

Principales propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina

Main immunomodulatory and anti-inflammatory properties of phycobiliproteins C-phycoyanin

Gabriela Díaz Domínguez, Vianed Marsán Suárez, Lázaro O. del Valle Pérez

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Las ficobiliproteínas son proteínas solubles en agua, que funcionan como pigmentos fotosintéticos accesorios en diferentes organismos tales como las cianobacterias, las algas rojas y las criptomonadas. En el alga verdeazul *Spirulina platensis*, una de las ficobiliproteínas más abundantes es la C-ficocianina, la cual tiene unido tres cromóforos ficocianobilina mediante un enlace tioéter a cisteínas específicas. La ficocianobilina es un tetrapirrol lineal asociado a la captación de energía solar en estos organismos. La C-ficocianina ha sido empleada en diferentes investigaciones biomédicas como biomarcador, por sus propiedades fluorescentes, y como posible agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, por sus propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Se ha demostrado que esta proteína aumenta la liberación de interferón gamma en células mononucleares de sangre periférica y modula la producción de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa, entre otras. Además, se ha encontrado que la C-ficocianina tiene efecto inmunomodulador de citocinas que potencian la activación de las células del sistema inmune, como la IL-6 y la IL-1 β , así como la regulación de aproximadamente 190 genes implicados en la inmunidad.

Palabras clave: C-ficocianina; ficocianobilina; sistema inmunológico; inmunomodulador; antiinflamatorio.

ABSTRACT

Phycobiliproteins are water-soluble proteins that function as accessory photosynthetic pigments in different organisms such as cyanobacteria, red algae and cryptomonads. In the blue-green algae *Spirulina platensis* one of the most abundant phycobiliproteins is the C-phycoerythrin, which has three phycoerythrin chromophores linked through a thioether bond to specific cysteine. The phycoerythrin is a linear tetrapyrrole associated with solar energy absorption in these organisms. The C-phycoerythrin has been used in several biomedical researches as a biomarker, for their fluorescence properties, and as a possible therapeutic agent for the treatment of diseases associated with oxidative stress for its antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. It has been shown that this protein increases the release of interferon gamma in peripheral blood mononuclear cells, and modulates the production of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor among others. Furthermore it has been found that the C-phycoerythrin has immunomodulatory effect on cytokines that enhance the activation of immune cells, such as IL-6 and IL-1 β , and the regulation of about 190 genes involved in immunity.

Keywords: C-phycoerythrin; phycoerythrin; immune system; immunomodulatory; anti-inflammatory.

INTRODUCCIÓN

Las ficobiliproteínas son proteínas solubles en agua, que funcionan como pigmentos fotosintéticos accesorios en diferentes organismos tales como las cianobacterias, las algas rojas y las criptomonadas.¹ La aloficocianina (APC), la C-ficocianina (CPC), la ficoeritrina (PE) y la ficoeritrocianina (PEC) son las principales ficobiliproteínas que componen los ficobilisomas (FBS). Los FBS son complejos supramoleculares que aparecen anclados periféricamente en la superficie externa de la membrana de los tilacoides de las células de estos organismos.²

En el alga verde azul *Spirulina platensis* una de las ficobiliproteínas más abundantes es la CPC, que está formada por dos cadenas polipeptídicas α y β de masas moleculares semejantes, unidas por interacciones no covalentes. Los pesos moleculares de las cadenas alfa y beta son de 17,6 kDa y 18,1 kDa, respectivamente³ La CPC presenta la absorción máxima a una longitud de onda de 620 nm⁴ y además tiene unido tres cromóforos ficocianobilina (PCB), mediante enlace tioéter, a cisteínas específicas. La PCB es un tetrapirrol lineal asociado a la captación de energía solar en estos organismos.⁵ Esta molécula es la responsable de la coloración azul de las ficocianinas.

La CPC en solución puede adoptar diferentes conformaciones en dependencia del grado de agregación de la proteína. Esta estructura puede encontrarse en forma de monómero, trímero, hexámero o dodecámero, las cuales se encuentran en equilibrio⁶. La actividad biológica de la CPC pudiera modificarse por el grado de agregación en el que se encuentra esta proteína.

La CPC ha sido empleada en diferentes investigaciones biomédicas como biomarcador, por sus propiedades fluorescentes⁷ y, como posible agente terapéutico

para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, por sus propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras^{8,9}. Se ha demostrado que esta proteína tiene efecto hepatoprotector al eliminar radicales libres, inhibir la peroxidación lipídica y por tanto proteger al hígado del daño producido químicamente¹⁰. Las propiedades antioxidantes de la CPC están asociadas al sistema tetrapirrólico PCB.¹¹

Estudios previos han demostrado las propiedades antiinflamatorias de la CPC, así como su efecto inmunomodulador en la expresión de enzimas hepáticas y renales relacionadas con la detoxificación^{1,2}.

En el presente trabajo tiene como objetivo fundamentar las principales propiedades de la ficobiliproteína CPC como agente inmunomodulador y antiinflamatorio.

DESARROLLO

La ficobiliproteína CPC es bien conocida por sus propiedades antioxidantes y la capacidad de secuestrar radicales libres que se forman en los organismos debido al estrés oxidativo inducido por diferentes enfermedades.^{13,14} En la última década se han publicado varios trabajos investigativos en los cuales esta proteína ha sido un elemento importante en la Inmunología^{1,5,16}.

Propiedades inmunomoduladoras de la C-ficocianina

La CPC fue utilizada como tratamiento en modelos de ratas que tenían atrofia del timo inducida por cloruro de tributilo, el cual constituye un contaminante ambiental. Los resultados obtenidos mostraron que esta proteína tuvo un efecto inhibitorio *in vivo* del proceso apoptótico de los timocitos en las ratas. Adicionalmente, se observó que el tratamiento con CPC mejoró la morfología del tejido de este órgano de gran importancia en la inmunidad celular.¹⁷

Basha *et al.* demostraron, en estudios *in vitro*, que células mononucleares de sangre periférica, obtenidas de pacientes con hepatitis C crónica y daño hepático grave, cuando eran cultivadas con CPC exhibían una producción más elevada de interferón gamma (IFN- γ). Con los resultados obtenidos se demostró también la seguridad de la CPC y el efecto inmunomodulador de esta proteína puede conducir a un estudio *in vivo* de pacientes con hepatitis C crónica con baja o ninguna respuesta al tratamiento convencional con IFN- γ .¹⁸

En un estudio realizado en 2013 con modelos de ratones afectados con aterosclerosis, los autores publicaron que el tratamiento de forma sinérgica con CPC y transfección del gen que codifica la proteína CD59, involucrada en la protección de los eritrocitos del complejo de ataque a la membrana (MAC) iniciado por el sistema del complemento,¹⁹ redujo los niveles de lípidos en la sangre. Además promovió la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, así como la inhibición de otras proapoptóticas en células endoteliales. También se demostró que la CPC puede promover la expresión de CD59, el cual inhibe la formación de MAC y, que ambas proteínas pudieron retardar el progreso de formación de placas ateroscleróticas.²⁰

Sin embargo, recientemente se han comunicado resultados donde se muestra la actividad inhibitoria de la CPC. Yang *et al.* observaron que la terapia combinada de

CPC y ácido todo transretinoico (*ATRA*, siglas en inglés) *in vitro* tuvo un efecto inmunomodulador significativo al disminuir la expresión de la proteína CD59 en células HeLa. También se demostró el efecto inhibitorio del ciclo celular con la inducción de apoptosis y la citolisis mediada por el complemento.²¹

La actividad inmunomoduladora de la CPC también se ha estudiado en macrófagos J774A.1 tratados con concentraciones crecientes (0-400 µg/mL) de la proteína purificada. Los resultados de esta investigación mostraron que la cantidad de TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa) secretada por los macrófagos J774A.1 aumentó con el incremento de la concentración de CPC. Además, se encontró que concentraciones entre 50 y 400 µg/mL de CPC aumentaron la producción y secreción de IL-6 por la células J774A.1. Con la dosis mínima de 50 µg/mL no se observó secreción IL-1β por los macrófagos pero, a la concentración de 100-400 µg/mL de CPC la activación en la producción de IL-1β fue significativa. Estos resultados evidenciaron la bioactividad de la CPC como modulador de las células del sistema inmune en mamíferos ya que citocinas como la IL-1β pueden promover la proliferación de células T, inducir la producción de anticuerpos por las células B y potenciar las funciones citotóxicas de los linfocitos T citolíticos y la células *NK* (asesinas naturales). Por otra parte, la IL-6 promueve la proliferación de células B en el hígado mientras que el TNF-α tiene un efecto citotóxico y supresor del crecimiento de células tumorales.²²

Actividad antiinflamatoria de la C-ficocianina

La actividad antiinflamatoria de la CPC se ha demostrado *in vitro* según su capacidad para inhibir la producción de compuestos que son conocidos por inducir procesos inflamatorios en los organismos. La producción extensiva de óxido nítrico (NO) derivada de la enzima inducible óxido nítrico sintasa (*iNOS*, siglas en inglés) es crucial en la patogénesis de la inflamación. Los resultados obtenidos mostraron que la CPC inhibió de forma significativa la producción de nitrito, indicador de NO, y la expresión de la enzima en macrófagos RAW 264.7 tratados con lipopolisacáridos (LPS). Adicionalmente, se observó una atenuación en la producción de TNF-α y se inhibió la activación del factor nuclear-κB (NF-κB), que constituye un regulador importante en la expresión de varios genes inflamatorios como: *iNOS*, cicloxigenasa-2, citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión. La actividad inhibitoria de la CPC sobre la producción de NO y la expresión de *iNOS* está asociada con la disminución de la liberación del TNF-α al medio por los macrófagos y la activación del NF-κB.²³

Las propiedades inmunológicas de la CPC se han estudiado recientemente en el campo de la medicina veterinaria. En un modelo *in vitro* de osteoartritis canina, para el cual se utilizaron condrocitos caninos normales, se evaluó la actividad antiinflamatoria de la CPC. Las condiciones inflamatorias fueron inducidas por la IL-1β. Los resultados obtenidos mostraron que a concentraciones crecientes de 0 a 250 µg/mL de la proteína se observó una reducción de mediadores inflamatorios como la prostaglandina E2, el TNF-α y la IL-6. Ello sugiere que la CPC pudiera ser capaz de modular de forma positiva al menos dos mecanismos primarios patogénicos de la osteoartritis tales como el proceso inflamatorio y la degeneración de los condrocitos *in vitro*.²⁴

Se han publicado muchas de las propiedades farmacológicas de la CPC relacionadas con diferentes enfermedades. Investigadores del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba (CIGB) evaluaron la posible actividad inmunológica de la CPC en modelos de ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y demostraron que la CPC es capaz de desencadenar mecanismos en la prevención o disminución del grado de expresión de la EAE en ratones y que tiene actividad como

inductor de respuesta de las células T reguladoras (Treg) en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple (EM). Estos resultados indicaron que la activación específica de las células Treg pudiera representar un mecanismo esencial de apoyo al potencial terapéutico de la CPC para la EM.²⁵

En investigaciones recientes se evaluaron los efectos antiinflamatorio y citoprotector de la CPC en modelos de ratones con EAE. Estos resultados se compararon con los obtenidos mediante el tratamiento convencional con IFN- β . La CPC se administró a un grupo de ratones en dosis de 2, 4 o 8 mg/kg por vía intraperitoneal y al otro grupo se le administró IFN- β en una dosis única subcutánea de 2 000 UI. Los resultados mostraron que la CPC tiene un efecto reductor de las infiltraciones inflamatorias en el tejido espinal, lo cual mejora el estado de deterioro clínico de los animales. Observaron, además, el efecto de esta proteína en la preservación axonal y en la regulación de la expresión de la IL-17 en suero y tejido cerebral. También, que la CPC y el IFN- β mejoraron el estado oxidativo de los ratones con EAE.²⁶

Las propiedades inmunorreguladoras de la CPC fueron evaluadas en un modelo de ratas con lesiones agudas de pulmón inducidas por LPS. La proteína fue administrada a los animales de experimentación, por vía intraperitoneal, en una concentración de 50 mg/kg de peso corporal. Los resultados obtenidos mostraron que posterior al tratamiento con CPC disminuyó la concentración de proteínas inducidas por LPS y se inhibió el aumento de los niveles de nitrito/nitrato. Además se observó una disminución de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β y la IL-6. Se demostró que el tratamiento con CPC atenuó de forma significativa la actividad de la mieloperoxidasa inducida por LPS, la formación de radicales como el O₂⁻ y los niveles de expresión y activación de las enzimas *iNOS*, ciclooxigenasa-2, así como el NF- κ B en el pulmón. Por otra parte, la CPC reguló de forma inhibitoria la expresión de enzimas proapoptóticas como la caspasa-3 y la proteína Bax y aumentó la expresión de Bcl-2 y Bcl-XL, ambas proteínas con actividad antiapoptótica. Los resultados encontrados indicaron que la CPC pudiera ser potencialmente utilizada para el tratamiento de la lesión aguda del pulmón inducida por LPS mediante la inhibición de procesos inflamatorios y apoptóticos en tejido pulmonar.²⁷

Recientemente, se ha demostrado que el cloruro de tributilo no solo afecta el tejido tímico¹⁷, también constituye un agente neurotóxico que afecta a células neurales como los astrocitos y las células gliales, mediante la activación y liberación de las citocinas inflamatorias IL-6 y el NF- κ B p65, entre otras. Los autores de este trabajo publicaron que la administración de la CPC en modelos de ratones previamente expuestos a este contaminante, produjo una disminución en los niveles de estas citocinas, principalmente el NF- κ B p65. Este resultado demostró la eficacia de la CPC como agente neuroprotector y antiinflamatorio.²⁸

Las propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la CPC no solo se han estudiado a nivel celular, también se ha encontrado que esta proteína tiene una actividad moduladora en la expresión génica de proteínas involucradas en el mantenimiento de un estado inmunológico adecuado de los organismos. Marín *et al.*, evaluaron los efectos de la PCB en la expresión génica de células de supervivencia PC12 en modelos de ratones con oclusión bilateral común de la arteria carótida (*BCCA0*, por sus siglas en inglés). El tratamiento con PCB moduló 190 genes (93 de regulación arriba y 97 de regulación abajo) asociados a varios procesos inmunológicos e inflamatorios en los ratones con *BCCA0*. Además la PCB moduló positivamente 19 genes relacionados de forma directa con ambientes perjudiciales y proinflamatorios.¹²

Los descubrimientos recientes acerca de las potencialidades de la CPC como agente modulador de genes y proteínas del sistema inmune, la convierten en un blanco terapéutico atractivo para tratar enfermedades autoinmunes y degenerativas como

Esclerosis Múltiple, Alzheimer, Parkinson y Huntington. La combinación de esta proteína con tratamientos convencionales aumenta la respuesta de los organismos ante diferentes enfermedades como algunos tipos de cáncer y otras enfermedades crónicas como la hepatitis C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM, Orte JC. Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis*. High-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits. *J Chromatogr A*. 1997;778:441-50.
2. Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J Appl Phycol*. 2008;20(2):113-36.
3. William VP, Glazer AN. Structural Studies on Phycobiliproteins. I. Bilin-containing peptides of C-phycoyanin. *J Biol Chem*. 1978;253:202-11.
4. Padyana AK, Bhat VB, Madyastha KM, Rajashankar KR, Ramakumar S. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Comm*. 2001;282:893-8.
5. MacColl R, Lee JJ, Berns DS. Protein Aggregation in C-Phycocyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. *Biochem J*. 1971;122:421-6.
6. Kuddus M, Singh P, Thomas G, Al-Hazimi A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *BioMed Res Int*. 2013;2013:742859.
7. Bhat VB, Madyastha KM. C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro. *Biochem Biophys Res Comm*. 2000;275:20-5.
8. Pentón G, Marín J, Pardo G, Martínez G, Acosta EF, Valdivia A, et al. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res Bull*. 2011;86(1-2):42-52.
9. Ou Y, Zheng S, Lin L, Jiang Q, Yang X. Protective effect of C-phycoyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact*. 2010;185(2):94-100.
10. González R, Rodríguez S, Romay C, Ancheta O, González A, Armesto J, et al. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacol Res*. 1999;39:55-9.
11. Marín J, Pavón N, Llópiz A, Fernández JR, Delgado L, Mendoza Y, et al. Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute hypoperfusion in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(1):49-60.

12. Pleonsil P, Suwanwong Y. An in vitro study of c-phycoyanin activity on protection of DNA and human erythrocyte membrane from oxidative damage. *J Chem Pharm Res.* 2013;5(5):332-6.
13. Cherdkiatikul T, Suwanwong Y. Production of α and β Subunits of Spirulina Allophycocyanin and C-Phycocyanin in *Escherichia coli*: A Comparative Study of Their Antioxidant Activities. *J Biomol Screen.* 2014 Jul;19(6):959-65. doi: 10.1177/1087057113520565.
14. Hoseini SM, Khosravi-Darani K, Mozafari MR. Nutritional and Medical Applications of Spirulina Microalgae. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13(8):1231-7.
15. Ku CS, Pham TX, Park Y, Kim B, Shin M, Kang I, et al. Edible blue-green algae reduce the production of proinflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in macrophages and splenocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(4):2981-8.
16. Gupta M, Dwivedib UN, Khandelwal S. C-Phycocyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. *Toxicol Lett.* 2011;204(1):2-11.
17. Basha OM, Zaghoul SG, Sadeq RA, Hafez RA, El-Mohsen MA, El-Ayoty YM. C-Phycocyanin Effect on IFN- γ Production in Patients with Chronic Hepatitis C Infection: In vitro Study. *Egypt J Med Microbiol.* 2009;18(2):81-90.
18. Li B, Xu YJ, Chu XM, Gao MH, Wang XH, Nie SM, et al. Molecular mechanism of inhibitory effects of CD59 gene on atherosclerosis in ApoE (-/-) mice. *Immunol Lett.* 2013;156(1-2):68-81.
19. Li B, Chu XM, Xu YJ, Yang F, Lv CY, Nie SM. CD59 Underlines the Antiatherosclerotic Effects of C-Phycocyanin on Mice. *BioMed Res Int.* 2013;2013:729413.
20. Yang F, Li B, Chu XM, Lv CY, Xu YJ, Yang P. Molecular mechanism of inhibitory effects of C-phycoyanin combined with all-trans-retinoic acid on the growth of HeLa cells in vitro. *Tumor Biol.* 2014;35:5619-28.
21. Chen HW, Yang TS, Chen MJ, Chang YC, Wang EI, Ho CL, et al. Purification and immunomodulating activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochem.* 2014;49:1337-44.
22. Cherng S, Cheng S, Tarn A, Chou T. Anti-inflammatory activity of c-phycoyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2007;81:1431-5.
23. Martínez SE, Chen Y, Ho EA, Martínez SA, Davies NM. Pharmacological effects of a C-phycoyanin-based multicomponent nutraceutical in an in-vitro canine chondrocyte model of osteoarthritis. *Can J Vet Res.* 2015;79(3):241-9.
24. Pentón G, Martínez G, Cervantes M, Lagumersindez N, Acosta EF, Falcón V, et al. C-phycoyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(1):29-38.

25. Pentón G, Lagumersindez N, Muzio L, Bergami A, Furlan R, Fernández JR, et al. Comparative Neuroregenerative Effects of C-Phycocyanin and IFN- Beta in a Model of Multiple Schlerosis in Mice. J Neuroimmune Pharmacol. 2016 Mar;11(1):153-67. doi: 10.1007/s11481-015-9642-9.

26. Leung PO, Lee HH, Kung YC, Tsai MF, Chou TC. 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. doi: 10.1155/2013/916590.

27. Mitra S, Siddiqui WA, Khandelwal S. C-Phycocyanin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its anti-oxidant and anti-inflammatory property: A comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain. Chem Biol Interact. 2015 Aug; 238;138-50 doi: 10.1016/j.cbi.2015.06.016.

Recibido: diciembre 29, 2015.

Aceptado: mayo 23, 2016.

Lic. Gabriela Díaz Domínguez . Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Email: rchematologia@infomed.sld.cu