicados. Nos ha recordado los estudios de **Paul Ehrlich**

sobre **ricina** y **abrina** y de cómo estos le permitieron acuñar el concepto “*Corpora non agunt nisi fixata*” (Los cuerpos no actúan si no se fijan) que fue la base de su concepto de *bala mágica* o “*Zauberkuigel*”, base de la terapia guiada al blanco.

Ha introducido las **RILs** presentes en los saúcos, *Sambucus nigra* y *Sambucus ebulus*, ebulinas y nigrinas que fueron descubiertas por su grupo de investigación y como dichas nuevas proteínas son mucho menos tóxicas, debido a una alteración en el sitio de fijación de azúcar de alta afinidad que determina que sigan una ruta lisosómica.

El Prof. Girbés ha hablado de las lectinas animales, centrándose especialmente en las *galectinas* que fijan galactosa y galactósidos, y las *siglecs* que fijan ácido siálico. Estas lectinas animales están implicadas en el reconocimiento y señalización celular.

En una tercera parte nos ha hablado de las aplicaciones de las lectinas en la agricultura, en las técnicas instrumentales en la biomedicina y en la elaboración de fármacos. De estos nos ha puesto ejemplos de cómo se pueden utilizar en la fabricación de nanosistemas con sistemas mesoporosos y nanopartículas.

## CONSIDERACIONES FINALES

Hoy hemos podido disfrutar, de la mano del profesor Girbés, además de un elaborado discurso con una poderosa carga científica, también de un testimonio de gratitud a la altura de una persona modesta, generosa y agradecida.

Una persona inquieta hecha a sí misma, que reconoce que “*Desafortunadamente estuvo poco tiempo con sus maestros, pero que su huella marcó el estándar que tenía que seguir*”. Otra muestra más de agradecimiento y reconocimiento sincero, por su parte, que tanto contrasta con la generación actual.

Me recuerda lo afortunados que hemos sido algunos que hemos podido disfrutar de una tutela larga y fructífera de nuestros maestros.

“*No tener maestro es no tener a quien preguntar y más hondamente todavía, no tener ante quien preguntarse*” decía María Zambrano

Su carácter afable y bondadoso le ha abierto todas las puertas a las que ha llamado y dice con orgullo que cuenta con amigos de verdad de los

que te animan y te ayudan cuando estás decaído. Quizás por este motivo en el año 2006 se presentó a Rector de la Universidad de Valladolid, unas elecciones muy politizadas por los grandes partidos, qué, como él dice, “gracias a Dios” no ganó, pero que le permitieron establecer contacto con muchísima gente dentro y fuera de la Universidad.

El haber ganado el Premio de Castilla y León de Investigación Científica y Técnica le ha permitido durante varios años ser vocal y Presidente del Jurado de dichos premios y por ello ha conocido a personas de todas las edades y ambientes universitarios y sociales de Castilla y León.

Valora mucho la amistad y la lealtad, que practica como principio sin límite de edad, lo que encaja en el pensamiento de Fernando Pessoa: ***“Escojo a mis amigos por la cara lavada y el alma expuesta. No quiero amigos adultos ni comunes. Los quiero mitad infancia y mitad vejez. Niños para que no se olviden del valor del viento en el rostro y ancianos para que nunca tengan prisa.”***

Tomás no ha presumido hoy de su faceta como escritor y del hecho de que ha publicado numerosos artículos de divulgación en periódicos locales, y de haber sido durante más de dos años columnista semanal del ABC de Castilla y León y durante dos años, también, colaborador en un programa en abierto en la radio Intereconomía, que le resultó muy aleccionador.

Le gusta pintar al óleo, le entretiene el bricolaje y le entusiasma la gastronomía, en particular la que rodea al mundo de las paellas. Conserva las recetas de su padre, que como buen labrador en Valencia las hacía muy bien. Hace años, junto con su mujer, ganaron un concurso de paellas en Valladolid, con poco ingrediente, exhibiendo sus trucos culinarios.

Valora la vida en Familia y los ambientes con poco ruido, por eso quizás, Tomás, con el paso del tiempo prefiere las opciones frío y montaña que el calor y la playa de su niñez.

Conoció a su esposa Pilar en el año 1976 en el laboratorio de David Vázquez, cuando estaba haciendo la Tesis Doctoral y desde entonces, se han acompañado mutuamente, no sólo en su vida doméstica sino también académica, ya que ella es profesora titular del área de Nutrición y Bromatología, y han colaborado estrechamente de sus inicios.

Tienen dos hijas, Ana y María que han seguido caminos distintos a los de sus padres ya que las dos son abogadas, y un nieto de 3 tres años y medio, de Ana, que les ha cambiado un poco la vida.

De acuerdo con Max Jacob, *“una obra no vale por lo que contiene sino por lo que la rodea”*.

La vida y la obra de Tomás están rodeadas de innumerables ingredientes, no como sus paellas, que lo convierten en una persona entrañable y admirable en todos los sentidos.

Hoy, Tomás, adquieres un compromiso y tienes un reto y una tarea difícil. La de estar a la altura de los académicos que llevaron la medalla nº 5.

Posees un don especial y tienes muchas de sus cualidades para poder conseguirlo y apuesto que lo harás sin lugar a duda.

Querido amigo te recibimos con la solemnidad que la ocasión y la Academia merece y te deseamos una larga y fructífera estancia entre nosotros, en esta centenaria Institución.

He dicho





