

Análisis comparativo de métodos de detección y cuantificación de la ricina: Enfoques actuales y perspectivas de futuro

Laura Salmerón Pelado

Trabajo de Fin de Máster

Tutor académico: José Antonio Reina Lozano

Máster en Genética, Física y Química forense

Curso 2022-2023

Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, España

Junio de 2023



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**



Resumen

La ricina es una fitotoxina que se encuentra en las semillas de ricino (*Ricinus communis* L). Esta toxina tiene un alto potencial como arma bioterrorista debido a su alta toxicidad y su fácil acceso y abundancia en la naturaleza y en el sector industrial, donde se utiliza con múltiples fines. La detección temprana de la ricina es crucial para la aplicación de las medidas adecuadas para contrarrestar las posibles situaciones de emergencia por intoxicación o por contaminación de aguas o alimentos de consumo humano. En el presente Trabajo de Fin de Máster, se presenta una revisión bibliográfica exhaustiva de los métodos de detección y cuantificación de ricina disponibles actualmente, desde las técnicas convencionales hasta los últimos avances, analizando y comparando las ventajas y limitaciones de cada uno. Para ello, se han recopilado y revisado una serie de estudios y publicaciones científicas para comprender el estado actual de las técnicas de detección y cuantificación de ricina disponibles y sus perspectivas de futuro. A través de esta revisión bibliográfica, se ha llegado a la conclusión de que, aunque los métodos de detección de ricina actuales han demostrado ser efectivos, existen limitaciones y aspectos a mejorar para una detección más rápida, sensible, específica y aplicable a todo tipo de muestras y situaciones, con lo que la investigación continua y el desarrollo de nuevos enfoques y metodologías es crucial para afrontar los desafíos y limitaciones de los métodos actuales.

Palabras clave: Ricina, fitotoxina, métodos de detección y cuantificación, bioterrorismo.

Abstract

Ricin is a phytotoxin found in castor beans (*Ricinus communis* L). This toxin has a high potential as a bioterrorist weapon due to its high toxicity and its easy accessibility and abundance in nature and in the industrial sector, where it is used for multiple purposes. Early detection of ricin is crucial for the implementation of appropriate measures to counteract possible emergency situations due to poisoning or contamination of water or food for human consumption. In this Master's Thesis, a comprehensive literature review of the ricin detection and quantification methods currently available is presented, from conventional techniques to the latest advances,



analyzing and comparing the advantages and limitations of each one. To this end, several studies and scientific publications have been compiled and reviewed to understand the current status of available ricin detection and quantification techniques and their future prospects. Through this literature review, it has been concluded that, although current ricin detection and quantification methods have proven to be effective, there are limitations and areas for improvement for a more rapid, sensitive, specific and applicable to all types of samples and situations, so that continued research and development of new approaches and methodologies is crucial to address the challenges and limitations of current methods.

Key words: Ricin, phytotoxin, detection and quantification methods, bioterrorism.



Índice

1. Introducción.....	5
1.1. El ricino.....	5
1.2. Historia de la ricina: Usos médicos de la planta de ricino en la Antigüedad y usos industriales.....	6
1.3. Estructura química de la ricina.....	9
1.4. Mecanismo de acción.....	11
1.4.1. Unión a la superficie celular y endocitosis.....	12
1.4.2. Transporte al retículo endoplasmático y translocación al citosol....	13
1.4.3. Mecanismo de citotoxicidad.....	14
1.5. Efectos sobre el organismo de la intoxicación por ricina.....	17
1.6. La ricina como arma biológica.....	19
1.7. Importancia de la detección de la ricina.....	20
2. Hipótesis y objetivos.....	22
3. Metodología.....	24
4. Métodos de detección y cuantificación de la ricina.....	25
4.1. Métodos inmunológicos.....	25
4.1.1. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).....	25
4.1.2. Inmunoensayo de Flujo Lateral (LFIA).....	27
4.1.3. Inmunoreacción en Cadena de la Polimerasa (IPCR).....	30
4.2. Técnicas espectroscópicas.....	31
4.2.1. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)	31
4.2.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	36
4.2.3. Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR).....	38



4.3. Nuevos avances en la detección de ricina.....	39
4.3.1. Secuenciación directa de ARN con secuenciador ONT.....	39
4.3.2. Bioensayos.....	41
4.3.3. Biosensores.....	42
5. Discusión y perspectivas de futuro.....	45
6. Conclusiones.....	49
7. Abreviaturas	51
8. Agradecimientos.....	53
9. Bibliografía.....	54
10. Anexo.....	60

1. Introducción

1.1. El ricino

La ricina es una fitotoxina natural que proviene de las semillas de ricino (*Ricinus communis* L), una planta oleaginosa no comestible dicotiledónea angiosperma de la familia *Euphorbiaceae*. Las fitotoxinas son sustancias con propiedades tóxicas producidas por las plantas, que les sirven como defensa contra los depredadores. Muchas veces, estas fitotoxinas también resultan tóxicas para los seres humanos, como es el caso de la ricina¹.

El ricino, por su parte, es una gran fuente de aceite vegetal utilizado desde la Antigüedad con fines medicinales. Este aceite también es muy utilizado en la industria en su forma deshidratada para la producción de pinturas y barnices y otros productos como fibras, lubricantes, plásticos y vidrio antibalas, entre otros, además de en la industria cosmética para una gran variedad de productos de belleza y de cuidado del cabello¹. Esta planta también es conocida por otros nombres como castor, higuera, higuera infernal, mosquitera, *palma Christi* o, en inglés, *castor bean*, entre otros. Esta planta es originaria de Etiopía e India y, actualmente, es muy común en zonas templadas tropicales y subtropicales, creciendo como planta invasora, debido a su gran capacidad para invadir territorios, como planta ornamental en jardines o cultivada con fines medicinales o industriales. Además, existen diferentes variedades de ricino, que van desde plantas herbáceas hasta arbustos^{2,3}.

El ricino es una planta oleaginosa, las cuales se caracterizan por la posibilidad de extraer una gran cantidad de aceite de sus semillas o frutos. El 90% del aceite de ricino está compuesto por ácido ricinoleico, un ácido graso hidroxilado constituido por una cadena alifática de 18 carbonos, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo y un doble enlace, una estructura que permite una gran variedad de reacciones químicas para la producción industrial de numerosos productos oleoquímicos^{2,3}.

Las flores del ricino se distribuyen por la planta según su sexo, de forma que las flores de la parte superior son femeninas y producen los frutos, mientras que las de la parte inferior son masculinas y producen el polen (Figura 1a)^{2,3}.

Las semillas de ricino (Figura 1b) presentan una forma ovalada y tienen un tamaño medio de entre 8 y 20 mm de largo y entre 4 y 12 mm de ancho, dependiendo de

la variedad de ricino. Tienen un color marrón claro brillante, moteado con manchas de un marrón más oscuro, con un apéndice rugoso llamado carúncula. Estas semillas tienen un contenido de entre un 46 y un 53% de aceite, compuesto por glicéridos de diferentes ácidos, como el anteriormente mencionado ácido ricinoleico y el isoricinoleico, los cuales, producidos por hidrólisis de los glicéridos, son los responsables del efecto laxante del aceite de ricino. Este aceite se obtiene mediante el prensado de las semillas, está libre de la toxina ricina y se utiliza con diferentes fines tanto en la industria como en la medicina y la cosmética. Por otra parte, los residuos no oleicos del prensado de las semillas sirven como fuente de proteínas para fertilizar cultivos o para alimentar al ganado, previa eliminación de la ricina mediante tratamiento térmico^{2,3}.

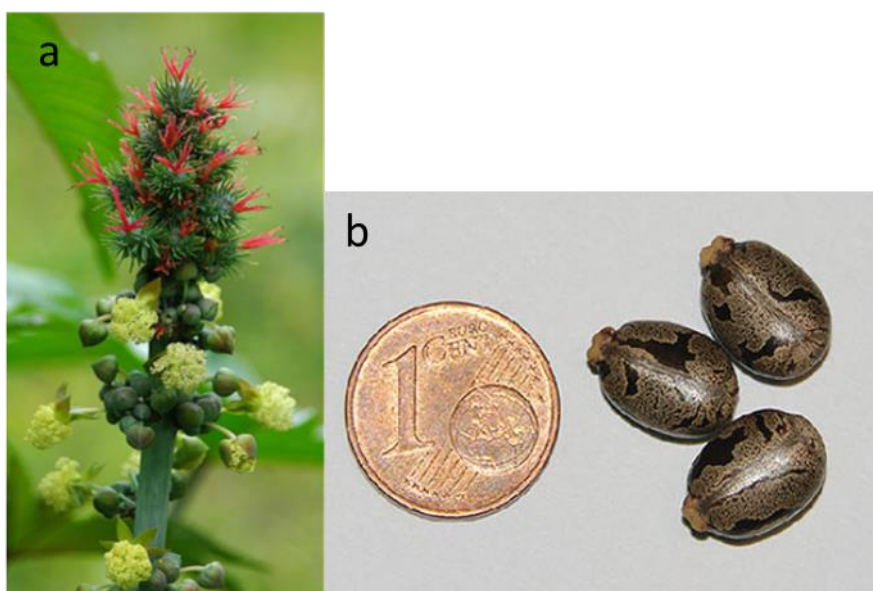


Figura 1 Imágenes de las flores del ricino (a) y las semillas de la planta (b). En la imagen a, las flores de color rojo de la parte superior corresponden a la parte femenina de la planta y las flores amarillas de la parte inferior son masculinas. Fuente: Franke, H., Scholl, R. & Aigner, A. Ricin and Ricinus communis in pharmacology and toxicology- from ancient use and “Papyrus Ebers” to modern perspectives and “poisonous plant of the year 2018”. Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology vol. 392 1181–1208.

1.2. Historia de la ricina: Usos médicos de la planta de ricino en la Antigüedad y usos industriales

La toxina ricina (también conocida como RCAII o RCA₆₀) fue descrita por primera vez por Peter Hermann Stillmark en 1888⁴, quien identificó esta molécula activa aislada de las semillas de ricino como una proteína capaz de unirse a

carbohidratos, siendo la primera persona en describir una proteína específica con esta capacidad. En su estudio, Stillmark también describió la capacidad hemoaglutinante, es decir, de aglutinar eritrocitos de sangre animal del extracto de las semillas de ricino^{4,5}.

A raíz de este hallazgo, las moléculas provenientes de los extractos de distintas semillas capaces de producir la aglutinación de la sangre empezaron a llamarse hemoaglutininas o fitohemoaglutininas, hasta que, en el año 1954, Boyd y Shapleigh⁶ introdujeron el término lectina para referirse a estas moléculas de origen vegetal con capacidad hemoaglutinante. Más adelante, en 1952, Watkins y Morgan⁷ demostraron que la capacidad aglutinante de estas moléculas se debía a su interacción con los carbohidratos presentes en la membrana de los eritrocitos.

Más adelante, se descubrió que la responsable del efecto hemoaglutinante del extracto de semilla de ricino es la aglutinina, también llamada RCA, RCA I o RCA₁₂₀), que junto con la ricina, conforma el 5% del peso de la semilla de esta planta. Tanto la ricina como la aglutinina pertenecen al grupo de las lectinas, pero, mientras que la primera es una potente citotoxina pero no una gran hemoaglutinina, la segunda tiene un potencial citotóxico bajo pero una gran capacidad de hemoaglutinación.

El ricino es un arbusto conocido y usado desde la prehistoria, como atestiguan diversos hallazgos arqueológicos como los de la cueva *Border Cave* (cueva Fronteriza o de la Frontera) de Sudáfrica, un importante emplazamiento arqueológico ubicado en las montañas occidentales de Lebombo, en Kwazulu-Natal, donde se han encontrado huesos, herramientas y materia vegetal bien conservada que abarcan desde la Edad de Piedra Media hasta la Edad de Hierro, ofreciendo una gran cantidad de información sobre la vida de los seres humanos durante más de 200.000 años. En esta cueva se encontraron rastros de cera que contenían ácido ricinoleico y ácido ricinelaídico en un utensilio de madera datado hace unos 24.000 años cuyo uso se cree que era la aplicación de veneno⁸.

En el antiguo Egipto, se utilizaban ampliamente las semillas de ricino y otras partes de la planta con fines medicinales, como se explica en el Papiro Ebers, un tratado médico egipcio datado de antes del 1500 a.C en el que se incluye un capítulo dedicado enteramente al ricino, atribuyéndole usos farmacológicos como abortivo, laxante y remedio contra los abscesos y la calvicie, entre otros efectos beneficiosos para el organismo³.

Otro papiro en el que se mencionan los usos medicinales de la planta de ricino es el Papiro Hearst, coetáneo del Papiro Ebers. En él, se describe el uso de distintas partes de la planta tanto para aliviar dolencias internas, como el exceso de acumulación de líquidos, como externas a nivel cutáneo³.

Por otra parte, las semillas de ricino se utilizaban en Egipto como medio de pago, y en el cuarto milenio antes de Cristo, se incluían en los enterramientos como bienes funerarios para su uso por parte del difunto en la vida después de la muerte³.

No obstante, en la cultura egipcia antigua se conocía la toxicidad del ricino y, por este motivo, el uso de sus semillas se limitaba a pequeñas cantidades³.

Más adelante, en el siglo quinto antes de Cristo, Hipócrates, considerado el padre de la medicina occidental, recomendaba el uso del aceite de ricino como laxante y purgante o desintoxicante⁹. Otro ejemplo del uso del ricino en la medicina antigua lo encontramos en la obra del médico, farmacólogo y botánico Pedanius Dioscórides, titulada *De Materia Medica*, donde se atribuyen a distintas partes del ricino capacidades expectorantes, diuréticas, laxantes, antiinflamatorias y para el tratamiento de la infección bacteriana erisipela, entre otras, como se puede leer en el siguiente fragmento extraído de la obra de Dioscórides^a:

“[...] Mondados, majados y bebidos como unos 30 granos en número, purgan vientre abajo flema, bilis y agua; provocan también el vómito, aunque la purgación es muy desagradable y molesta, porque revuelve fuertemente el estómago. Majados y aplicados en forma de emplasto, extirpan el acné y las efélides. Las hojas, majadas y mezcladas con flor de harina, hacen cesar las hinchazones e inflamaciones de los ojos, así como las mamas hinchadas; aplicadas en forma de emplasto, solas o mezcladas con vinagre, extinguen las erisipelas [...]”¹⁰

Por otra parte, las hojas, las raíces, las semillas y la corteza de ricino también han sido utilizados desde la Antigüedad con fines medicinales en las culturas asiáticas, como es el caso de la medicina China tradicional, donde las semillas de ricino se utilizaban como vermífugo para expulsar los gusanos intestinales o como tratamiento para las úlceras, entre otros usos⁸, mientras que en el Ayurveda, el sistema médico tradicional indio, se considera que el ricino tiene efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades reumáticas, dermatológicas y del sistema digestivo, inflamación,

^aFragmento extraído de la traducción de Antonio López Eire y Francisco Cortés Gabaudan de la obra original de Dioscórides *De Materia Medica*.

fiebre, bronquitis, cólicos y ascitis^{8,11}. En otros países orientales, como Irán y Pakistán, se han utilizado las hojas y las semillas de ricino para el tratamiento de afecciones cutáneas como forúnculos, llagas y heridas, así como para la artrosis, gota y enfermedades hepáticas^{8,12,13}.

Además, las culturas antiguas europeas también utilizaban la planta de ricino como remedio para distintas afecciones. Por ejemplo, en los países mediterráneos se utilizaban las hojas y las semillas de ricino como desintoxicante, laxante, vomitivo y estimulante de la producción de leche^{8,11}.

Actualmente, la planta de ricino tiene una gran variedad de usos a nivel industrial. Por ejemplo, el aceite se utiliza en la fabricación de pinturas, jabones, barnices, productos de cosmética y lubricantes, entre otros. El prensado de la obtención del aceite tiene un alto contenido proteico y de ahí que se utilice como fertilizante orgánico y la producción de pienso animal, aunque para ser apto para la alimentación del ganado debe ser sometido a tratamiento térmico para la inactivación de la ricina. De hecho, se han dado casos de intoxicación en animales por una inactivación ineficaz de la ricina del prensado².

1.3. Estructura química de la ricina

La estructura terciaria de la ricina fue descrita por primera vez por Sjur Olsnes y Alexander Pihl en 1968¹⁴. Se vio que la ricina es una proteína globular heterodimérica glicosilada con un enlace disulfuro que une las dos cadenas.

La ricina es una molécula perteneciente al grupo de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de tipo 2. Las RIPs son proteínas mayoritariamente de origen vegetal, aunque también están presentes en algunas bacterias y hongos, con actividad enzimática hidrolítica que actúa sobre los ribosomas inhibiendo la síntesis proteica de forma irreversible. Estas proteínas se clasifican en dos tipos según su número de cadenas polipeptídicas. La composición de la ricina, al igual que todas las del grupo RIP2 se caracteriza por tener dos tipos de cadenas polipeptídicas con funciones distintas: una cadena A (RTA) que tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas al presentar actividad N-glicosidasa y una cadena B (RTB), que tiene capacidades de lectina, lo que permite a la ricina unirse a las moléculas glucídicas de la superficie celular. Por lo tanto,

la ricina está formada por una subunidad enzimática (RTA) y una de unión (RTB). La RTA está compuesta por 267 aminoácidos y tiene un peso de aproximadamente 32 kDa, mientras que la RTB consta de 262 aminoácidos y pesa unos 34 kDa. Ambas cadenas se unen mediante un puente disulfuro entre los residuos de cisteína de la posición 259 de la RTA y la 4 de la RTB^{1,2,15}.

La RTA se divide en tres dominios estructurales, con aproximadamente un 50% de hélices α y un 50% de láminas β en cada uno (Figura 2), y presenta actividad enzimática N-glicosidasa, gracias a la cual inhibe la síntesis de proteínas mediante la hidrólisis del enlace N-glicosídico entre una adenina y una ribosa de un tetrabucle altamente conservado de secuencia GAGA del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 28S de las células eucariotas, liberando una adenina, lo que resulta en la pérdida del lugar de unión del factor de elongación necesario para la síntesis proteica¹⁶. Por otra parte, la RTB es una lectina que se une preferentemente a las moléculas de galactosa terminales, permitiendo a la ricina unirse a las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de las células eucariotas, y está compuesta por cuatro puentes disulfuro y dos dominios, sin ninguna hélice α ni lámina β (Figura 2) divididos en cuatro subdominios cada uno (λ , α , β y γ), siendo los subdominios 1α y 2γ los responsables de la unión a la galactosa^{2,15}.

En conjunto, la ricina es una glicoproteína con dos zonas de glicosilación en la RTB (Asn95 y Asn135) y una o dos, dependiendo del tipo de ricina, en RTA (Asn10 y, ocasionalmente, Asn236)^{2,15}.

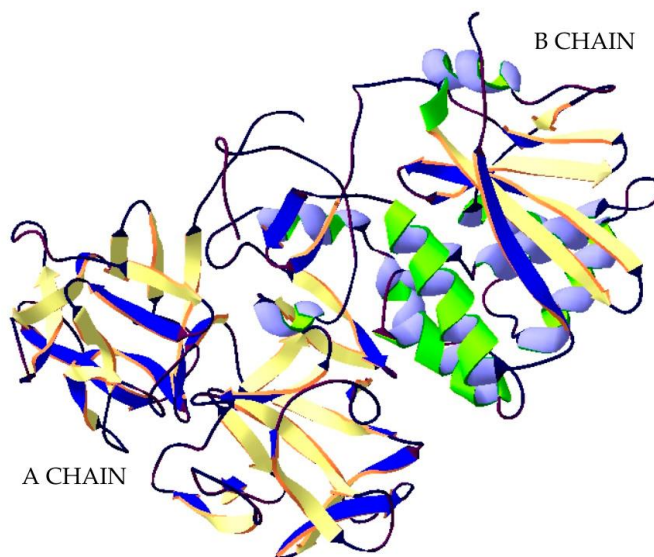


Figura 2 Estructura de la proteína ricina en la que se muestra tanto la cadena A (señalada como A CHAIN) y la B (B CHAIN). Fuente: Janik, E., Ceremuga, M., Bijak, J. S. & Bijak, M. Biological toxins as the potential tools for bioterrorism. *Int J Mol Sci* 20, (2019).

Existen dos isoformas diferentes de ricina, conocidas como ricina D y ricina E, las cuales tienen punto isoeléctrico y citotoxicidad distintos, siendo mayor la toxicidad de la ricina D. Esta diferencia de citotoxicidad se debe a que la ricina E posee una histidina en la posición 248 del subdominio 2 γ , mientras que la ricina D presenta una tirosina en esa posición. La tirosina es un aminoácido clave para la unión a la galactosa, por lo que la sustitución por otro aminoácido en la ricina E hace que esta tenga menor capacidad de unión a la galactosa, cosa que implica una menor unión a la superficie de la membrana celular y de su internalización en la célula y consecuente citotoxicidad^{2,17}.

Dependiendo de la variedad y el origen, las semillas de ricino pueden contener una o las dos isoformas de la toxina, siendo la isoforma D la única presente en las semillas de gran tamaño originarias de Tailandia, por ejemplo, mientras que en variedades de menor tamaño procedentes de Japón podemos encontrar tanto ricina D como E en una misma semilla^{2,17}.

1.4. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción por el cual la ricina inhibe la síntesis de proteínas fue descrito por primera vez en 1987 por Endo y Tsurugi¹⁸, demostrando que la RTA hidroliza un enlace glicosídico concreto del ARNr de la subunidad 60S de los ribosomas



eucariotas, inhibiendo la unión de factores de elongación claves para la síntesis de proteínas.

A continuación, se hará una breve descripción el proceso de internalización celular de la ricina y de su mecanismo de citotoxicidad.

1.4.1. Unión a la superficie celular y endocitosis

La cadena B de la ricina reconoce carbohidratos de la superficie celular que contienen en la posición terminal una N-acetilgalactosamina o residuos de galactosa unidos mediante enlace β -1,4. Dado que esta clase de receptores son abundantes en muchos tipos diferentes de células, la mayoría de células eucariotas son sensibles a la ricina y, por tanto, a su acción citotóxica. Por otra parte, la ricina también tiene la capacidad de unirse a receptores de manosa gracias a su alto contenido en glicanos con residuos de manosa, aunque estos receptores están presentes en menos tipos celulares que los glicanos con galactosas terminales¹⁹⁻²¹.

Una vez unida a la superficie celular, la ricina es internalizada por endocitosis, la cual puede seguir distintos mecanismos, representados en la figura número 3. La internalización puede llevarse a cabo mediante un proceso dependiente o independiente de clatrina. Aunque el mecanismo de endocitosis de la ricina mejor descrito y más estudiado es el dependiente de clatrina, estudios realizados en cultivos celulares demuestran que aproximadamente la mitad de la internalización de esta toxina se produce mediante mecanismos independientes de clatrina, entre los cuales encontramos las caveolas, balsas lipídicas ricas en esfingolípidos y colesterol que forman pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, y la macropinocitosis, proceso consistente en la formación de vesículas relativamente grandes que envuelven e internalizan la ricina¹⁹⁻²¹.

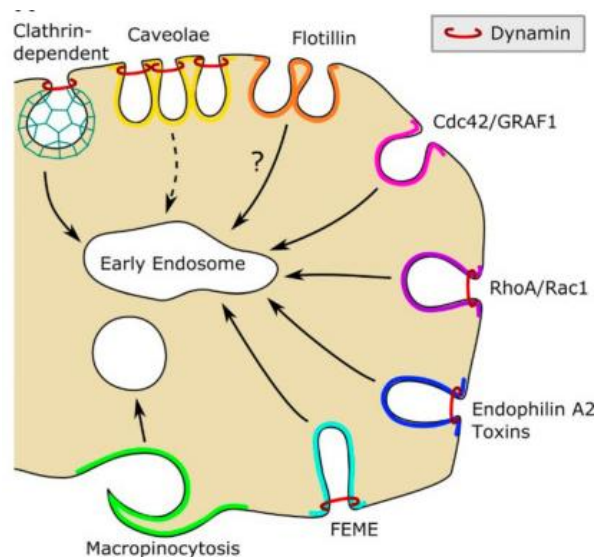


Figura 3 Imagen representativa de los distintos mecanismos de endocitosis mediante los cuales se internaliza la ricina en las células. Fuente: Sandvig, K., Kavaliauskiene, S. & Skotland, T. The protein toxins ricin and shiga toxin as tools to explore cellular mechanisms of internalization and intracellular transport. Toxins vol. 13.

1.4.2. Transporte al retículo endoplasmático y translocación al citosol

Una vez dentro de la célula, la ricina es transportada mediante endosomas. La mayor parte de la toxina internalizada puede transportarse de vuelta a la superficie celular para su exocitosis o transferirse a lisosomas para su degradación, y el resto llega al aparato de Golgi²². Se ha visto que la eficacia del transporte de la ricina desde los endosomas hasta los lisosomas para su degradación depende del tipo de receptor utilizado para su internalización, siendo más eficiente en los casos en que se internaliza mediante unión a residuos de manosa respecto a la vía iniciada por la unión a residuos de galactosa²³.

En un estudio realizado en células BHK-21 con el objetivo de analizar la proporción de moléculas de ricina internalizadas que consiguen llegar al aparato de Golgi, se estimó que solo el 5% de estas moléculas endocitadas llega a entrar finalmente en este orgánulo²⁴.

A continuación, la ricina llega al retículo endoplasmático (RE) mediante transporte retrogrado desde el aparato de Golgi. Este transporte se lleva a cabo mediante la interacción de la RTB con la calreticulina, una proteína luminal del RE cuya función es la de evitar la exportación de proteínas mal plegadas desde el RE al aparato de Golgi.

Esta calreticulina está marcada con el péptido señal KDEL, una secuencia de aminoácidos que, al ser reconocida por receptores específicos, provoca el transporte de la proteína marcada desde el aparato de Golgi hasta el RE mediante vesículas recubiertas de proteína coatómera I (COPI)²².

No obstante, esta no es la única vía de transporte disponible para llevar la ricina del aparato de Golgi al RE, sino que se conoce la existencia de otras vías como la translocación mediada por vesículas COPII, ya que se ha demostrado que la inhibición de esta vía no proporciona a las células resistencia a la acción citotóxica de la ricina^{22,25-27}. Por lo tanto, parece ser que tanto los componentes de COPI como los de COPII tienen un papel importante en el transporte de la ricina desde el aparato de Golgi hasta el RE.

Una vez la ricina alcanza el RE, se produce la escisión del enlace disulfuro que une las cadenas A y B mediante la acción reductasa de la proteína disulfuro isomerasa, con lo que se libera la RTA, activando su actividad catalítica. A continuación, se cree que la RTA es desplegada en el lumen del RE y reconocida por las chaperonas como una proteína mal plegada, lo que provoca su translocación al citosol mediante un proceso que involucra el complejo secretasa 61 (Sec61), un complejo proteico transmembrana del retículo endoplasmático que media la translocación de polipéptidos mal plegados entre el retículo y el citosol para ser degradados por los proteasomas^{22,28}.

No obstante, en el citosol, una parte de las moléculas de RTA puede evitar la degradación por parte de los proteasomas debido a su bajo contenido en residuos de lisina (únicamente 2 residuos por molécula), que son los sitios de unión de las cadenas de poliubiquitina necesarias para el reconocimiento y degradación en los proteasomas, aunque gran parte de las moléculas de RTA que llegan al citosol no consiguen eludir esta degradación^{22,28}.

1.4.3. Mecanismo de citotoxicidad

Ya en el citosol, la RTA debe volver a su forma activa plegada para recuperar su actividad citotóxica. Esto se puede llevar a cabo mediante distintos mecanismos, como la unión a chaperonas citosólicas, el plegado mediado por ribosomas y la unión a factores ribosomales y proteasomales²⁹.

Una vez recuperada su forma activa, la RTA se une a la porción 28S de la subunidad ribosomal 60S y se produce la depurinación catalítica de la primera adenina del bucle GAGA, que se encuentra a su vez dentro del bucle sarcina-ricina (SRL), una secuencia altamente conservada en el ARN ribosómico 28S (Figura 4) que actúa como sitio de unión a factores ribosomales de elongación, inhibiendo así la síntesis de proteínas. Esto tiene como consecuencia distintos marcadores típicos de la apoptosis celular, es decir, la muerte de las células, como la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos, fragmentación del ADN y deformación de la membrana celular. Los mecanismos de apoptosis inducida por ricina se basan en la activación de proteasas caspasas para iniciar la vía extrínseca de la apoptosis, miembros de la familia Bcl-2, para activar la vía intrínseca, y vías de señalización de estrés celular, así como a causa de la acción directa o indirecta de la ricina sobre el ADN y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)^{22,29-31}. Además, se ha visto que la interacción de la cadena B con glicoproteínas y glicolípidos de membrana puede activar vías de señalización que llevan a la apoptosis celular³².

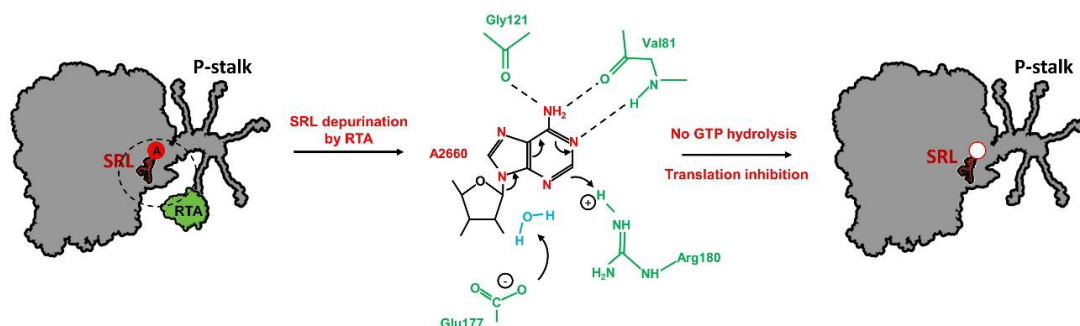


Figura 4 Mecanismo de acción de la RTA sobre el bucle SRL del ARNr 28S, por el cual se produce la escisión de una adenina de esta secuencia. Fuente: Grela, P., Szajwaj, M., Horbowicz-Drozdal, P. & Tchórzewski, M. How ricin damages the ribosome. Toxins vol. 11.

Por otra parte, la depurinación del ARNr 28S por acción de la RTA provoca la activación de la vía conocida como respuesta al estrés ribotóxico, una vía activada por proteínas quinasas que desencadena múltiples vías de transducción de señales proinflamatorias mediante la activación de diversas citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, como TNF- α y las interleucinas 1, 6 y 8, así como de la vía p38 MAPK, involucrada en la inflamación, la apoptosis celular y la autofagia (proceso por el cual las células descomponen proteínas y otras moléculas en su citoplasma para la supervivencia a períodos de estrés o ayuno), entre otros procesos (Figura 5)^{22,33,34}.



No obstante, la acción de la ricina no se limita únicamente al ARNr, sino que también actúa sobre el ADN nuclear, de forma independiente a la inhibición de la síntesis proteica y la apoptosis (Figura 5). Este daño al ADN se debe a la acción depurinadora de la RTA, mediante la cual se libera adenina de las cadenas de ADN, y a la inhibición de la reparación del ADN por la depurinación de la poli-ADP-ribosa polimerasa, una enzima necesaria para la vía de reparación del ADN por escisión de bases dañadas^{22,35}.

Por último, respecto a las ROS, se ha demostrado que la ricina aumenta su producción mediante la reducción de los niveles de glutatión reducido, responsable de la eliminación de las ROS. Además, las ROS son necesarias para la inducción de la apoptosis mediada por ricina, ya que intervienen en la vía apoptótica de las caspasas³⁶.

En conclusión, la acción citotóxica de la ricina se debe a una combinación de múltiples vías que tienen como consecuencia final la muerte celular.

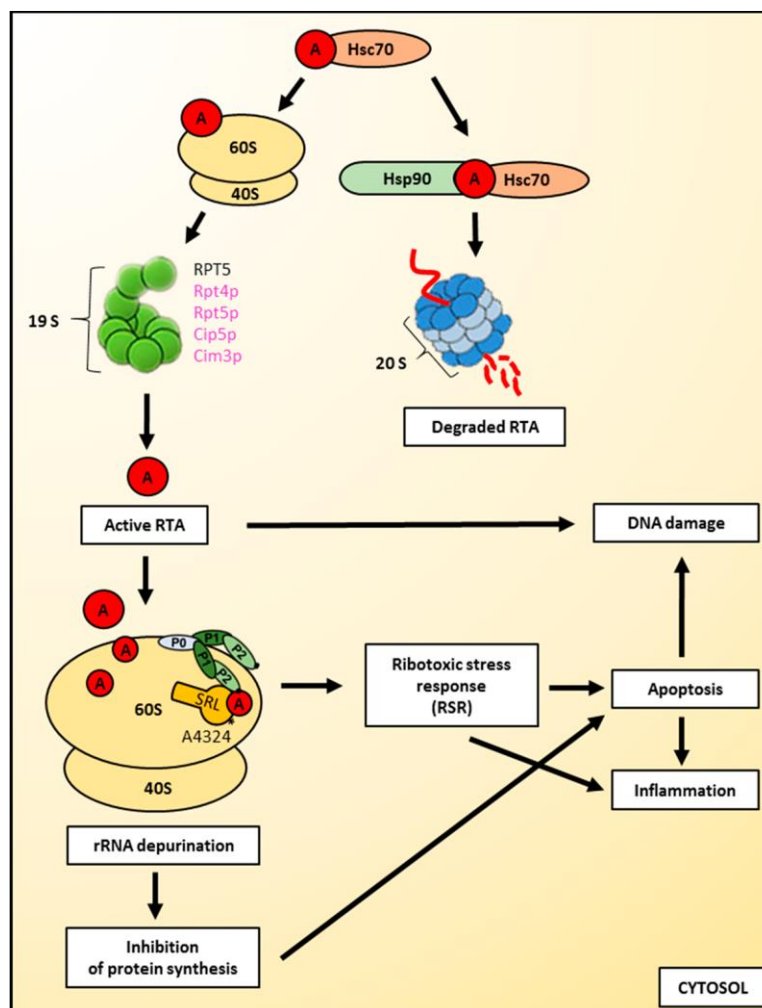


Figura 5 Representación de la ruta seguida por la RTA una vez ha llegado al citosol y de las consecuencias para la célula de su actividad citotóxica sobre los ribosomas. Fuente: Sowa-Rogozńska, N., Sominka, H., Nowakowska-Gołacka, J., Sandvig, K. & Słomińska-Wojewódzka, M. Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin. *Toxins* vol. 11.

1.5. Efectos sobre el organismo de la intoxicación por ricina

Dado que las células endoteliales presentan una gran cantidad de receptores de manosa en su superficie, son especialmente sensibles a la ricina y el daño producido en estas células es el responsable de la mayor parte de síntomas del envenenamiento por ricina, debido al llamado síndrome de fuga capilar. Este síndrome consiste en la salida del plasma sanguíneo de los capilares hacia los tejidos circundantes debido al deterioro de las células de las paredes vasculares, causando hipotensión, hemoconcentración e hipoalbuminemia debido a la pérdida de plasma, provocando daños en músculos y órganos debido a la perfusión disfuncional de los tejidos y el daño vascular³⁷.

El hígado y los riñones resultan grave y rápidamente afectados por el envenenamiento por ricina, ya que son los encargados de la eliminación rápida de la toxina de la circulación sanguínea. En el hígado, son especialmente sensibles a la ricina las células de Kupffer (KCs) y las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSECs), donde la tasa de internalización de moléculas de ricina y muerte celular es elevada. La destrucción de las células Kupffer afecta a la capacidad del hígado de eliminar las toxinas presentes en el organismo empeorando aún más el daño producido por el envenenamiento por ricina³⁷.

Las KCs, también conocidas como células de Browicz-Kupffer, son macrófagos residentes del hígado y sus funciones principales son la eliminación de sustancias extrañas al organismo y la regulación de la respuesta inflamatoria. Estas células tienen un papel vital en la respuesta del hígado a las lesiones, respondiendo a la degradación celular con la liberación de citoquinas proinflamatorias. El daño en las KCs también provoca un aumento del estrés oxidativo tanto en el hígado como en los riñones, contribuyendo a la disfunción de estos órganos^{37,38}. Por otra parte, las LSECs son células endoteliales altamente especializadas que constituyen una barrera permeable entre las células sanguíneas y los hepatocitos y las células estrelladas del hígado. La función principal de las LSECs es la de mantener una presión portal baja a pesar de los cambios de flujo sanguíneo hacia el hígado derivados de la digestión de los alimentos ingeridos. Además, mantienen la quiescencia de las células estrelladas para inhibir la vasoconstricción intrahepática y el desarrollo de fibrosis³⁹.

Tanto las KCs como las LSECs endocitan la ricina con una gran avidez⁴⁰ mediante dos vías distintas de internalización, una mediada por residuos de galactosilo y otra por receptores de manosa, siendo esta última la más eficiente^{40,41}, haciendo que estas células sean altamente sensibles a la toxicidad de la ricina, como se ha demostrado ampliamente en numerosos estudios en los que se ha utilizado la ricina para deplecionar específicamente y de forma eficaz las KCs y las LSECs para la purificación de hepatocitos extraídos de ratones y ratas⁴²⁻⁴⁴.

Se ha demostrado en modelos animales que la inflamación y patología hepáticas derivadas de la intoxicación por ricina se deben a respuestas de defensa del propio organismo contra la toxina, como la afluencia de neutrófilos al hígado, la expresión de

quimiocinas, la deposición de fibrina y la congestión de glóbulos rojos en las células parenquimales hepáticas⁴⁵.

En un estudio publicado en 2019⁴⁰ se demostró que es posible inhibir la apoptosis de las KCs y LSECs inducida por ricina con el uso de anticuerpos monoclonales anti-ricina, reduciendo el daño hepático derivado de la apoptosis celular por intoxicación por ricina, siendo esta acción protectora mucho más eficaz en KCs que en LSECs, aunque esto aún no se ha demostrado en humanos.

En cuanto a la sintomatología clínica del envenenamiento por ricina, al igual que su gravedad, depende de la vía de entrada de la toxina al organismo, pero algunos son comunes a la mayoría de vías de exposición, como vómitos, diarrea, fatiga, problemas vasculares como hipotensión e hipovolemia, fallo renal y hepático o mareos y confusión³⁷.

1.6. La ricina como arma biológica

Debido a su alta toxicidad y fácil acceso, durante las últimas décadas se ha utilizado la ricina como arma biológica. El caso más conocido de homicidio por envenenamiento con ricina es el del periodista de la BBC búlgaro Georgi Markov en el año 1978, disidente del régimen comunista instaurado en Bulgaria en aquella época, mediante una bala de ricina disparada con un arma de fuego camuflada como paraguas, consiguiendo la inoculación del veneno por vía intramuscular. Este caso es muy famoso por ser el primer homicidio conocido de un personaje público mediante el envenenamiento por ricina⁴⁶.

Algunos casos conocidos de intentos de homicidio con ricina son el de Boris Korczak, un agente doble de la CIA que recibió un perdigón de ricina en Virginia (USA) en el año 1981 que impactó y penetró uno de sus riñones, provocándole graves síntomas desde aproximadamente tres horas después de la inoculación hasta varios meses más tarde, o el de el cardiólogo Michael Farrar en Missouri en 1995, perpetrado por su esposa Debora Green, quien se lo administró a través de la comida, provocándole severos daños en el corazón y el cerebro⁴⁶.

Más recientemente, en 2013, el por aquel entonces presidente de los Estados Unidos Barack Obama, el senador Roger Wicker y el alcalde Michael Bloomberg

fueron el objetivo de varias cartas contaminadas con ricina, con la intención de provocarles la muerte por envenenamiento⁴⁶.

En cuanto a sus usos como arma a gran escala, Estados Unidos desarrolló un programa de investigación sobre el uso de la ricina como arma de destrucción masiva a finales de la Primera Guerra Mundial, con el objetivo de usarla como sustitutivo del fosgeno, un agente neumotóxico muy utilizado como arma en aquel momento, ya que la ricina tiene una toxicidad unas 40 veces mayor. Además, se han encontrado protocolos de extracción y purificación de ricina y de fabricación de bombas y aerosoles compuestos por esta toxina diseñados por grupos paramilitares y grupos terroristas como Al Qaeda, pero estos protocolos no permiten la obtención de armas eficaces para una diseminación adecuada de la toxina, con lo que no son efectivos para la fabricación de armas de destrucción masiva².

Por lo tanto, aunque de momento sería difícil utilizar la ricina para un ataque bioterrorista con víctimas masivas, sí representaría una amenaza en ataques a pequeña escala, que aunque no produzcan una destrucción masiva, podrían infundir un gran terror en la población, lo que provocaría una crisis social y económica local².

1.7. Importancia de la detección de la ricina

Actualmente, la ricina se considera una de las cinco toxinas más potentes del mundo, junto con la toxina del tétano, la botulínica, la diftérica y la gramicidina⁴⁷, y actúa inhibiendo la síntesis proteica por parte de los ribosomas, provocando la muerte celular y, posteriormente, un fallo multiorgánico y la muerte en un período de tiempo de entre 36 y 72 horas después de la exposición a ricina, un tiempo que depende de la vía de exposición⁴⁸.

La ricina se encuentra listada como arma con potencial bioterrorista tanto por la Organización Internacional para la Prohibición de las Armas Químicas (OPCW, *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*) como por la Convención sobre las Armas Biológicas y Toxinas (BTWC, *Biological and Toxin Weapons Convention*). Tanto es así que, por su alta toxicidad y fácil disponibilidad, la ricina es considerada como uno de los agentes tóxicos más probables para ser usados como arma bioterrorista, a través de alimentos y aguas, y el autoenvenenamiento⁴⁷.



Como se ha mencionado anteriormente, el ricino y productos derivados de esta planta son muy utilizados en la industria, con lo que un gran número de trabajadores de este ámbito están expuestos a la ricina y, además, los productos que se fabrican con esta planta pueden contaminarse con la toxina, por lo que es de gran importancia llevar un control exhaustivo de calidad y seguridad alimentaria, de protección del personal y de control de contaminaciones y vertidos en aguas y entornos cercanos, para detectar rápidamente las contaminaciones o intoxicaciones por ricina. Por lo tanto, la detección rápida y sensible de la ricina es crucial para la lucha contra el bioterrorismo y las intoxicaciones accidentales por alimentos o aguas contaminadas.

Por otra parte, la detección temprana de la intoxicación por ricina es crucial para la aplicación rápida del tratamiento pertinente y aumentar así las probabilidades de vida de la víctima.

Por todas estas razones, es de gran importancia el desarrollo de métodos rápidos, sensibles y fiables de detección de ricina, tanto en muestras biológicas como alimentarias o ambientales.

2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La hipótesis planteada en este Trabajo de Fin de Máster es que la selección de las técnicas más apropiadas en cada caso para la detección y cuantificación de la proteína ricina, junto con el desarrollo e implementación de tecnologías avanzadas y enfoques innovadores, permitirá mejorar sustancialmente la sensibilidad, especificidad y velocidad de detección y cuantificación de esta toxina. Además, se espera que las nuevas tecnologías contribuyan a lograr avances en términos de portabilidad y rapidez, facilitando su aplicación en diferentes situaciones y entornos. Esto fortalecerá los sistemas de seguridad alimentaria y lucha contra el bioterrorismo y la detección temprana de casos de envenenamiento o intoxicación.

Objetivos

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es revisar y describir los métodos de detección y cuantificación de ricina existentes actualmente, analizando las ventajas y limitaciones de cada uno, así como su aplicabilidad a diferentes tipos de muestras y situaciones.

Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Proporcionar una visión general sobre la historia de la planta de ricino y la ricina extraída de sus semillas, tanto en el ámbito terapéutico como en el criminal. Además, se analizarán los efectos de la ricina en el organismo y el mecanismo mediante el cual ejerce su acción citotóxica.
2. Realizar una revisión de las publicaciones científicas disponibles sobre los métodos de detección y cuantificación de la ricina, tanto tradicionales como las nuevas tecnologías y enfoques emergentes.
3. Evaluar la sensibilidad y especificidad de los distintos métodos de detección y cuantificación disponibles actualmente, así como sus ventajas y limitaciones en distintas situaciones, incluyendo la detección temprana de amenazas bioterroristas y la detección clínica y forense en casos de envenenamiento.



4. Investigar métodos y tecnologías emergentes y evaluar su potencial para mejorar la detección y cuantificación de la ricina en términos de sensibilidad, especificidad y reducción del tiempo de análisis.
5. Detectar los aspectos a mejorar de los métodos de detección y cuantificación actuales, identificando posibles futuras líneas de investigación en el ámbito de la detección de la ricina.

Mediante la consecución de los objetivos descritos, se pretende proporcionar una visión general del estado actual de los métodos disponibles para detectar y cuantificar la ricina y sus perspectivas de futuro, para contribuir al avance en la investigación y desarrollo de los métodos más eficaces y rápidos aplicables tanto en el control de contaminaciones alimentarias y ambientales como en el ámbito de la lucha contra el bioterrorismo o la salud pública.

3. Metodología

En este apartado se describirá la metodología utilizada durante la investigación bibliográfica llevada a cabo para el desarrollo del presente Trabajo de Fin de Máster.

Para la búsqueda y recopilación bibliográfica, se utilizaron bases de datos científicas como PubMed, Scopus y Web of Science para buscar artículos, revisiones y libros relevantes introduciendo palabras clave como “ricina”, “detección y cuantificación de ricina” o “citotoxicidad de la ricina”, entre otros, tanto en español como en inglés.

Para la selección de las publicaciones, se aplicaron criterios de inclusión y exclusión como la relevancia para el tema, el idioma y la actualidad y calidad científica de la información.

De las publicaciones seleccionadas, se extrajo la información más relevante para el presente trabajo, incluyendo los datos sobre la estructura, actividad citotóxica, aplicaciones médicas e industriales de la ricina, así como los métodos de detección de ricina descritos, los tipos de muestras utilizados, los límites de detección y los resultados obtenidos en los distintos estudios, para su posterior análisis y comparación, evaluando las ventajas e inconvenientes de cada uno en términos de sensibilidad, especificidad, tiempo de análisis, costos y aplicabilidad en los distintos tipos de muestra.

Los resultados de esta búsqueda y comparación se sintetizaron para una presentación clara y concisa, utilizando imágenes y tablas, tanto de elaboración propia como de las publicaciones seleccionadas.

Por último, se extrajeron unas conclusiones en base a la información expuesta sobre la eficacia y aplicabilidad de los distintos métodos de detección de la ricina, así como sobre la idoneidad de cada uno y las perspectivas de futuro del tema y desafíos a abordar en un futuro.

4. Métodos de detección y cuantificación de la ricina

Se han investigado y desarrollado numerosos métodos para la detección y cuantificación de la ricina, siempre buscando la mayor especificidad y sensibilidad en el menor tiempo posible.

Estos métodos se basan en la identificación de las características físicas y bioquímicas propias de la ricina o en las consecuencias de su acción citotóxica e incluyen una gran variedad de técnicas físicas y químicas tanto espectroscópicas como inmunológicas y de fluorescencia, entre otras.

Dada la gran cantidad de métodos desarrollados a lo largo de las últimas décadas para la detección y cuantificación de la ricina, el presente Trabajo de Fin de Máster se centrará únicamente en los métodos convencionales más utilizados y relevantes, clasificándolos en métodos inmunológicos y técnicas espectroscópicas, así como en los últimos avances en este ámbito. Las ventajas, limitaciones y límites de detección de estas técnicas, en el ámbito de la detección y cuantificación de la ricina, se encuentran resumidos en la tabla 1 del Anexo.

4.1. Métodos inmunológicos

4.1.1. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

El Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) es el inmunoensayo más utilizado para la detección de ricina, debido mayormente a que es sensible, específico y sencillo.

Esta es una técnica inmunológica ampliamente usada basada en la inmovilización en una placa de anticuerpos de captura específicos que reconocen y anclan el antígeno a detectar y anticuerpos de detección unidos a una enzima capaz de reaccionar con un ligando específico y generar un producto fácilmente detectable, ya sea por cambio de color y, por tanto, de absorbancia espectrofotométrica, u otro tipo de cambio detectable y cuantificable, de forma que la cantidad de producto producido en la reacción enzimática permite determinar de forma indirecta la cantidad de antígeno presente en la muestra⁴⁹.

La técnica ELISA puede tener distintos formatos: directo, en el que se inmoviliza el antígeno a detectar sobre un soporte y un anticuerpo conjugado con la enzima mencionada se une al antígeno para su detección; indirecto, donde el antígeno inmovilizado forma un complejo con un anticuerpo específico y este es detectado por un anticuerpo secundario de detección conjugado con la enzima; sándwich directo, en el que el antígeno es detectado por dos tipos distintos de anticuerpo, el primario, inmovilizado en el soporte y que se une al antígeno, y el secundario, que está conjugado con la enzima y se une al complejo antígeno-anticuerpo primario; sándwich indirecto, el cual solo se diferencia del formato de sándwich directo en que la enzima no está conjugada con el anticuerpo secundario, sino a un anticuerpo terciario que se une a este y permite la detección; en el formato competitivo, se usa un antígeno de referencia, inmovilizado en el soporte, que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario, al que más tarde se unirá un anticuerpo secundario marcado con la enzima para su detección, de forma que la señal obtenida será inversamente proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra⁴⁹.

El funcionamiento de la técnica ELISA tipo sándwich directo para la detección de ricina está representado de forma esquemática en la figura 6. En primer lugar, se inmoviliza el anticuerpo de captura específico de ricina (Ac anti-RCA60) en la superficie de los pocillos de una placa para ELISA. A continuación, se añade la muestra sospechosa de contener ricina y los controles, tanto positivo como negativo, el primero consistente en ricina a distintas concentraciones y el segundo compuesto por albúmina de suero bovino, una proteína globular de peso molecular muy similar al de la ricina^{48,50}.

Una vez adicionados la muestra y los controles, se añade el anticuerpo de detección marcado con la enzima peroxidasa. Por otra parte, en lugar de utilizar un anticuerpo marcado con peroxidasa, también se puede marcar con biotina, en cuyo caso además se debe añadir estreptavidina-peroxidasa, consistente en una proteína específica de unión a la biotina (la estreptavidina) unida a la enzima peroxidasa^{48,50}.

A continuación, se añade el sustrato de la peroxidasa, orto-fenilendiamina, el cual, por acción de la enzima, dará un producto final soluble de color naranja-marrón que puede leerse espectrofotométricamente a 492 nm, una vez parada la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico. Los valores de absorbancia obtenidos son proporcionales a la cantidad de ricina presente en la muestra, la cual se calcula mediante

la construcción de una recta patrón a partir de la absorbancia de cada concentración conocida de ricina de los patrones positivos^{48,50}.

No obstante, se debe tener en cuenta que los pasos a seguir pueden variar dependiendo del kit de ELISA utilizado, con lo que siempre se debe seguir el protocolo facilitado por el fabricante.

Además, se han desarrollado métodos de ELISA con tiempos de ensayo más cortos utilizando biosensores de fibra óptica basados en fluorescencia, partículas de oro coloidal o electroquimioluminiscencia^{51,52} y actualmente se dispone de kits ELISA especialmente diseñados para la detección de ricina en muestras tanto ambientales como biológicas con límites de detección de entre 0.2 y 14 ng/ml, dependiendo del fabricante y de si se incluyen pasos de enriquecimiento previo en el protocolo o no⁵³⁻⁵⁵.

Esta técnica se puede combinar con otras metodologías como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polimerase Chain Reaction*) o la espectrometría de masas (MS), de las cuales se hablará en más detalle en los siguientes apartados⁵³.

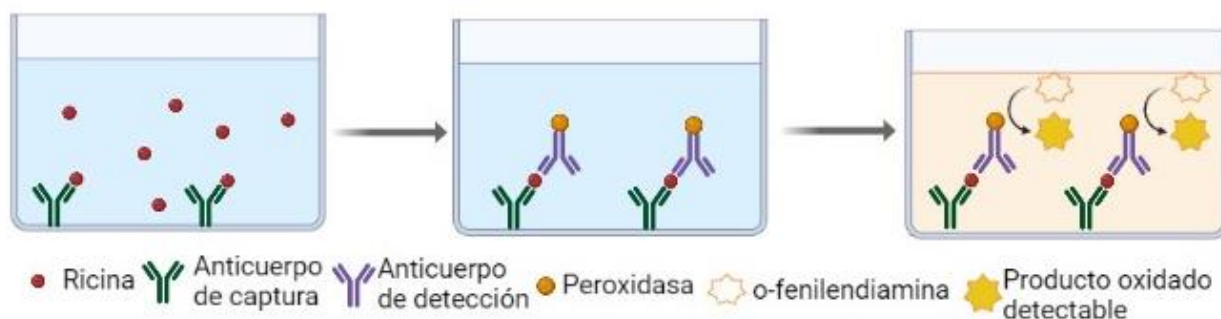


Figura 6 Representación gráfica del funcionamiento de un ensayo ELISA tipo sándwich para la detección de ricina. Se muestra de izquierda a derecha la unión de la ricina a los anticuerpos de captura específicos inmovilizados en el pocillo de ELISA, la unión de los anticuerpos de detección, marcados con la enzima peroxidasa, y la adición del sustrato de esta enzima, la orto-fenilendiamina, y producción de la señal detectable que permitirá la detección y cuantificación de la ricina. Fuente: Imagen de elaboración propia utilizando la aplicación BioRender.

4.1.2. Inmunoensayo de Flujo Lateral (LFIA)

Por otra parte, atendiendo a la gran importancia del diagnóstico temprano de los envenenamientos por ricina para la aplicación rápida del tratamiento adecuado, se han

intentado desarrollar métodos rápidos, sensibles y fiables para la detección *in situ* de la ricina mediante columnas de inmunoensayo con anticuerpos anti-ricina acoplados. Este es el caso del inmunoensayo de flujo lateral (LFIA, *Lateral Flow Immunoassay*), que consiste en un ensayo inmunocromatográfico en el que se aplica una pequeña cantidad de la muestra a analizar en una columna compuesta por distintas zonas funcionales (Figura 7): la zona de entrada de la muestra; una zona de conjugado, consistente en una membrana de nitrocelulosa cubierta de anticuerpos marcados; la zona de captura o línea de test, en la que se encuentran los anticuerpos específicos de la ricina; la línea de control, que contiene anticuerpos que se unen a moléculas control inherentes al test que dan una señal visible al unirse, lo que permite comprobar que la prueba se ha realizado de forma correcta⁵⁶.

En primer lugar, se deposita la muestra sospechosa de contener ricina en la zona de entrada de la muestra. A continuación, la muestra fluye por capilaridad por la membrana de nitrocelulosa, a lo largo de la cual está la zona del conjugado, donde hay anticuerpos marcados con etiquetas que pueden ser fluoróforos, partículas de oro coloidal o látex, entre otros, que se unen a la ricina que pueda estar presente en la muestra y son los que darán más tarde la señal que permitirá visualizar el resultado del test. El siguiente paso es la llegada de estos anticuerpos a la zona de captura, donde los anticuerpos específicos capturan las moléculas de ricina, y a la línea de control, donde las moléculas control presentes en el propio test se unen a anticuerpos inmovilizados, dando lugar a una señal visible, que puede ser un cambio de color o una emisión de fluorescencia, por ejemplo. Si el test se ha desarrollado correctamente, la señal de la línea de control debe ser visible siempre y si, además, también es visible la línea de test, correspondiente a la zona de captura, significa que el resultado es positivo y la muestra contiene ricina^{57,58}. No obstante, aún no existen muchas publicaciones sobre la aplicación de este método a la detección rápida de envenenamientos por ricina y aún no se ha implementado para el uso rutinario del personal sanitario de urgencia.

Este tipo de tests rápidos son muy utilizados en la detección de sangre, saliva o semen, entre otros fluidos, por la policía científica de los distintos cuerpos de seguridad, debido a su rapidez de detección, y también en el ámbito clínico para la detección de biomarcadores, virus o embarazo, en el ámbito de la seguridad alimentaria y en muestras ambientales para detectar la presencia ciertas moléculas o contaminantes⁵⁶⁻⁵⁸.

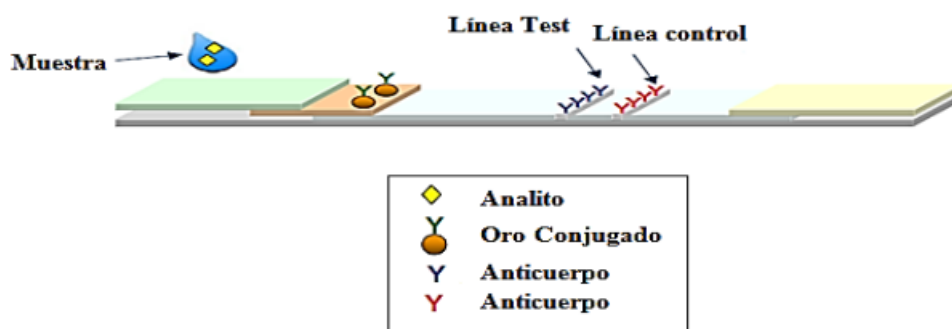


Figura 7 Imagen ilustrativa del funcionamiento de un test LFIA. Fuente: Blanco Covián, L. (2013). Desarrollo de un Inmunoensayo de Flujo lateral para la detección de PSA. Universidad de Oviedo.

Por otro lado, el pasado año 2022 Jia y colaboradores⁵⁹ publicaron una técnica de inmunoensayo mejorada para la detección de diversas toxinas proteicas, entre ellas la ricina, basada en la combinación de espectroscopía Raman mejorada en superficie e inmunoensayo de flujo lateral (SERS-LFIA) utilizando nanopartículas de dióxido de silicio y oro. En este estudio, se desarrollaron unas tiras SERS-LFIA que permiten una detección específica, rápida y muy sensible de la ricina. El funcionamiento de este método se encuentra representado gráficamente en la figura 8 y es el mismo que en el caso anterior con la diferencia de que la visualización de la señal se realiza mediante Raman, una técnica espectroscópica de alta resolución que proporciona información química y estructural de los compuestos presentes en una muestra, permitiendo su identificación sensible y específica, basándose en el estudio de la luz dispersada por el material al irradiarlo directamente, sin ninguna preparación previa, con un haz de luz monocromático, que provoca cambios de frecuencia característicos de cada material. Esto, sumado al hecho de que en el método desarrollado por Jia y colaboradores se utilizan unas nanopartículas marcadas con anticuerpos de detección muy específicos de la ricina, proporciona una técnica de detección con una gran especificidad y sensibilidad para esta toxina, con un límite de detección de 0.1 ng/ml. Además, la sensibilidad obtenida en este método supera en 100 veces la de las tiras de oro coloidal de LFIA convencional, según los autores.

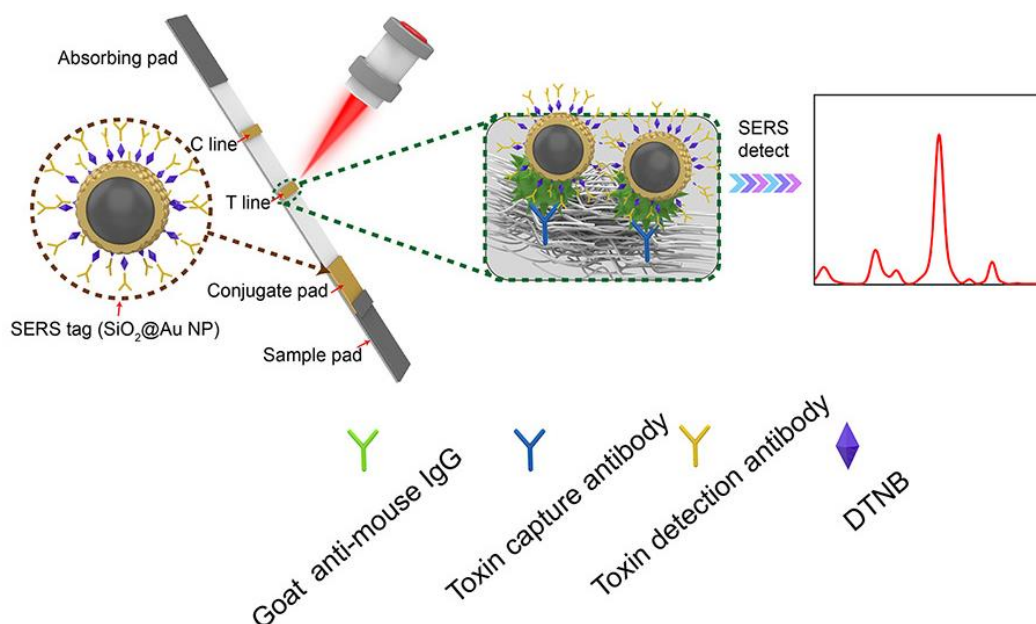


Figura 8 Esquema explicativo del funcionamiento del método de LFIA desarrollado por Jia y colaboradores⁵⁹. De izquierda a derecha, se muestra la estructura de una de las nanopartículas de dióxido de silicio y oro utilizadas en el procedimiento, recubiertas por anticuerpos de detección de la toxina y moléculas reporteras de Raman (DNTB), la tira de prueba, con las diferentes zonas señaladas, siendo irradiada por un haz de luz monocromático, una imagen aumentada de la línea de test, en la que se ven los anticuerpos de captura de la toxina, a los que se unen la toxina y las nanopartículas, y un ejemplo de un espectro obtenido mediante Raman. Fuente: Jia, X. et al. Highly sensitive detection of three protein toxins via SERS-lateral flow immunoassay based on SiO₂@Au nanoparticles. *Nanomedicine* 41, 102522 (2022).

4.1.3. Immunoreacción en Cadena de la Polimerasa (IPCR)

La Immunoreacción en Cadena de la Polimerasa (IPCR, *Immuno-Polymerase Chain Reaction*) combina la especificidad de las técnicas inmunológicas como el ELISA con la sensibilidad que se consigue con la amplificación por PCR, permitiendo la detección y cuantificación de moléculas tradicionalmente detectables por ELISA con una sensibilidad mucho mayor debido a la amplificación exponencial de las combinaciones antígeno-anticuerpo, permitiendo la detección de concentraciones del antígeno del orden de fg/ml. La principal ventaja de la IPCR respecto a la PCR es la capacidad de amplificar moléculas diferentes de ácidos nucleicos gracias a la unión de un conjugado de ADN y anticuerpo. Igual que el ELISA, la IPCR puede llevarse a cabo de forma directa, indirecta, sándwich o competitiva, dependiendo del objetivo del análisis⁶⁰.

En el caso de la detección de ricina, el procedimiento es el mismo que en el ELISA, sustituyendo el conjugado anticuerpo-enzima productora de señal por un conjugado anticuerpo-ADN que se unirá específicamente a la ricina presente en la muestra y, gracias al marcador de ADN, se amplificará por PCR, obteniendo límites de detección que van desde los 10 fg/ml en solución de PBS⁶¹, hasta los 10 pg/ml o 100pg/ml en muestras alimentarias de leche o carne, respectivamente⁶², pasando por un límite de 1 pg/ml en muestras de heces o suero sanguíneo de ratón⁶³.

4.2. Técnicas espectroscópicas

4.2.1. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Como se ha descrito anteriormente, la RTA lleva a cabo una depurinación en el bucle GAGA del ARNr de las células que sufren la internalización de la ricina, liberando adenina, la cual se puede detectar y cuantificar mediante diversos métodos, incluyendo la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). La detección de la adenina liberada por acción de la RTA representa un enfoque muy interesante como método analítico para la detección de ricina, ya que permite la identificación específicamente de la ricina activa, basándose en su actividad enzimática, un aspecto clave en situaciones de ataques bioterroristas o intoxicaciones, por ejemplo, ya que solo la forma activa resulta dañina para el organismo.

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación de los compuestos de una mezcla, que consiste en una fase estacionaria, conocida como columna, y una fase móvil, que arrastra los analitos que componen la mezcla por la fase estacionaria hasta llegar a un detector situado al final de la columna. El tiempo que tarda en llegar cada analito al detector depende de la fuerza de sus interacciones con la fase estacionaria, de forma que los componentes que más interaccionen con la columna serán detectados más tarde que los que interaccionen menos⁶⁴.

Por otra parte, la espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite la detección y cuantificación de compuestos basándose en su relación masa-carga. Consiste en la identificación de los átomos que componen la muestra a analizar,

previamente vaporizada e ionizada, separando sus iones en función de su relación masa-carga. Es muy habitual encontrar esta técnica analítica acoplada como detector a equipos de cromatografía, ya sea de líquidos o de gases⁶⁴.

La LC-MS es una técnica rápida, sensible y selectiva que permite la identificación de la presencia de ricina y su cuantificación en las muestras a partir de la detección de los nucleótidos de adenina liberados por acción de la ricina⁶⁴.

En 2007, Becher y colaboradores⁶⁴ describieron un método de detección de ricina basado en la captura inmunológica de la ricina y la posterior detección por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, siendo esta la primera técnica desarrollada capaz de detectar la ricina activa con una especificidad y sensibilidad elevadas. Más concretamente, este método consiste en la captura de la cadena B mediante esferas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos, una posterior incubación con fragmentos de ARN que contienen la secuencia GAGA, que mimetiza el ARN ribosómico celular, diana de la toxina. El siguiente paso es la separación y detección de la adenina liberada por la cadena A por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas, obteniendo un pico en el cromatograma resultante característico de esta adenina liberada (Figura 9). En ese caso, la separación más efectiva se produjo con una fase móvil compuesta por un 50% de acetonitrilo y un 50% de acetato de amonio, consiguiendo un límite de detección de 50 pg/ml de adenina. Finalmente, mediante una curva de calibración que relaciona el área del pico obtenido para la cantidad de adenina con la concentración de ricina a la que corresponde, se obtiene la cuantificación de la ricina presente en la muestra, con un límite de detección de 2.4 ng/ml a pH 4.

Esta técnica tiene una alta sensibilidad y, a diferencia de otros métodos como la espectrometría de masas por sí sola, permite la detección de la ricina activa. Además, el uso de anticuerpos para la captura de la ricina aporta al método una especificidad mayor, ya que permite aislar la ricina del resto de componentes de la muestra. No obstante, el inconveniente de este método, como recalcan los autores, es el elevado tiempo de incubación, de 24 horas, necesario para que se produzca la reacción de depurinación con la mayor eficacia, lo que puede representar un problema en situaciones en las que la rapidez es un punto clave, como por ejemplo en casos de ataques bioterroristas⁶⁴.

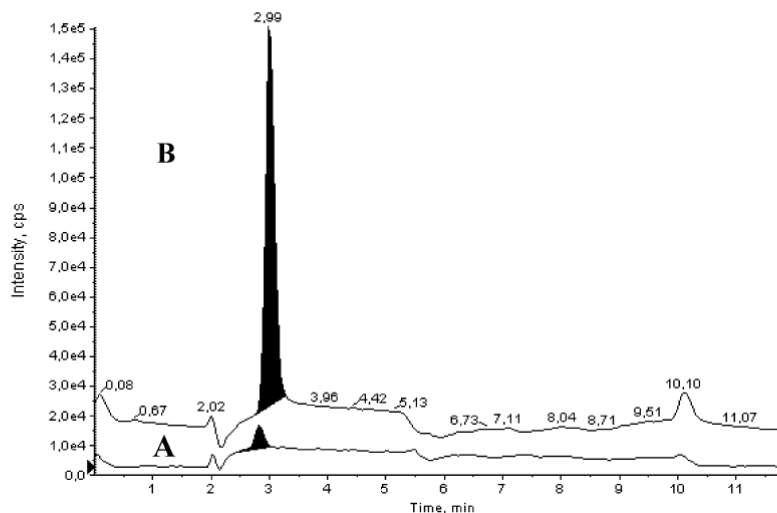


Figura 9 Ejemplo de cromatograma obtenido mediante LC-MS en el que se señala el pico correspondiente a la adenina liberada por acción de la ricina en una muestra con una concentración de la toxina de 1 ng/ml (A) y otra muestra con una concentración de ricina de 20 ng/ml. El gráfico representa el tiempo en minutos (eje x) respecto a la intensidad en cps (cuentas por segundo). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Atlantis C18 con un gradiente de fase móvil de acetonitrilo y acetato de amonio. Fuente: Becher, F., Duriez, E., Volland, H., Tabet, J. C. & Ezan, E. Detection of functional ricin by immunoaffinity and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 79, 659–665 (2007).

Más recientemente, en mayo de este año 2023, Yang y colaboradores⁶⁵ publicaron un nuevo método de detección de la actividad de depurinación mediante LC-MS mejorado. Los aspectos que representan una mejora respecto al método anterior descrito por Becher y colaboradores⁶⁴ son principalmente el pretratamiento de la muestra, en el que se utiliza una membrana de intercambio catiónico fuerte (SCX, *Strong Cationic Exchange*) para aislar los oligos, es decir, las secuencias oligoméricas depurinadas por acción de la RTA, y separarlos de la ricina, con el objetivo de inyectar en el cromatógrafo solo los oligos, evitando así posibles interferencias debidas a la proteína ricina, y la posibilidad de trabajar a pH neutro en lugar de a pH 4, lo que hace que se disminuya el riesgo de falsos positivos a la hora de evaluar la actividad glicosidasa de la ricina, ya que los oligos que se utilizan como sustrato se hidrolizan espontáneamente a pH ácido, liberando adenina que no proviene de la acción enzimática de la ricina.

El pretratamiento de la muestra con el método SCX consiste en una membrana de SCX negativamente cargada a pH ácido. El punto isoeléctrico de la ricina es 7.2, por

lo que en condiciones ácidas se carga de forma positiva, mientras que los oligos utilizados en este estudio permanecen cargados negativamente a pH menor de 4, de forma que al pasar la mezcla de reacción que contiene la ricina, los oligos y la adenina liberada a través la membrana de SCX, la ricina queda retenida y el resto eluye mediante centrifugación, obteniendo una solución de oligos y adenina preparada para su inyección en el cromatógrafo. Además, como se ha dicho anteriormente, una de las ventajas de este método respecto a otros como el descrito por Becher y colaboradores⁶⁴ en 2007 es que permite trabajar a pH neutro para evitar la hidrólisis espontánea de los oligos, que podría dar lugar a falsos positivos. Por lo tanto, y como demuestran en este estudio, es posible realizar el pretratamiento de la muestra para separar la adenina liberada y los oligos de la ricina a pH neutro en lugar de pH 4, obteniendo una separación igualmente buena, ya que la ricina es retenida fuertemente por la membrana SCX incluso a pH neutro. Con este método de separación, podría recuperarse la ricina eluyéndola de la membrana mediante un cambio a pH básico⁶⁵.

Concretamente, el método utilizado por Yang y colaboradores⁶⁵ consiste en un sistema de cromatografía de líquidos con un detector UV ajustable (TUV, *Tunable Ultraviolet*) acoplado a espectrometría de masas de cuadrupolo simple QDa®, con el cual se mide la actividad enzimática de la ricina a partir de la detección de los productos de la depurinación de los oligos y de las alteraciones producidas en dichos oligos, con un límite de detección de la ricina de 1 ng/ml cuando se utiliza como sustrato un fragmento oligomérico de secuencia r(GCGCG)dAr(GAGCGC).

En resumen, este método representa una mejora en la utilización de la detección de adenina liberada por la acción enzimática de la ricina para la detección y cuantificación de esta toxina mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas por su mayor sensibilidad, además de la introducción de un método de pretratamiento de la muestra basado en SCX que permite una separación rápida de los oligos y la adenina liberada para evitar interferencias en el cromatograma por parte de la ricina⁶⁵.

No obstante, la LC-MS no solo se puede aplicar a la detección de ricina desde el punto de vista de la detección de la adenina liberada, sino que existen otras estrategias para las que esta técnica resulta de gran utilidad, como es el caso del método publicado por Liang y colaboradores en 2020⁶⁶, basado en la detección de la ricina intacta, es

decir, con sus dos cadenas presentes. Dado que la ricina solo actúa sobre las células si tiene tanto la cadena A como la B disponibles para unirse a la célula e inactivar los ribosomas, otro enfoque interesante a la hora de detectar esta toxina es la detección simultánea de las dos cadenas. En el estudio de Liang y colaboradores se desarrolla un método de detección y cuantificación de ricina en muestras alimentarias basado en una digestión en tándem con tripsina y Glu-C y posterior detección y cuantificación de péptidos específicos de la ricina mediante espectrometría de masas para la detección simultánea de las dos cadenas de la ricina. Concretamente, las muestras analizadas fueron bebidas de consumo habitual, como leche y zumo de naranja.

En primer lugar, en este estudio se capturó la ricina presente en las muestras mediante bolas magnéticas de estreptavidina recubiertas con anticuerpos policlonales biotinilados anti-ricina. De esta forma, se consigue aislar y enriquecer de forma eficiente la ricina de matrices complejas como pueden ser las muestras alimentarias. Una vez aislada la ricina, ésta se escinde mediante digestión en tándem tripsina/Glu-C y posterior detección y cuantificación por LC-MS, un método desarrollado por el mismo grupo que firma este estudio y que permite la obtención de péptidos cortos específicos de cada una de las dos cadenas de la ricina. Este método provoca la escisión de la ricina nativa mediante una incubación con tripsina, una enzima peptidasa que hidroliza los enlaces peptídicos, y Glu-C, una serina peptidasa que tiene como diana los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico, abundantes en la ricina. De este modo, se consigue hidrolizar la ricina en una serie de péptidos característicos de esta toxina detectables por espectrometría de masas. La introducción de la enzima Glu-C, un aspecto novedoso respecto a otros procedimientos en los que únicamente se usa tripsina, permite ganar especificidad en los péptidos generados, ya que con el uso individual de la tripsina se obtienen algunos péptidos que no están presentes únicamente en la ricina, como por ejemplo el péptido T19B, que también se encuentra en la proteína conocida como ‘polilla de invierno’ o ‘*winter moth*’. Por lo tanto, con este método se consiguen péptidos más específicos de la ricina, obteniendo un aumento de la sensibilidad, con un límite de cuantificación por debajo de 1.0 ng/ml⁶⁶.

Por otra parte, también resulta interesante el estudio de las aplicaciones de la LC-MS en la detección y cuantificación de ricina en fluidos biológicos. El estudio más reciente sobre la detección y cuantificación de ricina en sangre mediante esta técnica es el publicado por Feldberg y colaboradores en 2021⁶⁷, en el que desarrollan un método

rápido y sensible de detección y cuantificación de ricina en plasma mediante LC-MS. Este método empieza con un paso de captura de la ricina similar al del método anterior, el de Liang y colaboradores⁶⁶, pero en este caso las esferas que se utilizan están compuestas por lectina-agarosa. Debido a la alta afinidad de la cadena B por los carbohidratos, la ricina queda retenida en las bolas por medio de la unión de la RTB a la lectina. Después de un par de lavados con bicarbonato de amonio, la ricina es separada de las esferas mediante desnaturalización de la proteína por calor y posterior digestión con tripsina, obteniendo así una serie de péptidos característicos de la ricina que se inyectan en el cromatógrafo para su detección y cuantificación. El límite de detección de este método es de 5 ng/ml en suero, con un tiempo necesario de 2,5 horas desde el inicio del tratamiento de la muestra hasta la obtención del resultado final, con lo que se trata de una técnica sensible y rápida muy útil para la detección precoz de la intoxicación por ricina. Además, se probó este método en una muestra de líquido abdominal de un paciente 72 horas después de que se autoinyectara ricina con intención de suicidarse y se consiguió detectar y cuantificar la toxina, cosa que no fue posible con otros ensayos como por ejemplo ELISA, demostrando la alta sensibilidad del método y la amplitud del rango de horas en que es posible detectar la ricina desde la exposición a ésta.

4.2.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Otra técnica muy útil en cuanto a la detección de la ricina es la espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF/MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry*).

La técnica MALDI-TOF/MS utiliza la capacidad de las moléculas mezcladas con una matriz orgánica de absorber la luz láser e ionizarse para detectar compuestos en un rango de masa molecular amplio. El proceso de ionización por MALDI empieza con el mezclado de la muestra a analizar con la matriz orgánica sobre una superficie de metal, haciendo que solidifiquen juntas cuando se evapora el solvente. La aplicación de pulsos cortos de láser en alto vacío sobre esta mezcla provoca la conversión de la energía absorbida por parte de la matriz en energía de excitación y transferencia de protones a la muestra para su ionización. Debido a la alta temperatura en el área irradiada por el láser, los iones en fase sólida pasan a fase gaseosa. Por otra parte, el

analizador TOF, el más usado acoplado a MALDI, permite determinar la masa de los iones formados mediante la medida del tiempo que tardan estos en llegar desde la fuente al detector, consiguiendo así información estructural y de composición sobre la molécula original. En la figura 10 se muestra un esquema representativo del funcionamiento de esta técnica^{68,69}.

En 2021, Hoyt y colaboradores⁷⁰ publicaron un método novedoso de detección de la ricina vía actividad enzimática, mediante detección de la liberación de adenina, y estructural, mediante reconocimiento de secuencias peptídicas específicas, utilizando extracción con bolas magnéticas recubiertas de galactosas terminales acoplada a detección por MALDI-TOF/MS de sobremesa, un equipo común en los laboratorios clínicos de microbiología, lo que facilita la implementación de este método para la detección rápida, efectiva y económica de la ricina en muestras de pacientes sospechosos de intoxicación por esta toxina. El límite de detección de este método es de 8 ng/ml en el análisis de la actividad enzimática y de 500 ng/ml en la detección estructural^{68,69}.

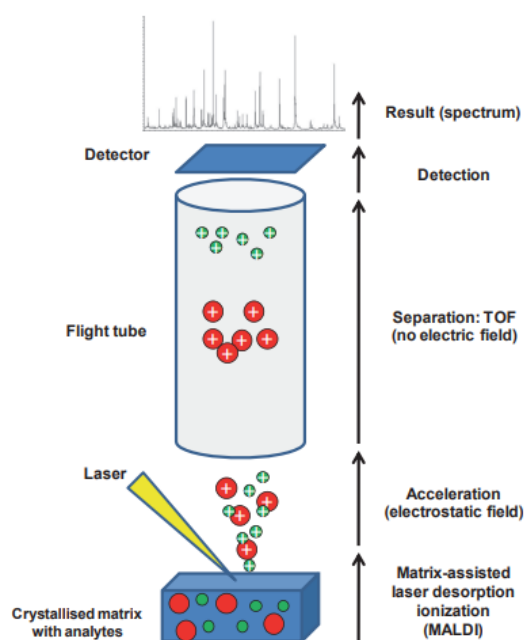


Figura 10 Funcionamiento de la espectrometría MALDI-TOF/MS. Fuente: Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiology Reviews, 36(2), 380–407.

4.2.3. Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

La Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) es una técnica de detección óptica para el análisis en tiempo real de las interacciones biomoleculares de unión entre moléculas, basada en los cambios en la intensidad de la luz reflejada cuando las moléculas de interés se unen a los ligandos inmovilizados en la superficie del sensor o en nanopartículas o nanoprismas. Un detector mide en tiempo real estos cambios en la luz reflejada y proporciona un sensograma, que informa sobre el número de uniones entre las moléculas que se dan en cada momento (Figura 11)⁷¹.

En el año 2013, Nagatsuka y colaboradores⁷¹ publicaron un método de detección y cuantificación de ricina basado en SPR utilizando nanopartículas recubiertas de residuos de D-manosa, a los cuales se une con gran afinidad la cadena B de la ricina, obteniendo un límite de detección de 30 ng/ml. Otro ejemplo de la utilización de la SPR para detectar y cuantificar ricina es el método publicado por Anderson y colaboradores⁷², también en 2013, en el cual en lugar de residuos de manosa, se utilizaron como elementos de unión a la ricina anticuerpos específicos, consiguiendo un aumento en la especificidad.

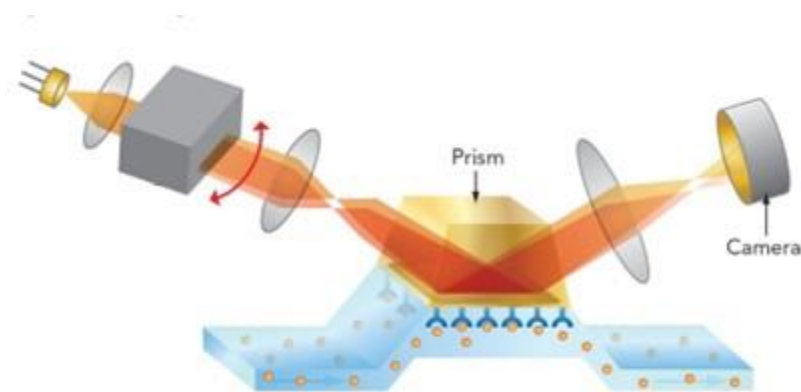


Figura 11 Funcionamiento de la SPR. Se muestra una representación esquemática de como se detecta la unión del analito de interés a los ligandos específicos inmovilizados en la superficie del sensor mediante la medida de los cambios de intensidad producidos en la luz de un láser reflejada a través de un prisma. Fuente: Bruker.com (18 de junio de 2023). *Resonancia de plasmón de superficie para un análisis de alto rendimiento*. Disponible en: <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/surface-plasmon-resonance.html>.

4.3. Nuevos avances en la detección de ricina

4.3.1. Secuenciación directa de ARN con secuenciador ONT

En 2022, Ryan y colaboradores⁷³ desarrollaron un método de detección de la depurinación provocada por la acción citotóxica de la ricina, ya comentada anteriormente, en el que se detecta la pérdida de adenina mediante secuenciación del ARN con secuenciadores de la empresa Oxford Nanopore Technologies (ONT) combinado con un *software* creado por ellos llamado RIPpore que permite cuantificar los cambios en el contenido de adenina del ARNr 28S, con el objetivo de detectar la presencia de RIPs en la muestra.

La secuenciación ONT se diferencia de otras técnicas de secuenciación más convencionales como Illumina por el hecho de no utilizar ADN polimerasas durante el proceso, sino que usa la proteína natural formadora de poros α -hemolisina, también llamada proteína de nanoporos, que se encuentra normalmente en la membrana celular y regula la entrada y salida de la célula de diversas moléculas. En el secuenciador ONT, estas proteínas de nanoporos se encuentran incrustadas en una membrana creada artificialmente, sobre la cual se aplica una corriente eléctrica, creando una corriente iónica que obliga a pasar a las cadenas de ADN o ARN a secuenciar a través de los poros. Esta translocación de las cadenas de ácidos nucleicos se debe a que, a causa del corriente iónico, la parte exterior de la membrana se carga negativamente y la parte interna positivamente, con lo que las cadenas de ADN y ARN, con carga negativa debido a los grupos fosfato, se ven atraídas hacia la cara interna de la membrana. La función de las proteínas de nanoporos en este proceso es dejar pasar las cadenas de ácidos nucleicos de forma individual, permitiendo la translocación de una sola cadena cada vez. Además del control de la velocidad de translocación, estas proteínas también tienen actividad helicasa, con lo que desenrollan los ácidos nucleicos de doble cadena y los convierten en moléculas monocatenarias, que atraviesan el poro. Cuando las cadenas pasan por el poro provocan un cambio en la corriente característico de cada una de las bases nitrogenadas que las conforman, permitiendo identificar, mediante un chip sensor y el software adecuado, la secuencia de cada molécula de ADN o ARN (Figura 12). Las ventajas de la secuenciación Nanopore ONT respecto a otras técnicas de secuenciación son la gran longitud de lectura, permitiendo el análisis de secuencias muy largas, y la

portabilidad del equipo. Por otra parte, esta tecnología presenta una alta tasa de error, por lo que no es tan fiable como otras técnicas⁷⁴.

En el estudio de Ryan y colaboradores⁷³, mencionado al inicio de este apartado, se registró una disminución en la intensidad de la carga eléctrica asociado con la depurinación del bucle SRL del ARNr 28S en células expuestas a ricina respecto a la intensidad obtenida en esta misma secuencia en células no expuestas a la toxina. A partir de esta señal, es posible cuantificar la depurinación del ARN. Este estudio representa la primera vez en que se ha utilizado la secuenciación directa de ARN con secuenciador ONT para la detección de la depurinación causada por RIPs y, más concretamente, por ricina, con un límite de detección de 0.9 ng/ml. No obstante, de momento este método resulta más útil para el ensayo y desarrollo de inhibidores y otros tratamientos contra la ricina que para la detección y cuantificación de esta toxina en muestras de pacientes con sospecha de haber sufrido una intoxicación por ricina, ya que solo se ha probado con cantidades de ricina de entre 1 y 1000 picomolar, mientras que para que la exposición a esta toxina sea letal se necesitan concentraciones del orden de nanomolar a micromolar. Además, otras técnicas más tradicionales como el ELISA o la espectrometría de masas proporcionan una detección mucho más precisa y fiable que la secuenciación de ARN.

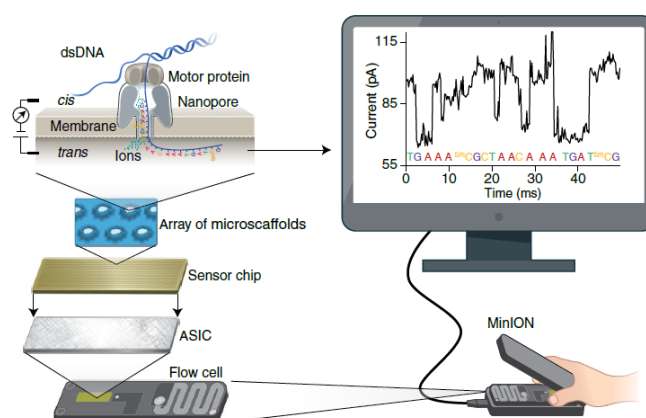


Figura 12 Funcionamiento de la secuenciación directa de ONT. Se muestra el procedimiento de secuenciación de una doble cadena de ADN mediante un secuenciador MinION de la casa comercial ONT. Fuente: Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. & Au, K. F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nature Biotechnology vol. 39 1348–1365.

4.3.2. Bioensayos

Un ensayo de citotoxicidad en cultivos celulares puede representar una buena estrategia para la detección rápida y sensible de ricina en muestras complejas.

En el año 2012, Pauly y colaboradores⁷⁵ desarrollaron un método de detección de ricina y aglutinina mediante ensayo de citotoxicidad en tiempo real empleando células Vero, que es una línea celular muy utilizada en el desarrollo de vacunas antivirales y para ensayos de citotoxicidad que fue aislada a partir de células epiteliales de riñón de mono verde africano⁷⁶. Este método consiste en la incubación de las células con la muestra sospechosa de contener la toxina y la evaluación posterior de los cambios morfológicos producidos en las células debido a la acción citotóxica de la ricina mediante un sistema de monitoreo electrónico de las células en tiempo real y recuento celular por medición de la impedancia eléctrica. En el caso de Pauly y colaboradores, las muestras fueron matrices alimentarias a las que se les había añadido ricina en distintas concentraciones, con un límite de detección de entre 5.6 y 200 ng/ml, dependiendo del tipo de muestra. Además, también se evaluó la capacidad de detección de este método en muestras ambientales de fertilizantes orgánicos que contienen partes de la planta de ricino, obteniendo unos buenos resultados en cuanto a la efectividad y sensibilidad de la utilización de los cultivos celulares para la detección de ricina tanto en muestras alimentarias como ambientales.

Otro ejemplo de la utilización de ensayos *in vitro* con modelos celulares para la detección de ricina es el método publicado el pasado 2019 por Makdasi y colaboradores⁷⁷, en el cual se utilizó microscopía holográfica digital, una técnica de imagen no invasiva que da información morfológica de las células, por lo que permite monitorizar los cambios morfológicos producidos en las células por acción de la ricina en tiempo real. Los cambios observados en este estudio que son indicativos de la presencia de ricina son la disminución de la confluencia celular, debido a la apoptosis, y cambios en el área, el perímetro y la regularidad del contorno de las células. Con este método es posible detectar cambios morfológicos en fases tempranas de la intoxicación por ricina, lo que permite la detección rápida y sensible de la ricina activa. El límite de detección obtenido en este método fue de 0.3 ng/ml.

Por último, en el ámbito de los bioensayos cabe mencionar que a lo largo de la historia han sido ampliamente utilizados en la detección de la ricina los ensayos de

toxicidad en animales de experimentación, una práctica que ha caído en desuso debido a sus limitaciones éticas y prácticas, ya que implican el sufrimiento innecesario de los animales y requieren una gran cantidad de tiempo, recursos y personal debidamente formado y capacitado⁷⁵⁻⁷⁷.

4.3.3. Biosensores

Los biosensores constituyen un subgrupo dentro de los sensores químicos y su función es la detección y/o cuantificación de una sustancia o parámetro. Se caracterizan por poseer un agente biológico que actúa como agente de reconocimiento del analito de interés. Actualmente, hay una gran variedad de biosensores que detectan y/o cuantifican muchas sustancias o variables distintas, como las tiras de glucosa, que permiten la cuantificación rápida y sencilla de la concentración de glucosa en sangre⁷⁸, o los chips para la detección de plaguicidas en alimentos⁷⁹, por ejemplo.

La estructura de los biosensores se divide en dos partes principales: un detector formado por un elemento de biorreconocimiento, que será el que entre en contacto con el analito de interés; y un transductor de la señal, que es el componente que transforma la señal del detector en una señal analítica, normalmente eléctrica, que nos proporciona la información sobre la presencia o no del analito y/o su concentración. La gran especificidad de los biosensores viene dada por el elemento de biorreconocimiento que, además, puede iniciar reacciones y procesos químicos y físicos que son detectables por el transductor⁸⁰.

Existen muchos tipos de biosensores, clasificados según el tipo de transductor que incorporan, que puede ser óptico, electroquímico, termométrico, nanomecánico o piezoeléctrico; el método de detección, directo o indirecto; el elemento de reconocimiento del detector, que puede ser una enzima, por ejemplo; y el tipo de interacción que se da entre el detector y el analito, donde encontramos interacciones de bioafinidad, amperométricas (como las tiras de glucosa, en las que se mide el cambio de potencial provocado por la acción de la glucosa oxidasa) o biocatalíticos⁸⁰.

Este tipo de instrumentos se caracterizan por tener una alta sensibilidad y selectividad, tiempo de análisis corto o, incluso, en tiempo real, y relativo bajo coste de producción, transporte, uso y mantenimiento, sin necesidad de pretratamiento de la

muestra, lo que abarata y acorta el proceso de detección. Además, la mayoría de los biosensores que se desarrollan hoy en día suelen ser de pequeño tamaño y portátiles, cosa que facilita en gran medida su uso fuera del laboratorio, permitiendo la rápida detección *in situ*⁸¹.

En cuanto a los inmunosensores para la detección de ricina, actualmente hay varios disponibles en el mercado, entre los cuales podemos encontrar los siguientes ejemplos:

-Raptor: Fabricado por la empresa Research International (Monroe, WA, USA). Se trata de un inmunoensayo fluorométrico automático de tipo sandwich, que consiste en la utilización de anticuerpos anti-ricina inmovilizados en una superficie de fibra óptica, a la que se añade la muestra y una solución de anticuerpos marcados con fluoróforos. La fibra óptica excita el fluoróforo cuando se forma el complejo constituido por los dos anticuerpos (el inmovilizado y el marcado) y la ricina y se detecta la fluorescencia producida mediante una guía de ondas ópticas, permitiendo la cuantificación de la ricina a partir de la señal fluorescente producida. El límite de detección para la ricina está en unos 10 ng/ml y el tiempo de ensayo es de 15 minutos aproximadamente^{82,83}.

-Biosensor 220R: De la empresa MSA (Pittsburgh, PA, USA). Consiste en un ensayo inmunofluorescente basado en separación magnética. Este inmunosensor utiliza microesferas magnéticas recubiertas de anticuerpos anti-ricina y una solución de anticuerpos marcados con fluoróforo. De forma similar al caso anterior, cuando se aplica una muestra que contiene ricina, se forman complejos entre los dos tipos de anticuerpo y la ricina, que pasan a través de una célula magnética que mide su fluorescencia. Su sensibilidad permite detectar y cuantificar cantidades de ricina menores a 1 ng en unos 5 minutos de ensayo⁸⁴.

-BADD y Pro Strips-Rapid Screening System: De Advent Biotechnologies (París, Francia). Se trata de un ensayo de flujo lateral, de los cuales se ha hablado más detalladamente en el punto 4.1.2. La única diferencia entre estos dos biosensores es que BADD detecta un solo agente a la vez, mientras que Pro Strips-Rapid Screening System puede detectar hasta cinco agentes tóxicos simultáneamente. El límite de detección obtenido para estos biosensores es de 5 ng/ml y el tiempo de ensayo es de 3 minutos⁸⁵.

-BioDetec, RAID5, RAID 8 y RAID 10: Fabricados por Alexter Technologies.

Estos biosensores también se basan en un ensayo de flujo lateral y son prácticamente iguales a los del caso anterior, pero con un tiempo de ensayo de 15 minutos y su límite de detección es de unos 6 ng/ml⁸⁵.

Más recientemente, en 2022, Bai y colaboradores⁸⁶ desarrollaron un chip microfluídico novedoso que consiste en una microestructura de silicio capaz de detectar y cuantificar ricina y abrina mediante un inmunoensayo de tipo sándwich similar a los mencionados anteriormente en este trabajo, pero con una sensibilidad mayor que estos, obteniendo un límite de detección de 10 pg/ml, y una alta especificidad frente a interferencias en matrices alimentarias, manteniendo este mismo límite de detección incluso en muestras de leche o zumo, cosa que lo convierte en un método muy sencillo y rápido de detección y cuantificación para el ámbito de la bioseguridad y el control de calidad alimentaria.

A pesar de todas las ventajas de los biosensores, no es probable que sustituyan por completo a los métodos analíticos tradicionales de laboratorio descritos en apartados anteriores, ya que éstos tienen mayor precisión y deben utilizarse para verificar los resultados de los biosensores, siempre que sea posible, para mayor seguridad. Por todo ello, los biosensores representan una alternativa a los métodos tradicionales menos costosa y más rápida y accesible, pero también menos fiable. No obstante, este es un ámbito en continuo crecimiento y constantemente se está investigando para la producción de biosensores más específicos, exactos, sensibles y económicos que los métodos de laboratorio estándar, con lo que este campo tiene un futuro muy prometedor en términos de tecnología para la detección de posibles contaminantes tóxicos.

5. Discusión y perspectivas de futuro

Debido a su alta toxicidad y relativamente fácil accesibilidad, la detección de la ricina es un tema de gran importancia en el campo de la bioseguridad y la defensa biológica. El uso y desarrollo de métodos específicos, fiables y rápidos es crucial para la identificación temprana y precisa de la ricina, para una respuesta rápida y eficaz frente a casos de intoxicaciones, contaminaciones o posibles ataques bioterroristas.

En este apartado, se analizarán y compararán los distintos métodos de detección y cuantificación descritos en el punto anterior, examinando sus ventajas y limitaciones, así como las aplicaciones de cada uno. Además, se expondrán los nuevos avances en cuanto a la detección y cuantificación de la ricina, analizando sus posibles aportaciones a este ámbito y las limitaciones a subsanar en un futuro.

Como se ha mencionado en el punto anterior, los métodos disponibles para la detección y cuantificación de ricina se pueden clasificar en diversas categorías. En el presente Trabajo de Fin de Máster, estos métodos se han dividido en tres grandes grupos: inmunológicos, espectroscópicos y nuevos avances, cada uno con sus propias ventajas y desafíos.

Los métodos de detección inmunológicos, basados en la utilización de anticuerpos específicos de la ricina para capturar, identificar y cuantificar la toxina, son técnicas con una gran especificidad, sensibilidad y selectividad para la detección de la ricina. Sin embargo, también presentan algunas limitaciones. Concretamente, en el presente trabajo, dentro de este tipo de métodos, se ha hablado de ELISA, LFIA e IPCR.

El ensayo ELISA es una de las técnicas inmunológicas más utilizadas en los laboratorios, debido a su alta sensibilidad y especificidad y su protocolo relativamente sencillo de seguir y de implementar en los laboratorios, pero los tiempos de incubación largos y la incapacidad de medir la bioactividad de la ricina, ya que no permite distinguir si está en su forma activa con actividad citotóxica o no, hacen que esta no sea una técnica eficaz en la detección rápida de contaminaciones en casos de bioterrorismo o de intoxicaciones por ricina en los que se necesite una actuación rápida.

El ensayo LFIA, por su parte, ofrece diversas ventajas, como la rapidez en la detección, la capacidad de realizar esta prueba *in situ* en el lugar de atención a la posible víctima de envenenamiento o en el lugar de una posible contaminación ambiental, por

ejemplo, sin necesidad de utilizar equipos especializados, la relativamente alta especificidad y sensibilidad, dependiendo del fabricante y de los anticuerpos utilizados, la facilidad de uso y su precio económico. Por otro lado, la principal limitación de este método de detección es la posibilidad de falsos positivos y falsos negativos, con lo que no es un método de detección muy exacto ni fiable. Por todo ello, el LFIA resulta muy útil como una primera aproximación en casos de sospecha de envenenamiento o contaminación por ricina, pero no como prueba confirmatoria.

En cuanto a la IPCR, su punto fuerte es la disminución del límite de detección respecto a las otras dos técnicas inmunológicas, llegando a detectar concentraciones del orden de fg/ml, debido a la amplificación de la ricina por PCR. Esta técnica es aplicable a la detección y cuantificación de ricina tanto en muestras biológicas como ambientales y alimentarias, con lo que, sumando esto a su gran sensibilidad, resulta de gran utilidad en el control de contaminaciones alimentarias y ambientales y en la detección forense de intoxicaciones por ricina. Debido a que incluye una primera etapa de ELISA y una segunda de amplificación por PCR, ambos procesos de una duración media de varias horas, el tiempo de ensayo es elevado comparado con otras técnicas más sencillas como el LFIA, con lo que no es una buena opción para la detección rápida de posibles amenazas bioterroristas ni para el diagnóstico clínico de intoxicaciones por ricina, pero sí para el control de calidad y bioseguridad de alimentos y entornos naturales o la detección a nivel forense de posibles muertes por envenenamiento intencionado o intoxicación accidental por ricina, entre otras aplicaciones.

En cuanto a las técnicas espectroscópicas descritas en este trabajo, la más utilizada para la detección y cuantificación de ricina es la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas que, como se demuestra en los diversos estudios citados en el apartado anterior, resulta muy útil en la detección de la adenina liberada del bucle SRL del ARNr 28S por acción de la cadena A de la ricina, permitiendo la detección de la presencia de esta toxina en su forma activa. Esta es la principal ventaja respecto a los métodos descritos anteriormente, como el ELISA o la IPCR, la posibilidad de detectar la ricina bioactiva, un aspecto clave en la detección de contaminaciones e intoxicaciones. Además, esta técnica también permite la detección directa de la ricina y, debido a la eficacia de la cromatografía de líquidos como método de separación, permite aislar la ricina de otras sustancias en muestras complejas alimentarias o de fluidos biológicos donde normalmente resulta más difícil de detectar,

por la alta complejidad matricial de estas muestras, que crea interferencias en el análisis, y la baja concentración a la que se suele encontrar la toxina en el organismo. Este es un aspecto crucial ya que el desarrollo de un método de detección rápido y eficaz en muestras biológicas fáciles de obtener como la sangre resulta vital para la mejora de la detección temprana en pacientes sospechosos de haber sufrido un envenenamiento o intoxicación por ricina y poder así aplicar el tratamiento adecuado. Por lo tanto, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas resulta de gran utilidad a la hora de detectar de forma sensible, rápida y precisa la ricina tanto en muestras alimentarias como ambientales y biológicas.

Por otra parte, encontramos también entre las técnicas espectroscópicas la espectrometría de masas MALDI-TOF, basada en la determinación de la masa de los iones formados a partir de la excitación de los átomos de la muestra mediante un láser para obtener información estructural, y la SPR, que analiza en tiempo real las interacciones de unión entre moléculas a partir de los cambios que se producen en la luz reflejada. Mientras que MALDI-TOF MS permite la detección y cuantificación de la ricina bioactiva mediante el análisis de la liberación de adenina y una detección estructural mediante la identificación de secuencias características de la ricina, cosa que le aporta a la técnica una gran especificidad y aplicabilidad, la SPR no tiene la capacidad de diferenciar entre la ricina activa y la no activa, ya que no se basa en la detección de adenina liberada, sino en la unión de la ricina a residuos de manosa y no en su actividad citotóxica. Por otra parte, el límite de detección de la SPR es mayor que el de la cromatografía de líquidos o la IPCR, con lo que su sensibilidad es menor que la de estas otras técnicas.

No obstante, todas estas técnicas espectroscópicas de las que se ha hablado requieren del uso de equipos especializados que normalmente tienen un alto coste económico o, alternativamente, se deben enviar las muestras a servicios técnicos o laboratorios externos para que realicen allí las pruebas de detección y cuantificación, con lo que se aumenta considerablemente el tiempo necesario para obtener los resultados.

Además de estos métodos convencionales, también se están explorando enfoques emergentes en la detección y cuantificación de la ricina, como la secuenciación directa de ARN utilizando un secuenciador ONT y el uso de modelos



celulares y biosensores. Estas prometedoras metodologías podrían permitir una detección y cuantificación más rápida, sensible y portátil de la ricina en diversos entornos, incluidos los puntos de control fronterizos, los sistemas de vigilancia y los dispositivos de campo, aunque de momento aún presentan limitaciones en cuanto a precisión y aplicabilidad al análisis de muestras complejas como por ejemplo alimentos, donde la presencia de interferencias dificulta la detección precisa de la ricina.

En conclusión, la detección y cuantificación de la ricina sigue siendo un área de investigación activa y en constante evolución. Los métodos convencionales inmunológicos y espectroscópicos han demostrado ser eficaces en la detección de esta toxina, cada uno con sus propias ventajas y limitaciones. El desarrollo de nuevas tecnologías podría mejorar aún más la capacidad de detección y cuantificación de la ricina, contribuyendo así a la protección de la salud pública y la seguridad, de forma que se necesitan investigaciones adicionales para abordar los desafíos existentes y desarrollar métodos de detección confiables y efectivos en todo tipo de entornos y en tiempos lo suficientemente cortos como para permitir una actuación rápida y eficaz del personal pertinente frente a las distintas situaciones.

6. Conclusiones

El presente Trabajo de Fin de Máster proporciona una revisión bibliográfica exhaustiva sobre los métodos utilizados actualmente para la detección y cuantificación de la ricina, una proteína de origen natural altamente tóxica con un gran potencial como arma bioterrorista, en el contexto de la química forense. Se han recopilado y analizado diversos estudios científicos para comprender el estado actual de los métodos de detección y cuantificación de esta toxina y sus perspectivas de futuro.

Las conclusiones derivadas de esta investigación bibliográfica son las siguientes:

1. La detección rápida de la ricina es crucial para la implementación temprana de las medidas adecuadas para responder a cada situación, ya sea una amenaza bioterrorista o una intoxicación por ricina.
2. Los métodos de detección tradicionales han demostrado ser efectivos para la detección y cuantificación de ricina, pero presentan limitaciones como el tiempo de ensayo excesivamente largo o la difícil aplicabilidad en ciertas situaciones o tipos de muestras.
3. En los últimos años, la investigación en el campo de la detección y cuantificación de la ricina ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías y enfoques para detectar esta toxina de forma más sensible, selectiva y rápida.
4. A pesar de las nuevas tecnologías y los avances en cuanto a los métodos de detección y cuantificación de la ricina, todavía existen desafíos y limitaciones a abordar, abriendo nuevas líneas de investigación para el futuro, como la mejora de la sensibilidad, selectividad y aplicabilidad de las técnicas existentes y la reducción del tiempo de análisis, para una detección y cuantificación aún más rápida y precisa.
5. La investigación y el desarrollo de nuevos métodos de detección y cuantificación de ricina mejorados es crucial para afrontar los desafíos y limitaciones de los métodos actuales.
6. El desarrollo e implementación de métodos con tecnologías portátiles permitirá la detección y cuantificación rápida de la ricina en situaciones



de emergencia como posibles intoxicaciones o contaminaciones de aguas o alimentos de consumo humano.

En conclusión, de la revisión bibliográfica sobre los métodos de detección y cuantificación de la ricina realizada en este trabajo, se puede inferir que, aunque en las últimas décadas se han realizado avances de gran relevancia en este campo, se necesita continuar investigando para el desarrollo de nuevos métodos y la mejora de los existentes para conseguir una detección y cuantificación más sensible, selectiva y eficiente de la ricina en todo tipo de situaciones y entornos.



7. Abreviaturas

- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.
- ARNr:** Ácido Ribonucleico ribosómico.
- COPI/COPII:** *Coat Complex Protein I/II*, Proteína coatómera I/II.
- ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
- IPCR:** *Immuno-Polimerase Chain Reaction*, Inmuno-reacción en cadena de la polimerasa.
- KCs:** *Kupffer Cells*, Células de Kupffer.
- LC-MS:** *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.
- LFIA:** *Lateral Flow Immunoassay*, Inmunoensayo de flujo lateral.
- LSECs:** *Liver Sinusoidal Epithelial Cells*, Células endoteliales sinusoidales hepáticas.
- MALDI:** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, Desorción/ionización láser asistida por matriz.
- MALDI-TOF/MS:** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo/espectrometría de masas.
- MS:** *Mass Spectrometry*, Espectrometría de masas.
- ONT:** Oxford Nanopore Technologies.
- PCR:** *Polimerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa.
- RE:** Retículo Endoplasmático.
- RIPs:** *Ribosomes Inactivating Proteins*, Proteínas inactivadoras de ribosomas.
- ROS:** *Reactive Oxygen Species*, Especies reactivas de oxígeno.
- RTA:** *Ricin Toxin A chain*, Cadena A de la toxina ricina.
- RTB:** *Ricin Toxin B chain*, Cadena B de la toxina ricina.



- SCX:** *Strong Cationic Exchange*, Intercambio Catiónico Fuerte.
- SERS-LFIA:** *Surface-Enhanced Raman Scattering-Lateral Flow Immunoassay*, Espectroscopía Raman mejorada en superficie-inmunoensayo de flujo lateral.
- SPR:** *Surface Plasmon Resonance*, Resonancia de plasmones superficiales.
- SRL:** *Sarcin-Ricin Loop*, Bucle sarcina-ricina.



8. Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento a mi tutor, el Dr. José Antonio Reina Lozano, por su ayuda y buenos consejos en el desarrollo de este Trabajo de Fin de Máster.

También quiero agradecerle su ayuda en cuanto a la revisión y mejora de este trabajo a la Dra. Sonia Fernández Veledo, investigadora principal del grupo DIAMET, del cual formo parte como técnico de soporte a la investigación.

Por último, un agradecimiento especial a mi familia, que siempre me ha ayudado y apoyado.



9. Bibliografía

1. Kole, C. & Rabinowicz, P. *Compendium of Plant Genomes The Castor Bean Genome*. (Springer, 2018).
2. Pita R, Anadón A & Martínez-Larrañaga MR. Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. *Revista de Toxicología* **21**, 51–63 (2004).
3. Franke, H., Scholl, R. & Aigner, A. 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-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* vol. 392 1181–1208 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01691-6> (2019).
4. Stillmark, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen: Inaugural-Dissertation. (University of Dorpat, 1888).
5. Sowa-Rogozińska, N., Sominka, H., Nowakowska-Gołacka, J., Sandvig, K. & Słomińska-Wojewódzka, M. Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin. *Toxins* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins11060350> (2019).
6. Boyd, W. C. & Shapleigh, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* **119**, 419 (1954).
7. Watkins, W. M. & Morgan, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature* **169**, 825–826 (1952).
8. Polito, L., Bortolotti, M., Battelli, M. G., Calafato, G. & Bolognesi, A. Ricin: An ancient story for a timeless plant toxin. *Toxins* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins11060324> (2019).
9. Jaramillo Antillón, J. *Hipócrates: enseñanzas y legados en la medicina moderna-1*. (2022).
10. Dioscórides, P., López Eire, A., Cortés Gabaudan, F., Gutiérrez Rodilla, B. M. & Vázquez de Benito, M. de la C. *Sobre los remedios medicinales*. (Ediciones Universidad de Salamanca, 2006).
11. Scarpa, A. & Guerci, A. *VARIOUS USES OF THE CASTOR OIL PLANT (RICINUS COMMUNIS L.) A REVIEW**. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 5 (1982).
12. Ziaei, A., Sahranavard, S., Gharagozlou, M. J. & Faizi, M. Preliminary investigation of the effects of topical mixture of Lawsonia inermis L. and Ricinus communis L. leaves extract in treatment of osteoarthritis using MIA model in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **24**, (2016).
13. Bibi, S., Sultana, J., Sultana, H. & Malik, R. N. Ethnobotanical uses of medicinal plants in the highlands of Soan Valley, Salt Range, Pakistan. *J Ethnopharmacol* **155**, 352–361 (2014).



14. Olsnes, S. & Pihl, A. *Different Biological Properties of the Two Constituent Peptide Chains of Ricin, a Toxic Protein Inhibiting Protein Synthesis*. *Biochem. Biophys. Res. Lia.* 5 vol. 10 (1968).
15. Lord, M. J. *et al.* *Ricin Mechanisms of Cytotoxicity*. *Toxicol Rev* vol. 22 (2003).
16. Sturm, M. B. & Schramm, V. L. Detecting ricin: Sensitive luminescent assay for ricin A-chain ribosome depurination kinetics. *Anal Chem* **81**, 2847–2853 (2009).
17. Despeyroux, D. *et al.* Characterization of Ricin Heterogeneity by Electrospray Mass Spectrometry, Capillary Electrophoresis, and Resonant Mirror. *Anal Biochem* **279**, 23–36 (2000).
18. Endo, Y. & Tsurugi, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8128–8130 (1987).
19. Sandvig, K. & van Deurs, B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* **76**, 949–966 (1996).
20. Ray, B. & Wu, H. C. Internalization of Ricin in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol Cell Biol* **1**, 544–551 (1981).
21. Sandvig, K., Kavaliauskiene, S. & Skotland, T. The protein toxins ricin and shiga toxin as tools to explore cellular mechanisms of internalization and intracellular transport. *Toxins* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins13060377> (2021).
22. Sowa-Rogozińska, N., Sominka, H., Nowakowska-Gołacka, J., Sandvig, K. & Słomińska-Wojewódzka, M. Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin. *Toxins* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins11060350> (2019).
23. Magnusson, S., Kjekshus, R. & Berg, T. Characterization of Two Distinct Pathways of Endocytosis of Ricin by Rat Liver Endothelial Cells. *Exp Cell Res* **205**, 118–125 (1993).
24. Van Deurs, B. *et al.* Estimation of the Amount of Internalized Ricin That Reaches the trans-Gol Network. *J Cell Biol* **106**, 253–267 (1988).
25. Day, P. J. *et al.* An Interaction between Ricin and Calreticulin That May Have Implications for Toxin Trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7202–7208 (2001).
26. Spooner, R. A., Smith, D. C., Easton, A. J., Roberts, L. M. & Lord, M. J. Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Viral J* **3**, 26 (2006).
27. Otte, S. *et al.* Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex. *Journal of Cell Biology* **152**, 503–518 (2001).
28. Olsnes, S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* vol. 44 361–370 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.003> (2004).



29. Grela, P., Szajwaj, M., Horbowicz-Drozdal, P. & Tchórzewski, M. How ricin damages the ribosome. *Toxins* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins11050241> (2019).
30. Shi, X., Khade, P. K., Sanbonmatsu, K. Y. & Joseph, S. Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23s rRNA in the elongation cycle of protein synthesis. *J Mol Biol* **419**, 125–138 (2012).
31. Vallejo, P. J. Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopía electrónica Ésta obra está bajo una Licencia Atribución-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported. (Universidad del País Vasco, 2010).
32. HASEGAWA, N., KIMURA, Y., ODA, T., KOMATSU, N. & MURAMATSU, T. Isolated Ricin B-Chain-mediated Apoptosis in U937 Cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 1422–1429 (2000).
33. Horrix, C., Raviv, Z., Flescher, E., Voss, C. & Berger, M. R. Plant ribosome-inactivating proteins type II induce the unfolded protein response in human cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 1269–1281 (2011).
34. Higuchi, S., Tamura, T. & Oda, T. Cross-Talk between the Pathways Leading to the Induction of Apoptosis and the Secretion of Tumor Necrosis Factor- in Ricin-Treated RAW 264.7 Cells. *J Biochem* **134**, 927–933 (2003).
35. Brigotti, M. *et al.* Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *The FASEB Journal* **16**, 365–372 (2002).
36. Li, X.-P., Baricevic, M., Saidasan, H. & Tumer, N. E. Ribosome Depurination Is Not Sufficient for Ricin-Mediated Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect Immun* **75**, 417–428 (2007).
37. Bradberry, S. M., Dickers, K. J., Rice, P., Griffiths, G. D. & Allister Vale, J. *Ricin Poisoning. Toxicol Rev* vol. 22 (2003).
38. Kumar, O., Sugendran, K. & Vijayaraghavan, R. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. *Toxicon* **41**, 333–338 (2003).
39. Poisson, J. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol* **66**, 212–227 (2017).
40. Mooney, B., Torres-Velez, F. J., Doering, J., Ehrbar, D. J. & Mantis, N. J. Sensitivity of Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells to ricin toxin and ricin toxin–Ab complexes. *J Leukoc Biol* **106**, 1161–1176 (2019).
41. Magnusson, S., Berg, T., Turpin, E. & Frénoy, J. P. Interactions of ricin with sinusoidal endothelial rat liver cells. Different involvement of two distinct carbohydrate-specific mechanisms in surface binding and internalization. *Biochemical Journal* **277**, 855–861 (1991).
42. Johnston, D. E. & Jasuja, R. Purification of cultured primary rat hepatocytes using selection with ricin A subunit. *Hepatology* **20**, 436–44 (1994).



43. Zenilman, M. E., Fiani, M., Stahl, P. D., Brunt, E. M. & Flye, M. W. Selective depletion of Kupffer cells in mice by intact ricin. *Transplantation* **47**, 200–202 (1989).
44. Zenilman, M. E., Fiani, M., Stahl, P., Brunt, E. & Flye, M. W. Use of ricin a-chain to selectively deplete Kupffer cells. *Journal of Surgical Research* **45**, 82–89 (1988).
45. Roche, J. K. *et al.* Post-exposure targeting of specific epitopes on ricin toxin abrogates toxin-induced hypoglycemia, hepatic injury, and lethality in a mouse model. *Laboratory Investigation* **88**, 1178–1191 (2008).
46. Janik, E., Ceremuga, M., Bijak, J. S. & Bijak, M. Biological toxins as the potential tools for bioterrorism. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
47. von Bruchhausen, F. *et al.* Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. in *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis* 591–1166 (Springer Berlin Heidelberg, 1993). doi:10.1007/978-3-642-57995-0_3.
48. Muñoz, P. *et al.* Protocolo para la identificación rápida y sensible de ricina en muestras ambientales ante una alerta biológica. *Sanid. mil* **73**, (2017).
49. Tabatabaei, M. S. & Ahmed, M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). in 115–134 (2022). doi:10.1007/978-1-0716-2376-3_10.
50. Diclorhidrato de o-fenilendiamina, + 98 %, Thermo Scientific Chemicals. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/J60354.22>.
51. Shyu, R.-H., Shyu, H.-F., Liu, H.-W. & Tang, S.-S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon* **40**, 255–258 (2002).
52. Narang, U., Anderson, G. P., Ligler, F. S. & Burans, J. Fiber optic-based biosensor for ricin. *Biosens Bioelectron* **12**, 937–945 (1997).
53. Rasetti-Escargueil, C. & Avril, A. Medical Countermeasures against Ricin Intoxication. *Toxins* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins15020100> (2023).
54. Garber, E. A. E. & O'Brien, T. W. Detection of Ricin in Food Using Electrochemiluminescence-Based Technology. *J AOAC Int* **91**, 376–382 (2008).
55. Simon, S. *et al.* Recommended Immunological Assays to Screen for Ricin-Containing Samples. *Toxins (Basel)* **7**, 4967–4986 (2015).
56. Koczula, K. M. & Gallotta, A. Lateral flow assays. *Essays Biochem* **60**, 111–120 (2016).
57. Bartholomew, R. A. *et al.* Evaluation of Immunoassays and General Biological Indicator Tests for Field Screening of *Bacillus anthracis* and Ricin. *Health Secur* **15**, 81–96 (2017).
58. Turner, K. *et al.* Pairing Alpaca and Llama-Derived Single Domain Antibodies to Enhance Immunoassays for Ricin. *Antibodies* **6**, 3 (2017).
59. Jia, X. *et al.* Highly sensitive detection of three protein toxins via SERS-lateral flow immunoassay based on SiO₂@Au nanoparticles. *Nanomedicine* **41**, 102522 (2022).



60. Ryazantsev, D. Y., Voronina, D. V. & Zavriev, S. K. Immuno-PCR: achievements and perspectives. *Biochemistry (Moscow)* **81**, 1754–1770 (2016).
61. Lubelli, C. *et al.* Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay. *Anal Biochem* **355**, 102–109 (2006).
62. HE, X., McMAHON, S., McKEON, T. A. & BRANDON, D. L. Development of a Novel Immuno-PCR Assay for Detection of Ricin in Ground Beef, Liquid Chicken Egg, and Milk. *J Food Prot* **73**, 695–700 (2010).
63. He, X., McMahon, S., Henderson, T. D., Griffey, S. M. & Cheng, L. W. Ricin Toxicokinetics and Its Sensitive Detection in Mouse Sera or Feces Using Immuno-PCR. *PLoS One* **5**, e12858 (2010).
64. Becher, F., Duriez, E., Volland, H., Tabet, J. C. & Ezan, E. Detection of functional ricin by immunoaffinity and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **79**, 659–665 (2007).
65. Yang, Z. *et al.* SCX-tip-aided LC-MS detection of active ricin *via* oligonucleotide substrates for depurination kinetics. *Analyst* (2023) doi:10.1039/D3AN00217A.
66. Liang, L. H. *et al.* Quantitative detection of ricin in beverages using trypsin/Glu-C tandem digestion coupled with ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **413**, 585–597 (2021).
67. Feldberg, L., Elhanany, E., Laskar, O. & Schuster, O. Rapid, Sensitive and Reliable Ricin Identification in Serum Samples Using LC–MS/MS. *Toxins (Basel)* **13**, (2021).
68. Masana González, I. Espectrómetros de masa basados en tiempo de vuelo. in *Manual de Proteómica* (eds. Corrales, F. & Calvete, J. J.) 203–288 (Sociedad Española de Proteómica, 2014).
69. Gelpí, E. Métodos y mecanismos de ionización. in *Manual de Proteómica* (eds. Corrales, F. & Calvete, J. J.) 127–172 (Sociedad Española de Proteómica, 2014).
70. Hoyt, K., Barr, J. R. & Kalb, S. R. Detection of ricin activity and structure by using novel galactose-terminated magnetic bead extraction coupled with mass spectrometric detection. *Anal Biochem* **631**, 114364 (2021).
71. Nagatsuka, T. *et al.* Localized Surface Plasmon Resonance Detection of Biological Toxins Using Cell Surface Oligosaccharides on Glyco Chips. *ACS Appl Mater Interfaces* **5**, 4173–4180 (2013).
72. Anderson, G. P. *et al.* Single domain antibody–quantum dot conjugates for ricin detection by both fluoroimmunoassay and surface plasmon resonance. *Anal Chim Acta* **786**, 132–138 (2013).
73. Ryan, Y. *et al.* RIPpore: A Novel Host-Derived Method for the Identification of Ricin Intoxication through Oxford Nanopore Direct RNA Sequencing. *Toxins (Basel)* **14**, 470 (2022).
74. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. & Au, K. F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology* vol. 39 1348–1365 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x> (2021).



75. Pauly, D. *et al.* Real-Time Cytotoxicity Assay for Rapid and Sensitive Detection of Ricin from Complex Matrices. *PLoS One* **7**, e35360 (2012).
76. Fernández Freire, P. Aplicación de un modelo celular para la evaluación de la citotoxicidad de compuestos químicos. (Universidad Autónoma de Madrid, 2008).
77. Makdasi, E. *et al.* Whole-Cell Multiparameter Assay for Ricin and Abrin Activity-Based Digital Holographic Microscopy. *Toxins (Basel)* **11**, 174 (2019).
78. Rahman, Md. M., Ahammad, A. J. S., Jin, J.-H., Ahn, S. J. & Lee, J.-J. A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. *Sensors* **10**, 4855–4886 (2010).
79. Nagatani, N. *et al.* Rapid and sensitive visual detection of residual pesticides in food using acetylcholinesterase-based disposable membrane chips. *Food Control* **18**, 914–920 (2007).
80. Pohanka, M. Immunosensors for Assay of Toxic Biological Warfare Agents. *Biosensors (Basel)* **13**, 402 (2023).
81. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem* **60**, 1–8 (2016).
82. Narang, U., Anderson, G. P., Ligler, F. S. & Burans, J. Fiber optic-based biosensor for ricin. *Biosens Bioelectron* **12**, 937–945 (1997).
83. Anderson, G. P., Rowe-Taitt, C. A. & Ligler, F. S. *RAPTOR: A PORTABLE, AUTOMATED BIOSENSOR*. (2000).
84. Pohanka, M. Current Trends in the Biosensors for Biological Warfare Agents Assay. *Materials* **12**, 2303 (2019).
85. Slotved, H.-C., Sparding, N., Tanassi, J. T., Steenhard, N. R. & Heegaard, N. H. H. Evaluating 6 Ricin Field Detection Assays. *Biosecur Bioterror* **12**, 186–189 (2014).
86. Bai, X. *et al.* A Self-Driven Microfluidic Chip for Ricin and Abrin Detection. *Sensors* **22**, 3461 (2022).

10. Anexo

Tabla 1 Tabla resumen de los métodos de detección y cuantificación de ricina descritos en el apartado 4. De izquierda a derecha, se muestra el nombre de cada método, el tipo de ensayo del que se trata, el límite de detección obtenido para la ricina, si tiene o no la capacidad de detectar la bioactividad de esta toxina y sus ventajas y limitaciones en cuanto a la detección y cuantificación de la ricina. Fuente: Elaboración propia.

Método	Tipo de ensayo	Límite de detección	Detección de la bioactividad	Ventajas	Limitaciones
ELISA tipo sándwich	Inmunoensayos	0.2-14 ng/ml ⁵³⁻⁵⁵	No	-Gran sensibilidad y especificidad -Protocolo sencillo	-Tiempo de ensayo prolongado
LFIA		Gran variabilidad según el fabricante	No	-Detección rápida -Portabilidad -Equipos especializados no necesarios -Precio económico -Facilidad de uso	-Posibilidad de falsos positivos y negativos
IPCR		10 fg/ml-10 pg/ml ⁶¹⁻⁶³	No	-Gran sensibilidad y especificidad -Aplicable a todo tipo de muestras	-Tiempo de ensayo prolongado
SERS-LFIA	Inmunoensayo + técnica espectroscópica	0.1 ng/ml ⁵⁹	No	-Gran sensibilidad y especificidad	-Necesidad de equipos especializados y de alto coste económico o dependencia de laboratorios externos
LC-MS	Técnicas espectroscópicas	1-5 ng/ml ⁶⁴⁻⁶⁷	Sí	-Gran sensibilidad y especificidad	
MALDI-TOF/MS		8 ng/ml ^{69,70}	Sí	-Detección rápida	-Necesidad de equipos especializados y de alto coste económico o dependencia de laboratorios externos
SPR		30 ng/ml ⁷¹	No	-Detección rápida	



					-Menor sensibilidad
Secuenciación directa de ARN	Secuenciación ONT	0.9 ng/ml ⁷³	Sí	-Gran especificidad -Detección rápida -Portabilidad	-Alta tasa de error -Falta de ensayos a concentraciones letales de ricina
Ensayos en cultivos celulares	Bioensayo	0.3-200 ng-ml ^{75,77}	Sí	-Protocolo sencillo	-Tiempo de ensayo prolongado -Necesidad de equipos especializados
Biosensores	Sensores químicos	10 pg/ml-10 ng/ml ⁸²⁻⁸⁶	No	-Detección rápida -Portabilidad -Protocolo sencillo -Coste económico menor	-Menor precisión y fiabilidad -Necesidad de comprobar los resultados mediante pruebas confirmatorias

