

————— *Artículo Original* —————

**Nigrina b: una proteína inactivadora
de ribosomas no tóxica del saúco.
Utilidad farmacéutica en la construcción
de inmunotoxinas y conjugados para la terapia
del cáncer***

TOMÁS GIRBÉS JUAN

*Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de
Farmacia*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Valladolid*

RESUMEN

El saúco posee una colección de proteínas inactivadoras de ribosomas, en particular las nigrinas, que parecen ser responsables de su toxicidad. La nigrina b (corteza) posee isoformas en frutos (nigrina f) y hojas (nigrina l) que se encuentran a mayor concentración en las fases iniciales del desarrollo. Nigrina b es 10^3 - 10^4 veces menos tóxica que la ricina, una proteína inactivadora de ribosomas relacionada estructuralmente con la nigrina b y extremadamente tóxica presente en *Ricinus communis* L., que se utiliza para la construcción de inmunotoxinas para la terapia del cáncer. Nigrina b se internaliza en las células superiores por una vía intracelular distinta a la de la ricina independiente de temperatura y de brefeldina A. La administración de dosis letales de nigrina b produce lesiones intestinales irreversibles específicas por destrucción de las criptas y desaparición del epitelio intestinal lo que ocasiona hemorragias intestinales letales. Los datos sobre estructura primaria de las nigrinas indican que la diferencia de toxicidad con la ricina se basa en cambios de aminoácidos clave en los dominios de fijación de galactosa en las cadenas B de ambas proteínas. Esta característica de la nigrina b es de enorme utilidad en la construcción de los denominados «proyectiles mágicos» o fármacos inteligentes capaces de interaccionar y destruir blancos específicos. Como ejemplos de dichos proyectiles mágicos se han construido conjugados transferrina-

* Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid 2002.

nigrina b/ebulina l que han mostrado ser efectivos contra células cancerosas que sobreexpresan el receptor de transferrina y una inmunotoxina antitumoral contra el CD105 de ratón que identifica a la células CD105+ y las destruye de manera selectiva tanto *in vitro* como *in vivo*. Ello convierte a la nigrina b en una herramienta útil en la inmunotoxiterapia del cáncer.

Palabras clave: Nigrina b.—Toxicidad.—Inmunotoxinas.—Cáncer.

SUMMARY

Nigrin b: a ribosome-inactivating protein from elder. Pharmaceutical utility in the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy

The present work on the non-toxic ribosome-inactivating protein nigrin b from elder (*Sambucus nigra* L.) bark considers the more significant data concerning this protein and highlights its pharmaceutical projection as component for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. Elder contains a collection of ribosome-inactivating proteins particularly nigrins that seem to be responsible of elder toxicity. Nigrin b (bark) has fruit (nigrin f) and leaves (nigrin l) isoforms which accumulated during the early stages of development. Nigrin b is 10^3 - 10^4 times less toxic than ricin, a highly toxic protein present in the seeds of *Ricinus communis* L. and which is being used in the construction of immunotoxins for cancer therapy. Nigrin b is internalised by a temperature-independent pathway in contrast to ricin which takes a temperature and brefeldin A-dependent pathway. Lethal doses of nigrin b led to the irreversible specific injury of the intestinal crypts which in turn promotes the splitting of the intestinal epithelium and further lethal intestinal bleeding. Sub-lethal doses of nigrin b promoted only reversible damage of the intestinal crypts. The data on nigrin b amino acid sequence indicated that some differences in key amino acids in the sugar binding subdomains of the B chains of ricin and nigrin b account for the different toxicities of these proteins. Such nigrin b feature is very useful for the construction of the «magic bullets» or intelligent medicaments able to interact and destroy specific targets. As examples of these «magic bullets» we constructed conjugates containing either nigrin b or ebulin l and transferrin which display specific cytotoxicity towards cancer cells, and an immunotoxin against mouse-CD105 which kills mouse-CD105+ cells both *in vitro* and *in vivo*. This makes to nigrin b a useful tool for cancer immunotoxitherapy.

Key words: Nigrin b.— Toxicity.— Immunotoxin.— Cancer.

INTRODUCCIÓN

El saúco (*Sambucus nigra*) es una planta medicinal de gran tradición en la medicina occidental desde la más remota antigüedad.

En la actualidad se utiliza de modo rutinario para un número creciente de aplicaciones y por ello ocupa un lugar cada vez más importante en la Farmacognosia moderna. La investigación más reciente indica que el saúco posee componentes responsables de sus efectos beneficiosos y de su toxicidad (flavonoides, compuestos cianogénicos, lectinas y proteínas inactivadoras de ribosomas).

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs de «ribosome-inactivating proteins») son toxinas de origen vegetal en su mayor parte y en algunos casos bacteriano, que provocan la inhibición irreversible de la biosíntesis de proteínas llevada a cabo por ribosomas de mamíferos, hongos, algunas plantas y algunas bacterias (revisiones en 1-7). La utilización de las RIPs como conjugado en forma de inmunotoxina o su utilización directa en la terapia de importantes enfermedades las ha convertido en una herramienta de extraordinaria utilidad siendo por lo tanto su estudio de gran importancia en particular en relación con la terapia del cáncer (8, 9) y del SIDA (10-12).

En la actualidad se clasifica a las RIPs en dos categorías: RIPs de tipo 1 y de tipo 2 (6, 7). Las RIPs de tipo 1 están formadas por una sola cadena polipeptídica que es la que presenta la actividad de inhibidor de síntesis de proteínas y son poco tóxicas para los animales. Las RIPs de tipo 2 están formadas por dos cadenas polipeptídicas disimilares, una cadena inhibidora de síntesis de proteínas equivalente a las RIPs de tipo 1 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 RIPs de tipo 2 pueden ser tóxicas como ricina, abrina, volkensina, viscumina y modeccina (6, 7), debido a que pueden atravesar las membranas celulares al reconocer y unirse a receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol (7). La tremenda toxicidad de la ricina, con independencia de la vía de administración, ha llevado a su consideración como arma de destrucción masiva. Es esta toxicidad la que reduce las posibilidades de su aplicación para la construcción de fármacos. No obstante, la ricina se ha venido utilizando en los últimos años en la construcción de inmunotoxinas para la terapia del cáncer (1-7).

Por otro lado las RIPs de tipo 2 pueden ser también no tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones, esto es, no tienen toxicidad alguna a las concentraciones utilizadas con las RIPs tóxicas tales como ricina, abrina, etc. Ejemplos de estas proteínas con menor toxicidad son ebulina I y nigrina b (14, 15).

En la actualidad se sabe que las RIPs están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Aproximadamente un tercio de las más de 500 plantas investigadas poseen actividad RIP, habiéndose aislado y caracterizado unas 70 proteínas diferentes, muchas de ellas con diferente especificidad ribosómica, inducibilidad y acumulación tisular y muy probablemente diferente función biológica. La familia *Sambucaceae* con mucha diferencia ha sido la más estudiada y hasta el momento y en la que mayor número de RIPs y lectinas se han encontrado.

Las RIPs no tóxicas de dos cadenas y las RIPs de cuatro cadenas, tóxicas y no tóxicas han sido descubiertas en nuestro laboratorio en la última década (7). En 1993 se encontraron dos RIPs de tipo 2, ebulina I aislada de las hojas de *S. ebulus* L. (14), y nigrina b, aislada de *S. nigra* L. (15). Estas proteínas de naturaleza ligeramente ácida, no presentan toxicidad para los ratones y las células humanas en cultivo hasta concentraciones extraordinariamente elevadas. La cadena A catalítica guarda 52 y 48 % de homología en la secuencia amino terminal de tricosantina y TAP 29, dos proteínas con propiedades inhibitorias de la replicación del virus del SIDA VIH-1 (16, 17). Posteriormente, se han aislado y caracterizado diversas RIPs de tipo 2 no tóxicas y de tipo 1 a partir de raíces (18) y frutos (19) de *S. ebulus*, L. y a partir de frutos de *S. nigra* L. (20, 21). Además, se ha encontrado otra RIP del mismo tipo en semillas de *S. nigra* L. que reacciona con anticuerpos policlonales de conejo frente a nigrina b (22). Trabajo posterior ha permitido el reconocimiento y caracterización parcial de otras dos RIPs no tóxicas de dos cadenas pero de carácter básico en hojas de *S. nigra* L. (nigrina I básica) y en corteza de *S. racemosa* L. (racemosina b) (Girbés y cols., patente EEUU 6,008,324). Además hemos aislado RIPs de tipo 1 a partir de las hojas de *S. ebulus* L. (23) y un nuevo tipo de RIP de tipo 2 a partir de corteza de *S. nigra* L. que tiene la particularidad de no tener actividad de lectina (24).

Distribución de la nigrina en *Sambucus nigra* l

La corteza de *S. nigra* L. contiene tres proteínas con capacidad para fijar D-galactosa e interaccionar con galactósidos y matrices polisacáridas con restos de D-galactosa terminal, SNAI, SNAII y nigrina b (7). Estas tres proteínas han sido caracterizadas y pueden aislarse mediante cromatografía de afinidad en Sepharose 6B tratada con ácido utilizándose lactosa o D-galactosa para liberarlas de la resina cromatográfica. En cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75, estas proteínas migran en tres picos perfectamente definidos y separados (15).

La concentración relativa de nigrina b es máxima en la corteza de plantas de primavera y verano y declina en otoño hasta casi desaparecer en invierno. En contraste, SNAI tiene su pico de concentración en verano, declinando la misma en otoño e incrementándose de nuevo en invierno. SNAII se acumula preferentemente en invierno alcanzando la mínima concentración en verano.

Por otro lado, investigamos la presencia la nigrina b en extractos de peciolo, de corteza con desarrollo primario y con corteza de desarrollo secundario, y encontramos que la nigrina se acumula preferentemente en la corteza con desarrollo secundario. Ello podría tener una relación directa con la toxicidad y carácter purgante de este tipo de corteza.

Dado que los extractos de hojas de *S. nigra* L. presentan también una fuerte actividad de inhibición de la biosíntesis de proteínas y un fuerte carácter purgante, en particular los brotes, investigamos la posible presencia de nigrina en hojas. Se encontró que las hojas poseen una isoforma de nigrina que hemos denominado nigrina l (dimérica de Mr 60.000 con una cadena A catalítica y una cadena B lectina unidas por un puente disulfuro) y dos lectinas específicas de D-galactosa que hemos denominado SNLlm (monomérica de Mr 30.000) y SNLld (dimérica de Mr 60.000 con dos cadenas idénticas unidas por un puente disulfuro). Como se muestra en la figura 1, nigrina l y SNLld migran conjuntamente en Superdex 75 mientras que SNLlm migra en un pico independiente.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (figura 1) revela que nigrina l solo está presente en bro-

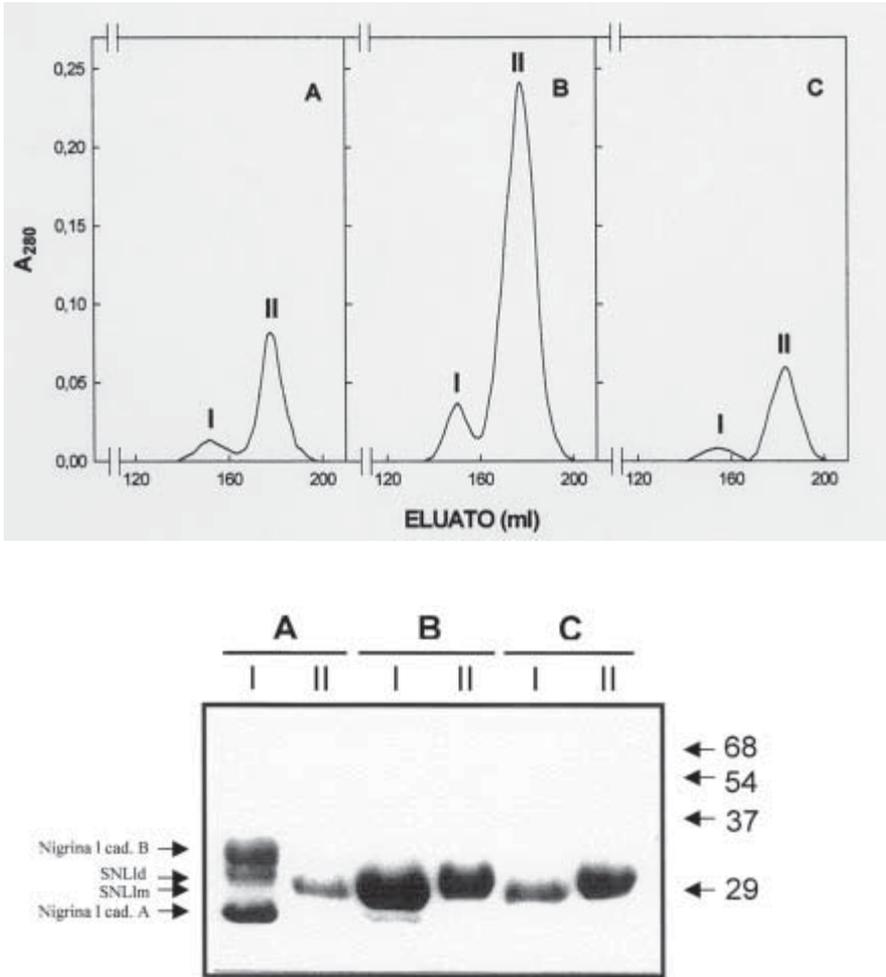


FIGURA 1. *Nigrina b* en hojas de ***Sambucus nigra L.*** Parte superior: cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75 de las proteínas fijadoras de galactosa aisladas de las hojas de *S. nigra L.* A, brotes de hojas; B, hojas maduras bien desarrolladas; C, hojas senescentes. En todos los casos el pico I es una mezcla variable de *nigrina I* y de SNLId y el pico II es únicamente SNLIm. Parte inferior: electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) en presencia de dodecil sulfato sódico y de 2-mercaptoetanol. Cada calle contiene 15 μ g de proteína. En A, el pico I contiene *nigrina I* cadena A (Mr 26.000), *nigrina I* cadena B (Mr 34.000) y SNLId (dos cadenas de Mr 30.000 cada una) mientras que el pico II contiene solo SNLIm (una cadena de Mr 30.000). En B, igual que en A, pero la *nigrina I* está casi ausente. En C, sólo hay lectinas en ambos picos.

tes de primavera mientras que desaparece en hojas maduras y senescentes. Las dos lectinas SNLIm y SNLId se acumulan preferentemente en hojas maduras, mientras que las hojas senescentes reflejan la situación de las hojas maduras pero en menor concentración de proteínas como corresponde a tejidos con metabolismo senescente.

Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio con frutos de *S. nigra* L. indican que los frutos verdes poseen otra isoforma de la nigrina muy activa al igual que nigrina b, denominada nigrina f que está ausente en frutos maduros (20). Esta es muy probablemente la causa de la toxicidad de los frutos verdes ingeridos directamente, recogida en la cultura popular.

Actividad enzimática de la nigrina b (toxicidad *in vitro*)

La actividad anti-ribosómica de la ricina se estableció en 1970 por Lin y cols. (25). Sin embargo no fue hasta 1987 cuando se descubrió el modo de acción molecular de la ricina por el grupo de Endo y cols. (26). Endo encontró en la cadena A de la ricina una actividad enzimática como N-glucosidasa del 28 S ARN ribosómico. Dicha actividad se encontró también en RIPs de tipo 1 monocatenarias como por ejemplo gelonina, saporina, petroglauquinas, musarminas, etc, (26-30). Después se encontró la misma actividad enzimática también en nigrinas, ebulinas, y otras RIPs tanto de tipo 2 como de tipo 1 (7).

La actuación enzimática de la nigrinas y las ebulinas provoca la hidrólisis del enlace N-glucosídico entre adenina y ribosa del nucleósido A₄₃₂₄ del 28 S rARN de hígado de rata y en consecuencia el ribosoma depurinado resultante es inactivo en síntesis de proteínas. La adenina liberada se encuentra en un lazo del ARN ribosómico muy conservado a través de la evolución (6). Dicha adenina es responsable de la interacción de los factores de translocación G en bacterias y 2 en organismos superiores con los correspondientes sitios ribosómicos (5-6). Por otro lado, la estabilización transitoria del factor de elongación G en la superficie ribosómica en forma de complejo cuaternario [ácido·fusídico·ribosoma·EF-G·GDP] previene la inactivación de los ribosomas de *E. coli* por la RIP de una cadena crotina 2 (31).

En cuanto a los ribosomas bacterianos datos de los últimos años indican que los ribosomas de *Escherichia coli* son sensibles a determinadas RIPs de una cadena pero no de dos cadenas (32-36).

Desde hace tiempo se sabe que las RIPs poseen propiedades antivirales tanto sobre virus animales como vegetales. De hecho una RIP de tipo 1 clásica como la PAP se describió primero como proteína antiviral (pokeweed antiviral protein) (37). Se ha descrito el efecto inhibitorio de las RIPs sobre la replicación de los virus animales como los de la polio (38), *Herpes simplex* (39) y HIV-1 (12, 16, 17, 39,40).

La nigrina ataca al ARN genómico del virus del mosaico del tabaco y provoca su multidepuración de manera que al tratar dicho ARN con anilina ácida se degrada rindiendo fragmentos que no son retenidos por los geles de poliácridamida utilizados para la detección del fragmento de ARN diagnóstico de la acción de la nigrina b (24). Este efecto directo sobre el ARN genómico viral lo llevan a cabo también las beetins 27 y 29, dos RIP de tipo 1 muy activas inducibles en las hojas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) por la infección viral (41). Ambas beetins se inducen también con mediadores químicos de defensa frente a virus como el ácido salicílico o peróxido de hidrógeno (41). Esto sugiere que el papel biológico de las RIPs, al menos las inducibles, podría estar relacionado con la defensa frente a virus orquestada en la planta por el proceso de infección.

Hemoaglutinación promovida por nigrina b

Nigrina b promueve la aglutinación de los eritrocitos humanos (AB-Rh+) a una concentración de 12,5 µg/ml. D-galactosa y lactosa inhiben eficazmente la aglutinación. Además, la nigrina b interacciona con mucina con la misma eficacia con independencia de la presencia o no de ácido siálico y ello a concentraciones de 0,1 µg/ml, lo que nos hace pensar en una interacción nigrina b-mucina altamente específica. Por otro lado, nigrina b reconoce mejor a la fetuina deprivada de ácido siálico que a la fetuina intacta. Ello indica que la nigrina b, además de interaccionar con algún motivo específico de las mucinas, reconoce restos terminales de D-galactosa en la fetuina.

Efectos celulares de la nigrina b

En 1993 se descubrieron en nuestro laboratorio un grupo de RIPs de dos cadenas no tóxicas (o poco tóxicas en comparación con la ricina) de las cuales ebulina l (14) y nigrina b (15) son las cabezas de lista. Nigrinas b, f y l y ebulinas l, r y f son inactivas sobre células humanas cultivadas, así como sobre ratones vivos hasta concentraciones muy elevadas, siendo su toxicidad 10^4 - 10^5 veces inferior a la de la ricina, aunque desde el punto de vista de actividad enzimática anti-ribosómica son proteínas muy similares ya que se trata de proteínas de la misma familia (14, 15, 18-21, 24).

Estudios funcionales recientes han permitido determinar que la diferencia entre ricina y ebulina l reside únicamente en la cadena B o cadena conductora que es responsable de la interacción de estas RIPs con los receptores de membrana plasmática (42). Por otro lado, la investigación comparada de nigrina b y de ricina nos ha revelado que ambas proteínas siguen una ruta intracelular distinta (43). Las moléculas de ricina se internalizan y después pasan por compartimentos endosómicos sensibles al NH_4Cl . Desde allí la ricina atraviesa compartimentos sensibles a temperatura que se bloquean a 18 °C. Finalmente, 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. La mayor parte (79%) de la ricina internalizada se degrada en los lisosomas, por lo que solo unas cuantas moléculas logran alcanzar el citosol a través del aparato de Golgi e inactivar a los ribosomas.

La nigrina b se internaliza inicialmente también a través de endosomas sensibles a NH_4Cl y se degrada también en su mayor parte (94%) en los lisosomas. Sin embargo a partir de los endosomas, la ruta seguida por la nigrina b es diferente a la seguida por la ricina ya que los efectos anti-ribosómicos obtenidos a altas concentraciones son independientes de temperatura e insensibles a brefeldina. Prácticamente todas las moléculas de nigrina b son transportadas desde los endosomas hacia los lisosomas, donde se degradan (43). Solo a concentraciones 4 o 5 órdenes de magnitud superiores a la ricina, se acumulan suficientes moléculas de nigrina b en los endosomas como para que se de la translocación espontánea de ni-

grina b desde el endosoma al citosol sin pasar por el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso.

Toxicidad in vivo de la nigrina b

Quizás la característica más notable de la nigrina b es su baja toxicidad in vivo comparada con la ricina, y esto a pesar de que es incluso más activa que la ricina en su actividad molecular anti-ribosómica (IC_{50} en lisados de reticulocitos de conejo de 0,03 nM para nigrina y 0,1 nM para ricina).

Para comparar la toxicidad in vivo en ratones de la nigrina b con la ricina, procedimos a inyectar por la vena de la cola concentraciones variables de ricina o nigrina b. Como se puede apreciar en la figura 2, la inyección de 3 μ g por kg de ricina provoca la muerte de todos los animales en un plazo máximo de 5 días. Al aumentar la concentración aumenta la toxicidad, y el plazo de muerte de los animales se reduce a un periodo de entre 24 y 36 h. En contraste con

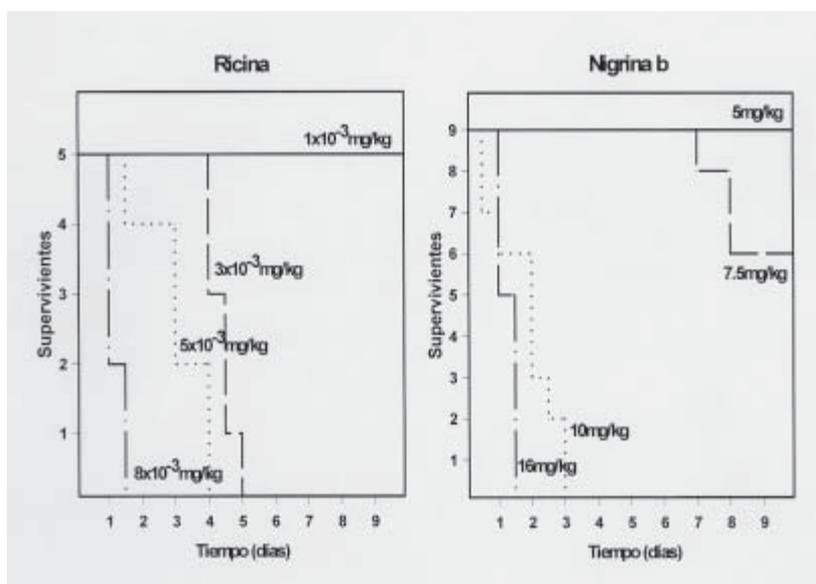


FIGURA 2. Toxicidad in vivo en ratones de ricina y de nigrina b. Se utilizaron ratones de la raza CD1 a los que se inyectaron las cantidades indicadas por la vena de la cola y se examinó su supervivencia con el tiempo.

la ricina, la nigrina b no ejerce efecto letal a 5 mg por kg. A 7.5 mg por kg, algunos animales mueren, pero a los 7-8 días. Para matar a los animales en tres días se necesitan al menos 10 mg por kg. La inspección *post-mortem* de los animales como consecuencia de la administración de dosis letales de nigrina b revela en muchos casos que se han producido grandes hemorragias en el intestino delgado en los ratones tratados, llegándose a la destrucción del mismo a dosis letales (superiores a 5 mg/kg de peso corporal).

El análisis histopatológico mostró un daño profundo en las criptas del intestino delgado sin daño aparente en otro tejidos. Los resultados que se han obtenido indican que nigrina b causan la muerte de las células de las criptas del intestino delgado por apoptosis (figura 3). A concentraciones letales la destrucción es tan masiva que conlleva destrucción del epitelio produciéndose grandes hemorragias con efectos irreversibles. A concentraciones sub-letales las criptas se recuperan, dividiéndose activamente sus células y regenerándose el epitelio intestinal. En estas condiciones la recuperación de los animales es total, no observándose signos de alteraciones funcionales.

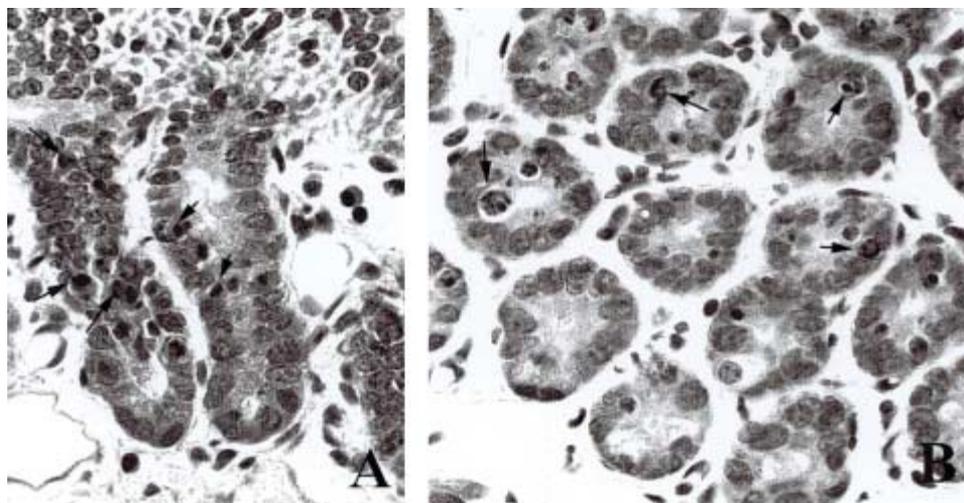


FIGURA 3. Efectos de la nigrina b sobre el intestino delgado de ratón. Se administró nigrina b (5mg/kg peso corporal) por la vena de la cola y a las 5 h se sacrificaron los animales y se obtuvieron muestras de tejido. Sección longitudinal (A) y transversal (B) de las criptas teñidas con hematoxilina-eosina. Las flechas señalan células en apoptosis.

Las concentraciones de nigrina b libre que podrían alcanzarse en la terapia con inmunotoxinas, en el caso de que se liberase totalmente por hidrólisis en el plasma, son alrededor de 3 órdenes de magnitud inferiores a estas. Por lo tanto, la nigrina b ofrece un margen de seguridad excelente para su uso en la construcción de inmunotoxinas y en particular si se compara con la ricina.

Dominios proteicos de interacción con azúcares

Estudios recientes han permitido elucidar las estructuras de los genes que codifican a ebulina I (44), nigrina b (45) y nigrina I (46) y por lo tanto sus secuencias de amino ácidos. 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 permitiéndose además 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 (44).

Las cadenas B de las RIPs de tipo 2 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 α , β y γ , de manera que existen 6 subdominios 1α , 1β , 1γ , 2α , 2β y 2γ , de los cuales solo los subdominios 1α y 2γ tienen capacidad contrastada por cristalografía y difracción de rayos X de fijar galactósidos (47). Estudios recientes han permitido proponer un tercer sitio (1β) de unión de galactosa (48). 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 obtenidas por difracción de rayos X muestra que las distribuciones espaciales son equivalentes en las dos proteínas.

Como se indica en la figura 4, la ebulina I presenta un resto de Fen en la posición 248 en el subdominio 2γ mientras que la ricina presenta una Tir. Creemos que la substitución de Tir por Fen es responsable de la menor afinidad de ebulina I por galactosa que la ricina. Nigrina b y nigrina I poseen también Fen en la posición 248 y presentan similar toxicidad que la ebulina I. De hecho sabemos que la ricina se fija 5.7 veces más que la nigrina b a las células Hela

(43). La ausencia de un grupo hidroxilo en el subdominio 2 γ 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 interactuar con receptores de tránsito a través del retículo endoplásmico como la ricina, y de ello se deriva la ausencia de toxicidad in vivo de ebulina I y también nigrina b que presenta la misma estructura en dicho subdominio. Existe además otro cambio notable en el tercer sitio de fijación de galactosa propuesto recientemente, así mientras que en las RIPs extremadamente tóxicas ricina y abrina en posición 67 existe una Tyr, en las RIPs no tóxicas nigrina I, nigrina b, ebulina I y sieboldina b existe una Asn.

SUBDOMINIO 1 α

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

SUBDOMINIO 1 β (nuevo sitio)

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

SUBDOMINIO 2 γ

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

FIGURA 4. Sub-dominios activos en fijación de galactosa presentes en las cadenas B de diversas RIPs de tipo 2.

Proyección farmacéutica de la nigrina b: inmuno-toxinas y conjugados

En base a los conocimientos adquiridos, la nigrina b posee una indudable proyección farmacéutica experimental como sustituto de la ricina en la construcción de inmunotoxinas. Una inmunotoxina es una especie molecular producida artificialmente a partir de un anticuerpo y una toxina, en particular una proteína inactivadora de ribosomas (2-6). El anticuerpo está dirigido contra un antígeno presente en la superficie de la célula blanco y por ello las inmunotoxinas se convierten en los proyectiles mágicos de Ehrlich (49), al identificar específicamente y matar dichas células blanco.

Las patologías que pueden tratarse con inmunotoxinas son, en principio, todas aquellas basadas en la existencia de células enfermas con peculiaridades o determinantes antigénicos específicos (o en mayor concentración) en su superficie celular, en particular las células cancerosas.

La RIP más utilizada en la construcción de inmunotoxinas ha sido la ricina, pero debido a su gran toxicidad no puede utilizarse como tal. La mejor forma de modificar la ricina para reducir su enorme toxicidad inespecífica es alterar por vía química la interacción de la cadena B de la ricina utilizando molécula de ricina intacta A-B con derivados de D-galactosa. Sin embargo la solución no es buena porque reduce notablemente la actividad de la cadena A sobre la síntesis de proteínas de la célula blanco (50). A pesar de ello, se ha introducido ya en el mercado y se aplica en la clínica una inmunotoxina denominada oncolisina eficaz contra los linfomas que contiene ricina bloqueada (51).

Las RIPs de dos cadenas no tóxicas del tipo de la nigrina b tienen la ventaja de que preservándose su carácter de extraordinario inhibidor de la síntesis de proteínas, no pueden translocarse la citosol por la vía de transporte retrógrado como la ricina y alcanzar los ribosomas de la célula (43). Por lo tanto, su utilización a grandes dosis no ofrece el peligro que ofrecen los conjugados e inmunotoxinas con ricina u otras RIPs de dos cadenas tóxicas, que si se degradasen liberarían proteínas altamente tóxicas.

Resultados recientes indican que las RIPs no tóxicas de dos cadenas nigrina b y ebulina de raíces poseen muy poca actividad in-

munogénica y adyuvante (52, 53). Este hecho contrasta con el fuerte carácter inmunogénico y adyuvante de la ricina y de otra RIP tóxica de dos cadenas relacionada con la ricina, la viscumina aislada de *Viscum album* L. El hecho de que la ricina no presente reacción inmunológica cruzada con la nigrina medida por la técnica de e.l.i.s.a. (54) convierte a nuestra proteína en un candidato importante para sustituir a la ricina y sus derivados cuando la resistencia inmunológica frente a ricina y proteínas relacionadas inmunológicamente se hace patente durante la terapia experimental del cáncer (55).

Conjugados transferrina-nigrina b/ebulina l

Muchas células malignas sobreexpresan el receptor de transferrina (56). Por ello dicho receptor ha sido objeto de ataque con conjugados del tipo de ricina-transferrina y ricina-anti-receptor de transferrina. Así, se han diseñado inmunotoxinas conteniendo ricina y anticuerpos anti-receptor de transferrina humana y se han utilizado con éxito contra células cerebrales malignas tales como las derivadas de glioblastomas, meduloblastomas y células leucémicas (57). Resultados recientes indican que la cloroquina protege a los capilares cerebrales de la terapia con conjugados conteniendo transferrina (58), lo que sin duda reduce la posible toxicidad de dichos conjugados y los convierte en herramientas útiles en los casos de sobreexpresión de receptores de transferrina.

Tanto nigrina b como ebulina l forman conjugados con transferrina que retiene la actividad anti-ribosómica con valores de IC_{50} de 5 y 20 ng/ml respectivamente, que en términos molares es equivalente a la actividad de las RIPs libres (59). Esta actividad inhibidora se mantiene sobre células cancerosas cultivadas, tales como las células HeLa, con valores de 0.3 nM para ambos conjugados (59). Por lo tanto estos conjugados son capaces de identificar y matar la células cancerosas que sobre-expresan receptor de transferrina y ello con una eficacia similar y aún superior a los conjugados publicados con ricina y toxina diftérica.

Inmunotoxina contra la neovascularización tumoral

Uno de los principales problemas en el tratamiento de tumores sólidos con inmunotoxinas y otros agentes químicos es la accesibilidad reducida de los fármacos antitumorales al interior de los tumores (60). Las células tumorales no están en contacto directo con la sangre, por ello los agentes químicos tienen que salir de los vasos sanguíneos y penetrar en el interior del tumor. Dado que la presión en el interior del tumor es mayor que fuera de él y por lo tanto los fármacos solamente pueden entrar por difusión, deberían utilizarse concentraciones que serían en muchos casos tóxicas para el paciente (60).

Una estrategia para la eliminación del tumor consiste en eliminar el suministro de los nutrientes y el oxígeno que llegan al tumor a través de una fina red de vasos capilares (61). Si se eliminan estos capilares las células del tumor no reciben alimento y mueren, por lo tanto se puede eliminar la masa tumoral sin necesidad de atacar directamente a las células tumorales. Existen diversos trabajos publicados en los últimos años que indican que la endogлина (CD105) se sobre-expresa en la neovascularización tumoral (62, 63).

Como ejemplo de inmunotoxina contra la neovascularización tumoral se ha construido el conjugado constituido por el anticuerpo monoclonal anti-endogлина de ratón (MJ7) y la nigrina b.

Para investigar si la inmunotoxina MJ7-Ng b retiene la capacidad de identificar el blanco con el anticuerpo MJ7 y destruirlo con la nigrin b se incubaron células de ratón L929 (CD105+) con concentraciones variables de inmunotoxina y se determinó la viabilidad celular. Como se indica en la figura 5, el anticuerpo MJ7 purificado solo no afecta en absoluto a la viabilidad celular. La nigrina b sola solo afecta la viabilidad celular a concentraciones muy elevadas con un IC_{50} de 2×10^{-7} M, que representa 4-5 órdenes de magnitud más que la IC_{50} de la ricina en las células cultivadas, como se ha publicado previamente (54). En contraste con MJ7 y con nigrina b, la inmunotoxina MJ7-Ng b es unos tres órdenes de magnitud más tóxica que la de la nigrina b sola.

Para determinar si la inmunotoxina MJ7-Ng b poseía actividad *in vivo*, se investigó el efecto de la misma sobre el desarrollo de tumor-

res de melanoma B16 4A5 de ratón. Para ello se procedió a la implantación subcutánea de células de melanoma B16 4A5 en ratones C57BL/6 machos de 6 semanas, y se estudió la aparición de tumores palpables y medibles. La inoculación de aproximadamente 125.000 células en 50 ml de tampón PBS promovió el desarrollo de un tumor visible a los 10 días. Con este modelo tumoral se ensayó la inmunotoxina MJ7-Ng b de la siguiente manera. A los 10 días después de la inoculación de las células de melanoma B16 4A5 se inyectaron por la vena de la cola 15 μ g de MJ7-Ng b en PBS. La inyección se repitió a las 12 y 24 horas después de la primera inyección.

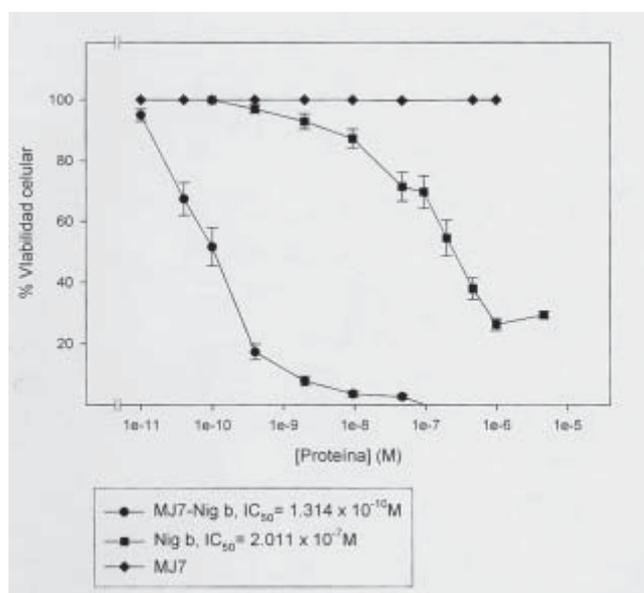


FIGURA 5. Efecto de MJ7-Ng b, Ng b y MJ7 sobre la viabilidad de cultivos celulares de la línea L929 de ratón. Se crecieron 3.000 células/ml con medio RPMI 1640 complementado con 2 mM L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino, durante 24 h en placas de 96 pocillos a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Después las células se lavaron una vez con medio fresco, se añadieron 100 μ l de medio fresco a cada pocillo y se incubó en presencia de MJ7-Ng b, Ng b o MJ7 durante 3h. A continuación se eliminó el medio de cultivo, se lavaron los pocillos, se añadió medio fresco y se continuó la incubación a 37°C durante 72h. Para cuantificar el número de células viables se empleó un ensayo colorimétrico basado en la ruptura de la sal de tetrazolio WST-1. Tras la incubación de 72h se añadieron a cada pocillo 10 μ l del reactivo WST-1 y se incubó durante 2h. Finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante de los pocillos a 450 nm.

El grupo de ratones control desarrolló tumores de una manera exponencial (Figura 6). En contraste, los animales tratados con la inmunotoxina solo desarrollaron tumores muy lentamente y ello muy probablemente debido a que parte de los tumores no posee una irrigación adecuada con una adecuada red de neovasos CD105+. De hecho, al inyectar la inmunotoxina se forma una pequeña bolsa que contiene a las células inyectadas por lo que los tumores ya parte de un volumen apreciable que muy probablemente no desarrolla neovasculatura. No obstante esta circunstancia, se eligió este modelo por la gran agresividad y rapidez con que se desarrollan los tumores y con la finalidad de demostrar el potencial destructor de la inmunotoxina sobre los tumores sin afectar a los animales de experimentación.

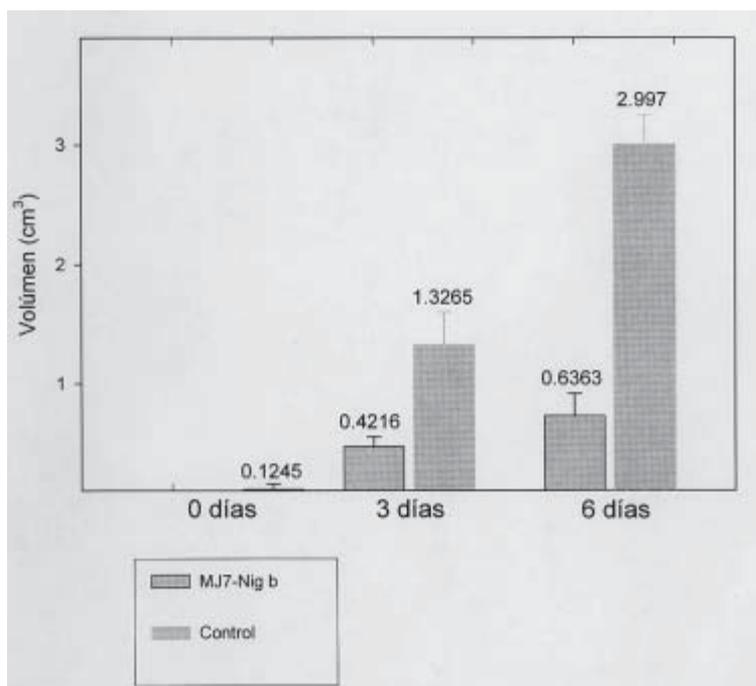


FIGURA 6. Efecto *in vivo* de la inmunotoxina MJ7-Ng b sobre el desarrollo de tumores de melanoma B16 en ratones. Se inyectaron aproximadamente 125.000 células de melanoma B16 4A5 en la parte superior de la pata delantera de ratones C57BL/6 machos de 6 semanas. 10 días después (0 días en el histograma), se procedió a inyectar 15 μ g de inmunotoxina (o salino) a cada ratón. La inyección se repitió a las 12 y 24 h.

Investigaciones futuras

Nuestras investigaciones presentes y futuras con la nigrina b se centran en el estudio de sus aplicaciones como parte tóxica de inmunotoxinas para la terapia, en particular del cáncer. El descubrimiento de blancos celulares específicos de células de la neovasculatura tumoral abre la puerta al desarrollo de inmunotoxinas y conjugados contra la neovasculatura con la finalidad de provocar el colapso vascular de los tumores y por lo tanto su destrucción selectiva. La nigrina b, en base a las propiedades descritas en este y otros trabajos previos, se presenta como una alternativa a la omnipresente ricina en la construcción de inmunotoxinas. Las características de alta actividad enzimática anti-ribosómica, muy baja toxicidad celular en comparación con la ricina, bajo carácter inmunogénico y adyuvante en ratones, alta bioseguridad en su manejo y facilidad de preparación, la acreditan para su utilización en estudios preclínicos avanzados y su eventual utilización en ensayos clínicos en humanos.

Agradecimientos

La investigación realizada en este trabajo ha sido financiada por CICYT BIO-98-0727, FEDER 1FD97-0110 y Consejería de Sanidad y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OLSNES, S. Y PIHL, A. (1982) in *Molecular Action of a Toxins and Viruses* (Cohen, P. and Van Heyningen, S. eds.) pp. 51-105, Elsevier, Amsterdam, New York.
- (2) JIMÉNEZ, A. Y VÁZQUEZ, D. (1985) *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 649-672.
- (3) STIRPE, F. Y BARBIERI, L. (1986) *FEBS Lett.* 195: 1-8.
- (4) BARBIERI, L. Y STIRPE, F. (1982) *Cancer Surv.* 1: 489-520.
- (5) STIRPE, F., BARBIERI, L., BATTELLI, M.G., SORIA, M. Y LAPPI, D., (1992) *Bio/technology* 10: 405-412.
- (6) BARBIERI, L., BATTELLI, M.G. Y STIRPE, F. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 237-282.
- (7) FERRERAS, J. M., CITORES, L., DE BENITO, F. M., ARIAS, J., ROJO, A., MUÑOZ, R., IGLESIAS, R. Y GIRBÉS T. (2000) *Curr. Top. Phytochem.* 3: 113-128.
- (8) DROBNIEWSKI, F. (1989) *Biosci. Rep.* 9: 139-156.

- (9) KOPPEL, G. (1990) *Bioconjugate Chem.* 1: 13-23.
- (10) TILL, M., GHETIE, V., GREGORY, T., PATZER, E., PORTER, J.P., UHR, J.W., CAPON D.J. Y VITETTA, E.S. (1988) *Science* 242: 1166-1168.
- (11) TILL, M. A., ZOLLA-PAZNER, S., GORNY, M. K., UHR, J. W. Y VITETTA, E. S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1987-1991.
- (12) ZARLING, J.M., MOIRAN, P.A., HAFFAR, O., SIAS, J., RICHMAN, D.D., SPINA, C.,A., MYERS, D., KUEBELBECK, V., LEDBETTER, J.A. Y UCKUN, F.M. (1990) *Nature* 347: 92-95.
- (13) CITORES, L., FERRERAS, J. M., IGLESIAS, R., CARBAJALES, M. L., ARIAS, F. J., JIMÉNEZ, P., ROJO, M. A. Y GIRBÉS, T. (1993) *FEBS Lett.* 329: 59-62.
- (14) 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. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 18195-18199.
- (15) 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 (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 1181-1186.
- (16) McGRATH, M. S., HWANG, K. M., CALDWELL, S. E., GASTON, I., LUK, K., WU, P., NG, V. L., CROWE, S., DANIELS, J., MARSH, J., DEINHART, T., LEKAS, P. V., VENNARI, J.C., YEUNG, H. Y LIFSON, J.D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2844-2848.
- (17) LEE-HUANG, S., L.HUANG, P., KUNG, H., LI, B., L.HUANG, P., HUANG, P., HUANG, H.I. Y CHEN, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6570-6574.
- (18) CITORES, L., DE BENITO, F. M., IGLESIAS, R., FERRERAS, J. M., ARGÜESO, P., JIMÉNEZ, P., TESTERA, A., CAMAFEITA, E., MÉNDEZ, E. Y GIRBÉS, T. (1997) *Cell. Mol. Biol.* 43: 485-499.
- (19) CITORES, L., DE BENITO, F. M., IGLESIAS, R., FERRERAS, J. M., ARGÜESO, P., JIMÉNEZ, P., MÉNDEZ, E. Y GIRBÉS, T. (1997) *Planta* 204: 310-317.
- (20) CITORES, L., DE BENITO, F. M., IGLESIAS, R., FERRERAS, J. M., ARGÜESO, P., JIMÉNEZ, P., FARIAS, G., MÉNDEZ, E. Y GIRBÉS, T. (1996) *J. Exp. Bot.* 47: 1577-1585.
- (21) GIRBÉS, T., CITORES, L., DE BENITO, F. M., IGLESIAS, R. Y FERRERAS, J. M. (1996) *Biochem. J.* 315: 343-344.
- (22) CITORES, L., IGLESIAS, R., MUÑOZ, R., FERRERAS, J. M., JIMÉNEZ, P. Y GIRBÉS, T. (1994) *J. Exp. Bot.* 45: 513-516.
- (23) DE BENITO, F. M., CITORES, L., IGLESIAS, R., FERRERAS, J. M., SORIANO, F., ARIAS, F.J., MÉNDEZ, E. Y GIRBÉS, T. (1995) *FEBS Lett.* 360: 299-302.
- (24) DE BENITO, F. M., CITORES, L., IGLESIAS, R., FERRERAS, J. M., CAMAFEITA, E., MÉNDEZ, E. Y GIRBÉS, T. (1997) *FEBS Lett.* 413: 85-91.
- (25) LIN, J.I., KAO, W., TSEHN, K., CHEN, C. Y TUNG, T (1970) *Cancer Res.* 30: 2431-2433.
- (26) ENDO, Y. Y TSURUGI, K. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 8128-8130.
- (27) ENDO, Y. TSURUGI, K. Y LAMBERT, J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 1032-1036.
- (28) ARIAS, F. J., ANTOLÍN, P., DE TORRE, C., BARRIUSO, B., IGLESIAS, R., ROJO, M. A., FERRERAS, J. M., BENVENUTO, E., MÉNDEZ, E. Y GIRBÉS, T. (2003) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35: 61-78.

- (29) ARIAS, F. J., ROJO, M. A., FERRERAS, J. M., IGLESIAS, R., MUÑOZ, R., ROCHER, A., MÉNDEZ, E., BARBIERI, L. Y GIRBÉS, T. (1992) *Planta* 186: 532-540.
- (30) ARIAS, F. J., ROJO, M. A., IGLESIAS, R., FERRERAS, J. M., GARCÍA, R., MÉNDEZ, E. Y GIRBÉS, T. (1994) *Planta* 194: 487-491.
- (31) IGLESIAS, R., ESCARMÍS, C., ALEGRE, C., FERRERAS, J. M. Y GIRBÉS, T. (1993) *FEBS Lett.* 318: 189-192.
- (32) HARTLEY, M.R., LEGNAME, G., OSBORN, R., CHEN, Z. Y LORD, J.M. (1991) *FEBS Lett.* 290: 65-68.
- (33) PRESTLE, J., HORNING, E., SCHÖNFELDER, M. Y MUNDY, K. (1992) *FEBS Lett.* 297: 250-252.
- (34) GIRBÉS, T., BARBIERI, L., FERRERAS, J. M., ARIAS, F. J., ROJO, M. A., IGLESIAS, R., ALEGRE, C., ESCARMÍS, C. Y STIRPE, F. (1993) *J.Bacteriol.* 175: 6721-6724.
- (35) FERRERAS, J. M., ALEGRE, C., IGLESIAS, R. Y GIRBÉS, T. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1458-1462.
- (36) FERRERAS, J. M., IGLESIAS, R., BARBIERI, L., ALEGRE, C., BOLOGNESI, A., ROJO, M. A., CARBAJALES, M. L., ESCARMÍS, C. Y GIRBÉS, T. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1243: 85-93.
- (37) IRVIN, J.D. (1983) *Pharmac.Ther.* 21: 371-387
- (38) USSERY, M.A., IRVIN, J.D. Y HARDESTY (1977) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 284: 431-440.
- (39) BARBIERI, L., ARON, G.M., IRVIN, J.D. Y STIRPE, F. (1982) *Biochem. J.* 203: 55-59.
- (40) LEE-HUANG, S., L. HUANG, P., L.NARA, P., CHEN, H., KUNG, H., HUANG, P., HUANG, H.I. Y L. HUANG, P. (1990) *FEBS Lett.* 272: 12-18.
- (41) GIRBÉS, T., DE TORRE, C., IGLESIAS, R., FERRERAS, J. M. Y MÉNDEZ, E. (1996) *Nature* 379: 777-778.
- (42) SVINTH, M., STEINGHARDT, J., HERNÁNDEZ, R., DUH, J.K., KELLY, C., DAY, P., LORD, M., GIRBÉS, T. Y ROBERTUS, J.D. (1998) *Biochem. Biophys. Res Commun.* 249: 637-642.
- (43) BATTELLI, M. G., CITORES, L., BUONAMICI, P., FERRERAS, J. M., DE BENITO, F. M., STIRPE, F. Y GIRBÉS, T. (1997) *Arch. Toxicol.* 71: 360-364.
- (44) PASCAL, J. M., DAY, P., MONZINGO, A. F., ERNST, S. R., ROBERTUS, J. D., IGLESIAS, R., PÉREZ, Y., FERRERAS, J. M., CITORES, L. Y GIRBÉS, T. (2001) *Proteins* 43: 319-326.
- (45) VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F. Y PEUMANS, W. J. (1996) *Eur. J. Biochem.* 237: 505-513.
- (46) PILAR ANTOLÍN (2000) Clonación y caracterización de genes de proteínas inactivadoras de ribosomas y lectinas de las especies *Sambucus nigra* L. y *Muscari armeniacum* (L.) Miller. Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.
- (47) LORD, J.M., ROBERTS, L. Y ROBERTUS, J.D. (1994) *FASEB J.* 8: 201-208.
- (48) STEEVES, R.M., DENTON, M.E., BARNARD, F., HENRY, A. Y LAMBERT, J.M. (1999) *Biochemistry* 38: 11677-11685.
- (49) EHRlich, P. (1956) «Collected papers of Paul Ehrlich» (HIMMELWEIT, F. EDS.) VOL. 2, PP. 442-447, PERGAMON PRESS, LONDON.
- (50) BLÄTTER, W.A., LAMBERT, J.M., Y GOLDMACHER, V.S. (1989) *Cancer Cells* 1: 50-55.

- (51) LYMPHOMA, HAIRY-CELL LEUKEMIA RESPOND TO NEW AGENTS. (1992) *Oncology (Huntingt)* 6: 94.
- (52) LAVELLE, E.C., GRANT, G., PFÜLLER, U., GIRBÉS, T., JIMÉNEZ, P., PUSZTAI, A., LEAVY, O., O'HAGAN, D.T. Y MILLS, K.H.G. (2000) *Scand. J. Immunol.* 52: 422.
- (53) LAVELLE, E.C., GRANT, G., PFÜLLER, U., GIRBÉS, T., JIMÉNEZ, P., PUSZTAI, A., LEAVY, O., MILLS, K.H.G., Y O'HAGAN, D.T. (2000) *Immunol.* 101: 32.
- (54) MUÑOZ, R., ARIAS, Y., FERRERAS, J. M., JIMÉNEZ, P., ROJO, M. A. Y GIRBÉS, T. (2001) *Cancer Lett.* 167: 163-169.
- (55) KREITMAN, R. J. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* 11: 570-578.
- (56) LAZARUS A.H. Y BAINES, M.G. (1985) *J. Immunol.* 79: 213-221.
- (57) ZOVICKIAN J., GRAY JOHNSON, V. Y YOULE, R. (1987) *J. Neurosurg.* 66: 850-861.
- (58) HAGIRHARA, N., WALBRIDGE, S., OLSON, A.W., OLDFIELD, E.H. Y JOULE, R.J. (2000) *Cancer Res.* 60: 230-234.
- (59) CITORES, L., FERRERAS, J. M., MUÑOZ, R., BENÍTEZ, J., JIMÉNEZ, P. Y GIRBÉS, T. (2002) *Cancer Lett.* 184: 29-35
- (60) JAIN, R. K. (1994) *Sci Am.* 271: 58-65.
- (61) FOLKMAN, J. (1996) *Investigación y Ciencia* 242 (Noviembre): 101-104
- (62) FONSATTI, E., JEKUNEN, A. P., KAIREMO, K. J., CORAL, S., SNELLMAN, M., NICOTRA, M. R., NATALI, P. G., ALTOMONTE, M. Y MAIO, M. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6: 2037-2043.
- (63) DUFF, S. E., LI, C., GARLAND, J. M. Y KUMAR, S.(2003) *FASEB J.* 17: 984-992.