

Efecto *in vitro* de la espirulina sobre los linfocitos humanos de donantes sanos y pacientes con inmunodeficiencia celular

In vitro effect of Spirulina on the human lymphocytes of healthy donors and patients with cellular immunodeficiency

Lic. Lázaro O. del Valle Pérez; Lic. Bertha B. Socarrás Ferrer; Dra. Vianed Marsán Suárez; Lic. Isabel Torres Leyva; Dra. Miriam Sánchez Segura; Lic. Yanelkys Cos Padrón; Dra. Consuelo Macías Abraham; Dr. Porfirio Hernández Ramírez; Dr. José M. Ballester Santovenia

Instituto de Hematología e Inmunología. Cuba

RESUMEN

La espirulina (*Spirulina sp*) es un alga cianofícea empleada como suplemento alimentario y por sus propiedades medicinales. Se realizó este trabajo para evaluar el efecto *in vitro* de la espirulina (Spirel, Génix, Ciudad de La Habana, Cuba) en 30 pacientes con diagnóstico de inmunodeficiencia celular y en 20 donantes sanos del Instituto de Hematología e Inmunología mediante las pruebas de transformación linfoblástica con criterio de timidina tritiada; en la expresión de los antígenos de activación HLA-DR y CD25 por el ultramicrométodo inmunocitoquímico y la formación de roseta activa. En la transformación linfoblástica con criterio de timidina tritiada no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales sin y con espirulina, tanto en los pacientes con inmunodeficiencias celulares como en los donantes sanos, mientras que se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$) al aplicar la prueba t de Student para muestras pareadas entre las condiciones experimentales sin y con espirulina, tanto en la expresión de los antígenos de activación como en la formación de roseta activa en ambos grupos analizados. Se concluye que la espirulina de producción cubana influye positivamente en el proceso de activación de los linfocitos humanos.

Palabras clave: espirulina, transformación blástica, roseta activa, linfocitos, marcadores de activación, ultramicrométodo inmunocitoquímico.

ABSTRACT

Spirulina (*Spirulina* spp) is a Cyanophyceae alga used as a dietary supplement and for its medicinal properties. This paper was aimed at evaluating the *in vitro* effect of spirulina (Spirel, Génix, Havana City, Cuba) on 30 patients with diagnosis of cellular immunodeficiency and on 20 healthy donors from the Institute of Hematology and Immunology by the lymphoblastic transformation tests with tritiated thymidine, expression of HLA-DR and CD25 activation antigens by the immunocytochemical ultramicromethod, and the formation of active rosette. In the lymphoblastic transformation with criterion of tritiated thymidine, no statistically significant differences were found under the experimental conditions with and without spirulina, both in patients with cellular immunodeficiencies and in sound donors. Statistically marked differences ($p < 0,001$) were detected on applying the Student's *t* test for matched samples between the experimental conditions with and without spirulina in the expression of the activation antigens and in the rosette formation in the analyzed groups. It was concluded that spirulina produced in Cuba exerted a positive influence on the activation process of human lymphocytes.

Key words: Spirulina, blastic transformation, active rosette, lymphocytes, activation markers, immunocytochemical ultramicromethod.

INTRODUCCIÓN

La espirulina (E) es un alga cianofícea que crece y se multiplica en aguas con alcalino. Su nombre se deriva del latín *espiral* o *helix* debido a su configuración física; carece de núcleo y otros organelos, presenta pigmentos verdes (clorofila) azules (ficocianina) con efectos antiinflamatorios y antioxidantes.¹⁻³

Se conoce el uso como alimento de la E desde la antigüedad, y en las últimas décadas ha sido muy estudiada porque constituye una fuente de nutrientes como: proteínas (entre el 65 y 70 %, con todos los aminoácidos esenciales, a diferencia de la carne que posee el 22 % de proteínas); lípidos (abundantes ácidos grasos esenciales, como el ácido gammalinoleico, precursor de la síntesis de la prostaglandina); las vitaminas tiamina (vit B1), riboflavina (vit B2), niacina (vit B3), ácido pantoténico (vit B5) piridoxina (vit B6), biotina (vit B8), ácido fólico, inositol, cobalamina (vit B12), tocoferol (vit E); y minerales (potasio, calcio, zinc, magnesio, manganeso, selenio, hierro y fósforo).^{4,5}

La espirulina posee actividad antiviral que se atribuye en parte a su contenido en sulfoglicolípidos, lo que puede estar relacionado con su capacidad para aumentar la respuesta inmune y estimular la función de los macrófagos y de las células NK.⁶⁻¹² Se realizó este trabajo para determinar el efecto *in vitro* de la espirulina sobre los linfocitos humanos de donantes sanos y de enfermos con diagnóstico de inmunodeficiencia celular.

MÉTODOS

Se estudió el efecto *in vitro* de la E sobre los linfocitos procedentes de 20 donantes voluntarios del Servicio de Medicina Transfusional del Instituto de Hematología e Inmunología y 30 enfermos con diagnóstico de inmunodeficiencia celular, que no habían recibido ningún medicamento en el mes anterior a la extracción de la muestra. En cada caso, se extrajeron 20 de sangre heparinizada (15 UI/) con jeringuillas plásticas desechables. El aislamiento de células mononucleares se efectuó según el método de Böyum modificado sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad 1,077g/) (Sigma, EE.UU.).¹³

Preparación de la solución de E (Spirel, Génix, Ciudad de La Habana): se trituró la tableta (400 mg), se diluyó en 10 de medio RPMI 1640, se incubó (1 h a 4 °C), se centrifugó (2 500 rpm, 4 °C, 15 min). El sobrenadante se esterilizó (filtro 22 mm, Vygon, Francia) y la concentración final de la solución fue de 40 mg/mL.

Para evaluar la respuesta a la E se utilizó la prueba de transformación linfoblástica con criterio de timidina tritiada en una concentración de 2×10^5 /pocillo en placas de 96 pozos (NUNC, Dinamarca) en 200 mL de medio RPMI 1640 al 20 % de suero fetal bovino (Sigma, EE.UU.) sin exposición a la E y con diluciones dobles de este producto desde 1:4 hasta 1:4096 durante 72 h a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ en una incubadora (ASSAB, Suecia). Para determinar la viabilidad celular se utilizó la técnica de exclusión del azul tripán, que en todos los casos fue superior al 98 %. Seis horas antes de culminar el cultivo se le añadió a cada pozo 1 mCi de timidina tritiada (Amersham, Inglaterra), (actividad específica 20 Ci/mmol). Las placas se procesaron en un cosechador de células (*Flow Laboratories*, Inglaterra). La detección de partículas b se realizó en un equipo RAK b (LKB, Suecia). Los resultados se expresaron en conteos por minuto (CPM).

La determinación de los antígenos de activación HLA-DR y CD25 se realizó sin y con la estimulación de E (dilución óptima de 1:64) durante 72 h en las mismas condiciones empleadas para la transformación blástica y el porcentaje de estos antígenos se efectuó por el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIO).¹⁴

El estudio del efecto de la E sobre la formación de roseta activa (RA) se realizó sin y con incubación con E (dilución óptima 1:64) a 4 °C durante las 24 h previas a la misma.¹⁵

Para comparar los resultados obtenidos entre las muestras que se expusieron a la E y aquellas en que no se usó este producto, se utilizó la prueba estadística t de Student para muestras pareadas.

Bioética: a los pacientes y donantes se les explicó el objetivo del estudio, los posibles beneficios derivados de los resultados y la ausencia de riesgos asociados. Se confeccionó una planilla para el consentimiento informado de los donantes y enfermos que participaron en el mismo.

RESULTADOS

En la transformación blástica no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los linfocitos cultivados con y sin E, tanto en los donantes como

en los enfermos. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas (pE 0,001) en la RA y en los marcadores de activación entre los linfocitos cultivados sin y con la dilución de E (1:64) de los donantes y de los enfermos ([figura 1](#) y [tabla 1](#))

DISCUSIÓN

La E no produjo aumento de la proliferación de los linfocitos humanos procedentes de donantes sanos y de enfermos con inmunodeficiencia celular utilizando como criterio la incorporación de timidina tritiada al ADN de nueva síntesis, resultados que coinciden con lo observado por otros autores. Esto es causado por uno de los componentes de la E que inhibe la entrada de la timidina tritiada al linfocito.^{4,16}

La E *in vitro* aumentó de forma significativa (pE0,001) la expresión de las moléculas de activación HLA DR y CD25, así como la formación de RA, posiblemente por una sobreexpresión de la molécula CD2, tanto en los linfocitos de los donantes sanos como de los enfermos con inmunodeficiencia celular. Hallazgos similares se han reportado por otros autores en estudios con individuos sanos, pero no hemos hallado en la literatura revisada el estudio del efecto *in vitro* de la E sobre los linfocitos de enfermos con diagnóstico de inmunodeficiencia celular.¹⁷

La E *in vitro* aumentó el porcentaje en la formación de RA y de expresión de los marcadores de activación con valores superiores en los linfocitos de los enfermos en comparación con los de donantes, pero no de forma significativa. En estudios con inmunomoduladores inespecíficos se ha comprobado que algunos requieren de un sistema inmunológico funcional, otros tienen sus máximos efectos sobre un sistema inmunológico deprimido, y otros que actúan tanto sobre sistemas normales como inmunodeprimidos, este último se corrobora con lo obtenido en nuestra experiencia.¹⁸

La acción *in vitro* de la E tanto en la sobreexpresión de los marcadores de activación como en la formación de RA, podría deberse al efecto sinérgico de todos los componentes de la E, los cuales no presentan efectos secundarios ni crean dependencia. Las vitaminas y minerales presentes en la E constituyen preparados farmacéuticos conocidos, se sabe que el consumo de estos en su fuente natural presenta algunas ventajas, ya que se encuentran enlazados a complejos de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y quelatos, los que en su conjunto son fácilmente asimilables y reconocidos por el organismo, a diferencia de sus análogos sintéticos, que suelen además presentar cambios sustanciales en la estructura química.^{4,19}

Teniendo en cuenta que la E no es un medicamento, sino un suplemento alimentario, podría utilizarse como inmunoestimulante en aquellos enfermos que lo necesiten, por lo que es necesario continuar realizando los estudios preclínicos y clínicos necesarios; además, sería interesante realizar estudios de marcadores de membrana linfocitaria en linfocitos sin y con estimulación con E con el empleo de la citometría de flujo.

Agradecimientos

Agradecemos a las técnicas *Lourdes Palma Salgado*, *Martha Ponce Sandoval*, *Mónica García Cuéllar*, *Yamila Junco* y *Gladys Graña Ayllón*, del Instituto de Hematología e Inmunología, por la colaboración brindada en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amha B, Yoshimichi O. Current knowledge on potential health benefits of spirulina. *J Appl Phycology* 1993;5:235-41.
2. Romay C, Armesto J, Ramírez D, González R, Ledón N, García I. Antioxidant and antiinflammatory properties of C-phycocyanin from blue green algae. *Inflamm Res* 1998;47:36-40.
3. Romay CH, Remírez D, González R. Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. *Rev Cubana Invest Biom* 2001;20:38-41.
4. Sánchez N, BU M, León N, et al. Fundamentos de una posible acción beneficiosa de la *Spirulina platensis* en las neuropatías periféricas. *Rev Cubana Plant Med* [online]. Sep.-dic. 2002;7(3) [citado 10 agosto 2007], p.0-0. Disponible en la World Wide Web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962002000300008&lng=es&nrm=iso. ISSN 1028-4796. (versión electrónica).
5. Sánchez N, Bu M, León N, Pérez H, et al. Efecto de la *Spirulina platensis* en la toxicidad producida por acrilamida. *Rev Cubana Plant Med*. 2003; 8: no.1 [citado 10 agosto 2007], Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
6. Shih SR, Tsai KN, Li YS, Chueh CC, Chan EC. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Med Virol* 2003;70:119-25.
7. Gorobets OB, Blinhova LP, Baturó AP. Action of *Spirulina platensis* on bacterial viruses. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2002;6:18-21.
8. Hirashi T, Matsumoto M, Hazaki K, Sachi Y, Vi M, Seya T. Activation of the human innate system by *Spirulina*: Augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int Immunopharmacol* 2002;2:423-34.
9. Ayehonie S, Belay A, Baba TW, Ruprech RM. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *J Acquir Defic Syndr Human Retrovirol* 1998;18:7-12.
10. Lee AN, Werth VP. Activation of autoimmunity following use 2007; of immunostimulatory herbal supplements. *Arch Dermatol* 2004;140:723-7.
11. Subhashini J, Mahipal SV, Reddy MC, Mallikarjuna R, Rachamalla A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line K562. *Biochem Pharmacol* 2004;68:453-62.
12. Farooq SM, Asokan D, Kalaiselvi P, Sakthivel R, Varalakshmi P. Prophylactic role of phycocyanin: A study of oxalate mediated renal cell injury. *Chem Biol Interact* 2004;149:1-7.

13. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968;10:1041-9.
14. Suárez L, Cruz C, Rivero R. Ultramicrométodo inmunocitoquímico. Utilización de anticuerpos utilizados para el inmunofenotipaje celular. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1995;11:57-62.
15. Cruz C, Fernández ML, Bernal B, Hernández P, Ballester JM. Técnicas de rosetas. La aplicación en alteraciones inmunológicas. Rev Cubana Med 1981;20:379-87.
16. Lisheng L. Inhibitive effect and mechanism of polysaccharide of spirulina on transplanted tumor cell in mice. Marine Sciences 1991;5:33-8.
17. del Valle L, Macías C, Tórrres I, et al. Efecto in vitro de la espirulina sobre la respuesta inmune. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. [online]. 2002;18: [citado 10 agosto 2007], Disponible en: la World Wide Web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892002000200006&lng=es&nrm=iso. ISSN 0864-0289.
18. Stites D, Stobo J, Fudenberg H, Well V. Inmunología Básica y Clínica. 5 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1987. p. 756.
19. Kardos PD, Leong SC, Arya AK, Papouliados SM, Apostolidou MT, Issing WJ, et al. Complementary ENT: A systematic review of commonly used supplements. J Laryngol Otol 2007;121:779-82.

Recibido: 15 de diciembre del 2007.

Aprobado: 3 de enero del 2008.

Lic. *Lázaro O. del Valle Pérez*.

Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado Postal 8070, Ciudad de La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 6438268, 6438695, 6434214. Fax (537) 6442334. e-mail: ihidir@hemato.sld.cu

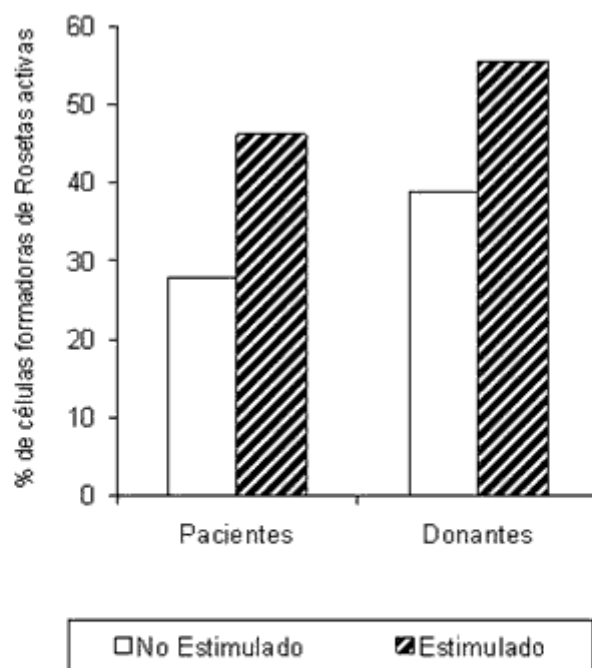


Fig. 1. Efecto *in vitro* de la espirulina en la formación de roseta activa en pacientes y donantes.

Tabla. Efecto *in vitro* de la espirulina en la expresión de los antígenos de activación HI-Dr y CD25 en pacientes y donantes

		Pacientes	Pacientes	Donantes	Donantes
HLA-DR	No Estimulado	6,57		6,15	
HLA-DR	Estimulado	26,33		26,15	
CD 25	No Estimulado		2,5		2,3
CD 25	Estimulado		11,36		11,1