

## APLICACIONES DE LA C-FICOCIANINA: MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Javier Marín-Prida<sup>1</sup>, Alexey Llópiz-Arzuaga<sup>2</sup>, Nancy Pavón<sup>3</sup>, Giselle Pentón-Rol<sup>2</sup>, Gilberto L. Pardo-Andreu<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB), Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de la Habana. Calle 222 No. 2317 entre 23 y 31, La Coronela, La Lisa, La Habana, CUBA. CP 13600.

<sup>2</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. CP 10600.

<sup>3</sup> Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). Ave. 25 e/ 158 y 160, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. CP 11300.

### **Autor de correspondencia:**

Javier Marín-Prida: (537) 271-8534, email: [javier.marin@ifal.uh.cu](mailto:javier.marin@ifal.uh.cu)

### **Resumen**

La C-Ficocianina (C-FC), principal biliproteína de la cianobacteria *Spirulina platensis*, posee múltiples propiedades farmacológicas. Su proceso de purificación puede estar influido por factores relacionados con el crecimiento de la cianobacteria, tales como la intensidad luminosa y la agitación, la forma de suministrar los nutrientes y su concentración, el pH y la temperatura. La combinación de métodos con diferentes principios de separación, tales como las cromatografías de intercambio iónico, por filtración en gel y la precipitación con sulfato de amonio, ha permitido obtener la C-FC con grados de pureza adecuados para aplicaciones biofarmacéuticas. Entre las propiedades antioxidantes descritas para esta proteína se encuentran su potente capacidad secuestradora de radicales alcoxilos, hidroxilos y peroxilos, además de reaccionar con el peroxinitrito. La C-FC es un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2. En varios modelos experimentales, la C-FC ha mostrado efectos antiinflamatorios y ha reducido el daño en el tejido inflamado. Entre sus acciones se encuentran la disminución de los niveles de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, la inhibición de la actividad de la mieloperoxidasa y de la activación del factor NF- $\kappa$ B. La C-FC ha mostrado efectos citoprotectores en modelos de daño isquémico cerebral y cardíaco, y de daño tisular inducido por tóxicos, tales como lesiones hepáticas, vasculares, renales, pancreáticas, oculares o frente a la hipertensión asociada al síndrome metabólico. Esta proteína también ejerce efectos cicatrizantes en heridas de la piel. Se han descrito, además, acciones antitumorales de la C-FC en diversas líneas celulares y modelos animales de cáncer colorectal, epidérmico, de leucemia mieloide y de hepatocarcinoma. Estas evidencias

sugieren que la C-FC podría constituir una promisorio alternativa terapéutica en el tratamiento de diferentes enfermedades humanas.

**Palabras clave:** C-Ficocianina, purificación, antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral

## APPLICATIONS OF C-PHYCOCYANIN: METHODS OF PURIFICATION AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

### Abstract

C-Phycocyanin (C-PC), the main biliprotein of the cyanobacteria *Spirulina platensis*, has a variety of pharmacological properties. Its purification process may depend, among other factors, of the parameters of cyanobacteria cultivation, such as light intensity, agitation, the method for nutrients supply as well as their concentration in the medium, the pH and the temperature. The extraction of C-PC with optimal purity ratios for biopharmaceutical applications have been achieved through the combination of methods with different separation principles, such as the ion-exchange chromatography, the gel filtration chromatography and the precipitation with ammonium sulfate. It has been reported scavenger abilities of this protein for the alkoxyl, hydroxyl and peroxy radicals, and its capacity to react with peroxynitrite. C-PC is a selective inhibitor of cyclooxygenase-2. This biliprotein has showed anti-inflammatory actions and has reduced the injury to the inflamed tissues in several experimental models. It has been described that C-PC decreases the levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines, inhibits the activity of myeloperoxidase and the activation of the factor NF- $\kappa$ B. C-PC has exerted cytoprotective effects in models of brain and heart ischemic damages, and in tissue injuries induced by toxic compounds, such as in hepatic, vascular, renal, pancreatic and ocular lesions, and against hypertension associated to metabolic syndrome. This biliprotein also exerts healing actions in skin wounds, and anti-tumoral effects in several cell lines and animal models of colon, skin, myeloid leukemia and hepatocellular carcinomas. These evidences suggest that C-PC may constitute a promising therapeutic option for the treatment of different human diseases.

**Keywords:** C-Phycocyanin, purification, antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumoral

### Introducción

La C-Ficocianina (C-FC) pertenece a un grupo de polipéptidos denominados ficobiliproteínas que se encuentran naturalmente en las cianobacterias y en las algas de los géneros *Rhodophyta* y *Cryptophyta*<sup>1</sup>. Debido a sus propiedades colorantes y fluorescentes, las ficobiliproteínas se han aplicado en las industrias alimentaria, cosmética y biotecnológica<sup>2</sup>.

Entre las fuentes naturales más comúnmente utilizadas para la extracción de la C-FC se encuentra la cianobacteria *Spirulina platensis*, la cual es utilizada como un suplemento dietético en Cuba y otros países por sus valores nutricionales y citoprotectores<sup>3</sup>. Las evidencias

acumuladas hasta el presente indican, además, que tanto la espirulina, extracto que se obtiene a partir de la biomasa de la cianobacteria y se comercializa bajo distintas marcas comerciales, como la C-FC obtenida a distintos grados de pureza, poseen una variedad de aplicaciones farmacológicas.

En el este trabajo se presenta una breve revisión de los métodos de obtención de la C-FC y sus principales propiedades farmacológicas identificadas en estudios preclínicos.

#### Estructura de la C-FC

La C-FC forma parte del ficobilisoma, un complejo proteínico macromolecular cuya función es utilizar la energía solar para el aparato fotosintético de las cianobacterias<sup>4</sup>. Las clases más comunes de ficobiliproteínas son: Alo-Ficocianina, C-FC y Ficoeritrina. Todas están formadas por dos cadenas polipeptídicas, una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , con pesos entre 17-20 kDa, unidas mediante interacciones no covalentes. Contienen grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales (grupo cromóforo o bilin) que difieren en cuanto a la disposición de sus dobles enlaces. Estos grupos bilin están unidos mediante enlaces tioéter a residuos específicos de cisteína de las cadenas polipeptídicas<sup>5</sup>. En la C-FC el grupo bilin se denomina Ficocianobilina (FCB), y contiene tres en su estructura, uno de ellos unido a la cisteína 84 de la cadena  $\alpha$  y los otros dos a las cisteínas 84 y 155 de la cadena  $\beta$ , respectivamente<sup>6</sup>. En bases de datos de proteínas (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) se encuentran disponibles por internet varias estructuras tridimensionales de la C-FC extraídas de distintas fuentes.

#### *Spirulina platensis* como fuente natural de la C-FC

La *Spirulina platensis* es una bacteria fotoautotrófica localizada en medios acuosos salinos. Su producción industrial tiene las siguientes ventajas sobre otros sistemas: (1) riesgo limitado de contaminación debido a los componentes de los medios de cultivo empleados (altas concentraciones salinas y elevado pH); (2) baja cantidad de ácidos nucleicos; (3) presencia de componentes de gran interés: vitamina A, clorofila, esteroides, ácidos grasos poliinsaturados<sup>7</sup>; (4) no es tóxica<sup>8</sup>; (5) las células crecen a una velocidad elevada y (6) la biomasa puede ser extraída con relativa facilidad<sup>9</sup>.

El crecimiento de las células de *Spirulina platensis* puede estar influenciado por varios factores, entre los que se encuentran: la intensidad luminosa y la agitación<sup>10</sup>, la forma de suministro de los nutrientes y su concentración<sup>11</sup>, el pH y la temperatura<sup>12</sup>, así como la edad y la concentración del inóculo<sup>13</sup>.

Las ficobiliproteínas son moléculas coloreadas, por lo que sus máximos de absorción se encuentran en la región visible del espectro. El proceso de purificación de la C-FC es monitoreado por las absorbancias a 280, 620 y 650 nm. La absorbancia a 280 nm constituye una medida de las proteínas totales presentes en la preparación, mientras que los máximos de absorbancias para la C-FC y la Alo-Ficocianina se encuentran a 620 y a 650 nm, respectivamente. La relación de absorbancia  $A_{620}/A_{280}$  indica la cantidad de C-FC respecto a las proteínas totales presentes en la mezcla. Cuando esta relación es mayor que cuatro se considera que la preparación de la proteína es de grado analítico (alta pureza)<sup>14</sup>. El factor de separación, medido como la relación de absorbancia  $A_{620}/A_{650}$ , es una medida de la cantidad de C-FC respecto a la Alo-Ficocianina<sup>15</sup>. Alternativamente se puede realizar la cuantificación de estas ficobiliproteínas teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar a determinadas longitudes de ondas.

Debido al efecto perjudicial del calor en la integridad de la C-FC, el procedimiento más adecuado para la purificación de esta proteína implica el uso de la biomasa fresca como material de partida<sup>16</sup>. Para la ruptura de las células de *Spirulina platensis* se han empleado varias técnicas como el ultrasonido<sup>17</sup>, la prensa de French<sup>18</sup>, la congelación-descongelación, la extracción en medio ácido, la ruptura por ósmosis, los abrasivos, la extracción acuosa y otros métodos mecánicos<sup>iError! Marcador no definido.</sup>. La ruptura celular se realiza a bajas temperaturas y en el caso que sea posible en soluciones altamente desnaturizantes. Estas condiciones disminuyen la acción de las proteasas intracelulares que pueden modificar la estructura primaria de las proteínas. La extracción en medio ácido no es un método conveniente para la obtención de la proteína intacta debido a que este tratamiento afecta la integridad del enlace tioéter del cromóforo FCB con las cadenas polipeptídicas. La extracción por tratamiento con agua es un método lento, que puede tomar varios días para lograr una liberación eficiente de la C-FC al medio. Por otra parte, el uso de métodos vigorosos de ruptura puede provocar la liberación de mayor cantidad de contaminantes al medio<sup>19</sup>.

#### Métodos cromatográficos para la purificación de la C-FC

La purificación de C-FC se ha realizado mediante el empleo de técnicas cromatográficas, aunque se han empleado métodos no cromatográficos como la precipitación con sulfato de amonio y la extracción en sistemas de dos fases acuosas<sup>20</sup>.

La C-FC ha sido extraída por ejemplo a partir de la combinación de la precipitación con sulfato de amonio con las cromatografías en hidroxapatita y de intercambio aniónico en DEAE-

Sephadex A-50. En esta estrategia las células se rompieron mediante dos procedimientos diferentes: (1) el tratamiento con lisozima/EDTA y (2) mediante un homogeneizador mecánico. El extracto obtenido en cada uno de los procedimientos fue tratado con sulfato de amonio al 50 % de saturación; luego de centrifugar, la CFC se obtuvo en el precipitado azul. Esta fracción fue disuelta y absorbida en una columna de hidroxiapatita. Las fracciones ricas en CFC fueron obtenidas a molaridades de fosfato entre 25 y 70 mM pH 7,0. Luego de la realización de este proceso de purificación la relación  $A_{620}/A_{280}$  fue igual a 4,15 (grado analítico de la C-FC), mientras que la relación  $A_{620}/A_{650}$  (medida de la pureza de la C-FC respecto a la Alo-Ficocianina) tuvo un valor de 4,12<sup>21</sup>.

Esta proteína también ha sido purificada mediante la combinación de la cromatografía por filtración en gel, la precipitación con sulfato de amonio y la cromatografía de intercambio aniónico<sup>22</sup>. En este proceso las células se rompieron con ultrasonido bajo agitación en una solución reguladora de pH de acetato de sodio 1 M pH 5,0; luego se centrifugó a 80 000 g, durante una hora. Al sobrenadante azul obtenido se le añadió sulfato de amonio sólido hasta el 70 % de saturación. El material precipitado fue resuspendido en acetato de sodio 0,1 M pH 5,0 y dializado durante toda la noche. Esta solución fue luego aplicada en una columna Sephadex G-100 y las primeras siete fracciones colectadas resultaron enriquecidas en C-FC, mientras que las últimas cuatro fracciones estuvieron enriquecidas en Alo-Ficocianina; las tres fracciones intermedias consistieron de una mezcla de ambas ficobiliproteínas. Las fracciones ricas en C-FC fueron precipitadas independientemente con sulfato de amonio. El material insoluble obtenido después de centrifugar fue resuspendido en fosfato de sodio 5 mM pH 7,0 y se aplicó en una columna DEAE-Celulosa DE-52. La elución de la C-FC ocurrió en fosfato de sodio 0,29 M pH 7,0 y la de APC en fosfato de sodio 0,4 M pH 7,0. En esta estrategia de purificación las relaciones  $A_{620}/A_{280}$  y  $A_{650}/A_{280}$  fueron igual a 4,0 y 3,5, respectivamente.

Patel *et al.*<sup>17</sup> obtuvieron la C-FC con elevada pureza usando solamente un paso cromatográfico. El extracto crudo fue precipitado de forma diferencial: (1) 20 % de saturación de sulfato de amonio y (2) 50% de saturación de sulfato de amonio. El precipitado fue disuelto en acetato de sodio 0,1 M pH 4,5 para eliminar contaminantes por cambios en el pH de la solución. La C-FC fue posteriormente precipitada con sulfato de amonio. El material resuspendido en fosfato de sodio 5 mM pH 7,0 fue colocado en una columna DEAE-Sepharose CL-6B. La fracción enriquecida con C-FC eluyó entre 0,1-0,2 M de cloruro de sodio con una  $A_{620}/A_{280}$  igual a 4,42 y un rendimiento del 46 %.

Recientemente se obtuvo la C-FC con un elevado grado de pureza combinando la precipitación diferencial con sulfato de amonio, primero en 20 % y después en 50 % de saturación de esta sal<sup>23</sup>. Luego la proteína fue cargada en un intercambiador iónico (Q-Sepharose Fast Flow). El material obtenido se aplicó en una columna de filtración en gel (Sephacryl S-100). La pureza de la C-FC fue de 4,0 con un factor de purificación de 6,35.

La C-FC también ha sido purificada mediante el uso de un sistema de lecho expandido (Phenyl-Sepharose) acoplado con un intercambio iónico en hidroxiapatita<sup>24</sup>. En este procedimiento las células se rompieron por tratamiento con sulfato de amonio 0,5 M. El sobrenadante obtenido fue cargado en el sistema de lecho expandido. Las fracciones enriquecidas en C-FC fueron aplicadas en un intercambiador iónico (Q-Sepharose) y eluida en fosfato de sodio 1 mM pH 7,0 con concentraciones crecientes de cloruro de sodio. Este sistema es escalable, aunque tiene como desventaja que la C-FC obtenida posee una relación de  $A_{620}/A_{280}$  menor que 4,0.

#### Purificación de la C-FC mediante el uso de sistemas de dos fases acuosas

El uso de los sistemas de dos fases acuosas ha demostrado ser una estrategia adecuada para la purificación de C-FC a partir de varias especies de *Spirulina*. Con estos sistemas se han alcanzado purezas elevadas y son escalables<sup>25</sup>. El uso de un sistema de dos fases acuosas formado por PEG 4000/fosfato de potasio permitió obtener C-FC con una pureza de 3,23 en un solo paso de extracción. Este parámetro se incrementó hasta 4,02 cuando se realizó un segundo paso de extracción<sup>26</sup>. Estos sistemas han sido aplicados para la purificación de C-FC a partir de otros organismos, obteniendo preparaciones con una pureza mayor que cuatro<sup>27</sup>.

#### Propiedades antioxidantes de la C-FC

Los estudios sobre las propiedades antioxidantes de la C-FC han utilizado tanto ensayos a nivel de reacciones químicas, de moléculas biológicas, de organelos aislados y fracciones subcelulares, como de sistemas celulares *in vitro* y de organismos vivos.

Ensayos de quimioluminiscencia demostraron la acción secuestradora de la C-FC sobre los radicales alcoxilos e hidroxilos, además de la inhibición de hidrocloreuro 2,2' azobis 2-amidinopropano (HAAP), un iniciador de la formación de radicales libres y de la peroxidación lipídica<sup>28</sup>. La C-FC inhibe la formación de peróxidos lipídicos en microsomas de hígado de ratas inducida por ácido ascórbico y hierro<sup>29</sup>. Basado en estos resultados también se ha descrito que la C-FC protege los eritrocitos humanos de la lisis celular provocada por radicales peroxilos<sup>30</sup>. La interacción de ambos, la C-FC y la FCB, con peroxinitro ( $\text{ONOO}^-$ ) fue estudiada espectroscópicamente y se demostró que son eficientes secuestradores de esta especie

reactiva del oxígeno<sup>31</sup>. Se ha demostrado también en dos sistemas experimentales (ensayo de enzima aislada y ensayo sanguíneo completo) que la C-FC es un inhibidor selectivo de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2)<sup>32</sup>.

#### Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la C-FC

Los estudios en animales de laboratorio han evidenciado una potente capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora de la C-FC, aunque en muchos de ellos no se indica la pureza del producto empleado. La ausencia de este dato pudiera ser una dificultad en la interpretación y comparación de los resultados entre los diferentes estudios. La C-FC inhibe el edema producido en modelos de inflamación de la pata inducida por carragenina y glucosa oxidasa<sup>33</sup>, así como en el modelo de inflamación de la oreja del ratón inducida con ácido araquidónico<sup>34</sup>. En un modelo de artritis inducida por zimosano en ratones, la C-FC (25, 50, 100 mg/kg), administrada por vía oral, una vez al día a partir del cuarto y hasta el duodécimo día posterior a la aplicación del zimosano, disminuyó la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en el líquido sinovial, así como las lesiones tisulares de la rodilla<sup>35</sup>. En ratones tratados intra-traquealmente con lipopolisacárido (LPS), la C-FC administrada tres horas después, logró disminuir en los pulmones los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) y quimiocinas (CINC-3), de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (nitrito/nitrato, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), así como la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, en inglés), COX-2 y del factor nuclear de transcripción  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, en inglés), y la actividad de la enzima mieloperoxidasa. Además, logró modular la expresión de factores mitocondriales antiapoptóticos (aumento de Bcl-2 y Bcl-XL) y proapoptóticos (disminución de Bax) en el tejido pulmonar expuesto a la lesión por LPS<sup>36</sup>. La C-FC también ha sido evaluada en un modelo de colitis inducida por ácido acético en ratas, inhibiendo la actividad de la mieloperoxidasa y la infiltración de neutrófilos en el tejido del colon<sup>37</sup>. Resultados obtenidos por nuestro grupo muestran el efecto protector de la C-FC frente a la encefalomiелitis autoinmune experimental en ratas, modelo animal de esclerosis múltiple<sup>38</sup>. En este mismo estudio, se demostró la capacidad de la C-FC de inducir células T reguladoras en cultivo de células mononucleares sanguíneas periféricas aisladas de pacientes con esclerosis múltiple.

Mediante el empleo de una línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con LPS, se ha podido demostrar que la C-FC inhibe significativamente la producción de nitritos, la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible y la formación de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , a la vez que atenuaba la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B<sup>39</sup>.

### Propiedades citoprotectoras de la CFC

Las propiedades citoprotectoras de la C-FC se han evaluado en múltiples modelos experimentales frente al daño inducido en distintos órganos y tejidos por diversos eventos y compuestos perjudiciales. Por ejemplo, se ha observado que la C-FC es un inhibidor de la agregación plaquetaria<sup>40</sup>, lo cual sugiere sus posibles aplicaciones como agente antitrombótico en enfermedades vasculares isquémicas. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado un efecto neuroprotector de la C-FC obtenida con grado analítico ( $A_{620}/A_{280} > 4,0$ ) en un modelo de isquemia cerebral global en gerbos de Mongolia<sup>41</sup>. La C-FC mejoró la recuperación cardíaca posterior el daño al miocardio inducido por una isquemia/reperfusión, mediado entre otros mecanismos por la modulación de las enzimas ERK1/2 y p38 MAPK<sup>42</sup>. Otros resultados han mostrado que la C-FC (obtenida con  $A_{620}/A_{280} = 3,8$ ) regula transcripcionalmente el factor activador de plasminógeno tipo uroquinasa a través de la ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc e incrementa la proliferación y migración en una línea celular de fibroblastos humanos (WI-38)<sup>43</sup>. Estas evidencias sugieren su empleo como agente cicatrizante de heridas. En este sentido, la aplicación tópica de C-FC en heridas dérmicas en ratones aceleró el ritmo de cicatrización<sup>44</sup>, mediante la modulación efectiva de proteínas totales, ácido urónico y factores de crecimiento<sup>45</sup>.

En cultivos primarios de células granulosas cerebelares, la C-FC fue capaz de prevenir la muerte neuronal causada por la ausencia de potasio y suero, lo cual sugiere una acción neuroprotectora<sup>46</sup>. En otra línea celular de origen neuronal humano, SH-SY5Y, también se ha evidenciado efectos protectores de la C-FC frente al daño inducido por el hidróperóxido de terbutilo<sup>47</sup> y por una sobrecarga de hierro<sup>48,49</sup>, relacionado con sus capacidades antioxidantes. El papel neuroprotector de la C-FC también ha sido examinado en un modelo de daño cerebral inducido por ácido kaínico en ratas. Los síntomas clínicos de este modelo incluyen sacudidas, temblores y alteraciones en el comportamiento. La incidencia de estos cambios fue significativamente más baja en aquellas ratas que recibieron 100 mg/kg por vía oral de C-FC<sup>50</sup>. En tejido hepático, la C-FC ha mostrado efectos protectores frente el daño inducido por CCl<sub>4</sub> tanto en ratas<sup>51</sup>, como en ratones y en una línea celular de hepatocitos humanos (L02)<sup>52</sup>, asociado a su capacidad de secuestrar eficientemente radicales libres e inducir la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa). En un modelo de encefalopatía hepática inducida con tioacetamida en ratas, la C-FC logró atenuar los daños causados en el hígado y el cerebro con una dosis intraperitoneal de 50 mg/Kg, administrada

inmediatamente después al tóxico dos veces en un intervalo de 24 horas<sup>53</sup>. Otros estudios preclínicos de la C-FC incluyen su papel protector y antioxidante frente a la aterosclerosis<sup>54</sup>, la hipertensión asociada al síndrome metabólico<sup>55</sup>, el daño renal inducido por HgCl<sub>2</sub><sup>56</sup> y por cisplatina<sup>57,58</sup>, así como en la catarata inducida por selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) en ratas<sup>59</sup> y en un modelo murino de diabetes mellitus<sup>60</sup>.

#### Propiedades antitumorales de la C-FC

Diversos estudios *in vitro* han mostrado que la C-FC limita la proliferación de líneas tumorales, por ejemplo de origen leucemia mieloide<sup>61</sup>, y de hepatocarcinoma<sup>62</sup>. El cáncer colorectal constituye una de las principales causas de muerte por tumores a nivel mundial, y entre sus principales mediadores moleculares se encuentra la sobreexpresión de la enzima COX-2<sup>63</sup>. Se ha demostrado los efectos positivos de la C-FC en la inducción de la apoptosis en una línea celular humana de cáncer de colon (COLO 205), asociado además a la activación de las caspasas 3, 8 y 9, y a la despolarización de la membrana mitocondrial<sup>64</sup>. En ratas con este tipo de tumor inducido por dicloruro de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), la administración de C-FC a 200 mg/kg (por vía oral una vez al día durante seis semanas) logró disminuir significativamente el número de lesiones tumorales en comparación con el grupo DMH tratado con vehículo. La combinación de C-FC con piroxicam, un inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas<sup>65</sup>, mostró una reducción mayor en este parámetro respecto a los tratamientos individuales. Se evidenció que la administración de C-FC/piroxicam media sus efectos a través de la inhibición de la expresión de COX-2 y la disminución de los niveles de prostaglandina-E<sub>2</sub> en la mucosa del colon<sup>66</sup>. Esta combinación también moduló los niveles de mediadores de la apoptosis en el tumor, como la disminución de la expresión de Bcl-2, el aumento de Bax, citocromo c libre, caspasa 3, caspasa 9 y Apaf-1<sup>67</sup>. Recientemente, se ha demostrado también que la combinación C-FC/piroxicam reduce la aparición de nuevas alteraciones neoplásicas en este modelo experimental, asociado al aumento de la expresión de calpaína-9 y la modulación de la cascada Wnt/ $\beta$ -catenina<sup>68</sup>.

En ratones expuestos al 12-O-tetradecanoil-13-acetato (TPA), un inductor del cáncer de la piel, la C-FC ( $A_{620}/A_{280} = 1,66$ ) administrada a dosis de 0,25, 1 y 2 mg/mL en aplicación tópica inmediatamente después del TPA, disminuyó la expresión de COX-2, pSTAT-3, IL-6 y la enzima ornitina descarboxilasa luego de cinco horas posteriores a la aplicación del tóxico. La modulación de estos genes se ha relacionado con un posible efecto preventivo frente a la tumorigénesis epidérmica<sup>69</sup>.

La purificación de C-FC se ha realizado fundamentalmente mediante técnicas cromatográficas, aunque se han empleado métodos no cromatográficos como la precipitación con sulfato de amonio y la extracción en sistemas de dos fases acuosas. Las evidencias indican que la combinación de diferentes técnicas permite obtener preparaciones de C-FC con una pureza adecuada para ser empleada con fines biofarmacéuticos. Los estudios preclínicos han evidenciado que esta proteína posee múltiples propiedades farmacológicas, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, citoprotectoras y antitumorales. La C-FC podría constituir una promisoriosa alternativa terapéutica en el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, para lo cual es necesaria la realización de ensayos clínicos futuros.

### Literatura citada

- 
- <sup>1</sup> Glazer AN. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *J Appl Phycol* 1994; 6: 105–112.
  - <sup>2</sup> Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J Appl Phycol* 2008; 20: 113–36.
  - <sup>3</sup> Singh S *et al.* Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol* 2005; 25: 73–95.
  - <sup>4</sup> Montgomery BL. Sensing the light: photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria. *Mol Microbiol* 2007; 64: 16–27.
  - <sup>5</sup> Scheer H, Zhao KH. Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Mol Microbiol* 2008; 68: 263–76.
  - <sup>6</sup> Padyana AK *et al.* Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 893–98.
  - <sup>7</sup> Torre P, Sassano CEN, Sato S, Converti A, Gioielli LA, Carvalho JCM. Fed-batch addition of urea for *Spirulina platensis* cultivation Thermodynamics and material and energy balances. *Enzyme Microb Technol* 2003; 33: 698–707.
  - <sup>8</sup> Walach MR, Bazin MJ, Pirt SJ, Balyuzi HHM. Computer Control of Carbon-Nitrogen Ratio in *Spirulina platensis*. *Biotechnol Bioeng* 1987; 29: 520-28.
  - <sup>9</sup> Piorreck M, Klaus-Hinnerk B, Pohl P. Biomass production, total protein chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 1984; 23: 207–16.

- 
- <sup>10</sup> Richmond A, Qiang H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* 1997;63-65:649–58.
  - <sup>11</sup> Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, de Carvalho JCM, Sato S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg* 2002;23:261–69.
  - <sup>12</sup> Sánchez-Luna LD, Bezerra RP, Matsudo MC, Sato S, Converti A, Monteiro de Carvalho JC. Influence of pH, Temperature, and Urea Molar Flowrate on *Arthrospira platensis* Fed-Batch Cultivation: A Kinetic and Thermodynamic Approach. *Biotechnol Bioeng* 2007; 96: 702-11.
  - <sup>13</sup> Pelizer LH, Danesi EDG, Rangel CO, Sassano CEN, Carvalho JCM, Sato S, Moraes IO. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Eng* 2003; 56:371–75.
  - <sup>14</sup> Rito-Palomares M, Nunez L, Amador D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *J Chem Tech Biotech* 2001; 76: 1273–80.
  - <sup>15</sup> Bennett A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga. *J Cell Biol* 1973; 58: 419–35.
  - <sup>16</sup> Sarada R, Pillai MG, Ravishankar GA. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem* 1999; 34: 795–801.
  - <sup>17</sup> Patel A, Mishra S, Pawar R, Ghosh PK. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expr Purif* 2005; 40: 248–55.
  - <sup>18</sup> Glazer AN, Fang S. Chromophore Content of Blue-Green Algal Phycobiliproteins. *J Biol Chem* 1973; 248: 659-62.
  - <sup>19</sup> Chaiklahan R et al. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresour Technol* 2011; 102: 7159-64.
  - <sup>20</sup> Patil G, Raghavarao KS. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochem Eng J* 2007; 34: 156–64.
  - <sup>21</sup> Boussiba S, Richmond AE. Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol* 1979; 120: 155-59.

- 
- <sup>22</sup> Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM, Orte JC. Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis*. High-performance liquid chromatographic separation of their  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *J Chromatogr A* 1997; 778:441-50.
- <sup>23</sup> Moraes CC, Kalil SJ. Strategy for a protein purification design using C-phycoerythrin extract. *Bioresour Technol* 2009; 100: 5312–17.
- <sup>24</sup> Niu JF, Wang GC, Lin X, Zhou BC. Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *J Chromatogr B* 2007;850:267–76.
- <sup>25</sup> Patil G et al. Method to obtain C-phycoerythrin of high purity. *J Chromatogr A* 2006; 1127: 76–81.
- <sup>26</sup> Patil G et al. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresour Technol* 2008; 99: 7393-96.
- <sup>27</sup> Rito-Palomares M, Nunez L, Amador D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *J Chem Tech Biotech* 2001; 76: 1273–80.
- <sup>28</sup> Bhat VB, Madyastha KM. C-phycoerythrin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys Res Commun* 2000; 275: 20-25.
- <sup>29</sup> Romay C et al. Antioxidant properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflamm Res* 1998; 47: 36-41.
- <sup>30</sup> Romay Ch, González RJ. Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxyl radicals. *Pharm Pharmacol* 2000; 52: 367-68.
- <sup>31</sup> Bhat VB, Madyastha KM. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 262–66.
- <sup>32</sup> Reddy CM et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoerythrin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 599-603.
- <sup>33</sup> Romay Ch et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflamm Res* 1998; 47: 36–41.
- <sup>34</sup> Romay Ch, Ledón N, González R. Effects of phycocyanin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test. *Arzneimittelforschung* 2000; 50: 1106-9.
- <sup>35</sup> Ramirez D et al. Phycocyanin as an antiarthritic compound. *Drug Dev Res* 1999; 48: 70-75.

- 
- <sup>36</sup> Leung P et al. Therapeutic effect of C-Phycocyanin extracted from blue green algae in a rat model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 916590.
- <sup>37</sup> Janssen-Heininger YMW, Pointer ME, Baeverle PA. Anti-inflammatory effects of phycocyanin. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 1317-27.
- <sup>38</sup> Pentón-Rol G et al. C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 29–38.
- <sup>39</sup> Cherng SC et al. Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life Sciences* 2007; 81: 1431–35.
- <sup>40</sup> Hui-Fen Ch et al. Mechanisms involved in the antiplatelet effect of C-phycocyanin. *Br J Nutr* 2006; 95: 435–40.
- <sup>41</sup> Pentón-Rol G et al. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res Bull* 2011; 86: 42–52.
- <sup>42</sup> Khan M et al. C-phycocyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 2136–45.
- <sup>43</sup> Madhyastha HK, Radha KS, Sugiki MS, Maruyama M. C-phycocyanin transcriptionally regulates uPA ARNm through cAMP mediated PKA pathway in human fibroblast WI-38 cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 1624-30.
- <sup>44</sup> Madhyastha HK et al. uPA dependent and independent mechanisms of wound healing by C-phycocyanin. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2691-703.
- <sup>45</sup> Madhyastha H et al. Regulation of growth factors associated cell migration by C-phycocyanin scaffold in dermal wound healing. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 13-9.
- <sup>46</sup> Rimbau V et al. C-Pc protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364: 96-104.
- <sup>47</sup> Marín-Prida J et al. C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca<sup>2+</sup>/phosphate-induced impairment. *Brain Res Bull* 2012; 89: 159– 167.
- <sup>48</sup> Bermejo-Bescós P et al. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro* 2008; 22: 1496–150.

- 
- <sup>49</sup> Bermejo-Bescós P et al. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chem* 2008; 110: 436–45.
- <sup>50</sup> Rimbau V et al. Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1999; 276: 75-78.
- <sup>51</sup> Vadiraja BB, Gaikwad NW, Madyastha KM. Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commu* 1998; 249: 428-31.
- <sup>52</sup> Ou Y et al. Protective effect of C-phycocyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact* 2010; 185 (2): 94-100.
- <sup>53</sup> Sathyaikumar KV et al. Co-administration of C-Phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. *J Neurol Sci* 2007; 252: 67–75.
- <sup>54</sup> Li B et al. CD59 underlines the antiatherosclerotic effects of C-Phycocyanin on mice. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 729413.
- <sup>55</sup> Ichimura M et al. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. *Nutr Res* 2013; 33: 397-405.
- <sup>56</sup> Rodríguez-Sánchez R et al. Phycobiliproteins or C-phycocyanin of *Arthrospira (Spirulina) maxima* protect against HgCl<sub>2</sub>-caused oxidative stress and renal damage. *Food Chem* 2012; 135: 2359–65.
- <sup>57</sup> Lim BJ et al. C-phycocyanin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Ren Fail* 2012; 34: 892–900.
- <sup>58</sup> Fernández-Rojas B et al. C-Phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food Funct* 2014; 5: 480-90.
- <sup>59</sup> Kumari RP, Sivakumar J, Thankappan B, Anbarasu K. C-Phycocyanin modulates selenite-induced cataractogenesis in rats. *Biol Trace Elem Res* 2013; 151: 59–67.
- <sup>60</sup> Ou Y et al. Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxan-injured mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 34: 721-6.
- <sup>61</sup> Subhashini J et al. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 453–62.
- <sup>62</sup> Nishanth RP et al. C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *Eur J Pharmacol* 2010; 649: 74–83.

- 
- <sup>63</sup> Tammali R et al. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9705–13.
- <sup>64</sup> Lu W et al. Induction of apoptosis in human colon carcinoma COLO 205 cells by the recombinant a subunit of C-phycoyanin. *Biotechnol Lett* 2011; 33: 637.
- <sup>65</sup> Grosch S et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Nat Can Inst* 2006; 98: 736–747.
- <sup>66</sup> Saini MK et al. Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycoyanin. *Mol Cell Biochem* 2012; 361: 217-28.
- <sup>67</sup> Saini MK et al. Piroxicam and C-Phycocyanin mediated apoptosis in 1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride induced colon carcinogenesis: exploring the mitochondrial pathway, nutrition and cancer. *Nutr Cancer* 2012; 64: 409-18.
- <sup>68</sup> Saini MK, Sanyal SN. Piroxicam and c-phycoyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR $\gamma$ . *Biomed Pharmacother* 2014; 68: 537-50.
- <sup>69</sup> Gupta NK, Gupta KP. Effects of C-Phycocyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 34:941-8.