

RESEÑA

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTI-INFLAMATORIAS DE LA FICOCIANINA, PIGMENTO MAYORITARIO DE LA *Spirulina (Arthospira) maxima*, MICROALGA UTILIZADA COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL

Cheyly Romay Penabad

Departamento de Farmacología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Avenida 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

12 de diciembre del 2000.

TRABAJO PRESENTADO EN OPCION AL GRADO CIENTIFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS FARMACEUTICAS.

Las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) desempeñan un papel fundamental en los procesos inflamatorios y se ha demostrado que los fármacos anti-inflamatorios ejercen al menos parte de su actividad por interacción con las ERO o los sistemas que las generan.

La estrategia actual de búsqueda de nuevos agentes anti-inflamatorios de origen natural o sintético, se basa en la combinación de las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes; de hecho, se ha demostrado que cuando se modifica la estructura de fármacos anti-inflamatorios clásicos como la indometacina y el ibuprofeno mediante la incorporación de una molécula con propiedades antioxidantes como la cisteamina, se potencializa su efecto anti-inflamatorio.

Por otra parte, se conoce que las sustancias que poseen grupos pirrólicos en su estructura, como los derivados de los aminoetilpirroles y del ácido pirroloacético, presentan propiedades anti-inflamatorias, siendo algunas de ellas antioxidantes, ya que inhiben la peroxidación lipídica microsomal *in vitro*. La bilirrubina, reconocido antioxidante endógeno presente en el suero, presenta en su estructura un tetrapirrol lineal al cual se le atribuye su capacidad de reaccionar con especies radicálicas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, este trabajo se propuso demostrar si la ficocianina (Fc), biliproteína que representa alrededor del 20 % del peso seco de la microalga *Spirulina* y cuyos grupos bilínicos cromogénicos son tetrapirroles lineales, presenta propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias *in vitro* e *in vivo*.

Las propiedades antioxidantes de la Fc, purificada mediante precipitación con sulfato de amonio (65 %) y cromatografía de intercambio iónico, se evaluaron en diferentes sistemas experimentales *in vitro* como son: a) la inhibición de la señal quimioluminiscente producida en la oxidación del luminol por especies radicálicas (alcoxilo, hidroxilo y superóxido) generadas mediante reacciones químicas bien conocidas, b) la inhibición de la peroxidación lipídica inducida por Fe^{+2} -ascórbico en microsomas aislados de hígado de rata y por radicales peroxílicos, generados en la termólisis de un azocompuesto, en las membranas de eritrocitos obtenidos de voluntarios sanos, c) la inhibición de la señal luminosa producida por leucocitos polimorfonucleares (PMN) circulantes humanos, al ser activados con zimosán opsonizado, y d) la velocidad de decoloración de los grupos bilínicos (tetrapirrol lineal) a una $\lambda_{620 \text{ nm}}$ al reaccionar con radicales peroxílicos y con el HOCl.

La evaluación de las propiedades anti-inflamatorias de un extracto crudo de Fc, se realizó por vía oral, en cuatro modelos experimentales de inflamación: edema inducido por ácido araquidónico (AA) en la oreja del ratón, colitis inducida por ácido acético en el colon de la rata, choque endotóxico inducido por lipopolisacárido (LPS) en ratones y artritis inducida por zimosán en ratones (modelo subcrónico). En los modelos agudos la Fc se administró en dosis de 50 a 300 mg/kg una hora antes de la inducción del daño. En el modelo subcrónico los animales la recibieron en dosis diarias (25, 50 y 100 mg/kg) durante 8 d, después de la implantación de la artritis en la articulación de la rodilla del ratón. En dichos modelos el efecto anti-inflamatorio de la Fc se evaluó a través de diferentes indicadores tales como: la cantidad de prostaglandina E_2 (PGE_2), leucotrieno B_4 (LTB_4) y actividad mieloperoxidasa (MPO) detectados en homogenado de tejido, las concentraciones del factor de necrosis tumoral- α (FNT- α) y de nitritos en el suero sanguíneo, así como el análisis histológico y ultraestructural del tejido dañado.

Los resultados demostraron que la Fc purificada, a concentraciones relativamente bajas (1 a 30 $\mu\text{mol/L}$), atrapa radicales alcoxilo ($\text{Cl}_{50} = 2 \mu\text{mol/L}$) e hidroxilo ($\text{Cl}_{50} = 24,7 \mu\text{mol/L}$) siendo la velocidad de reacción con éstos últimos de $3,5 \cdot 10^{11} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{S}^{-1}$ y no presenta efecto sobre los radicales superóxido. A través de mediciones de la velocidad inicial de decoloración de los grupos bilínicos a una $\lambda_{620 \text{ nm}}$, se pudo concluir que estos reaccionan con los radicales peroxílicos a razón de $0,92 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. La constante de velocidad de reacción total entre la Fc y el HOCl fue de $2,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{S}^{-1}$, inferior a la reportada para otros antioxidantes endógenos como el ácido ascórbico, el glutatión y la taurina. La Fc también inhibió la peroxidación lipídica inducida por Fe^{+2} -ascórbico en microsomas de hígado de rata ($\text{Cl}_{50} = 59 \mu\text{mol/L}$) y por los radicales peroxílicos en la membrana de los eritrocitos ($\text{Cl}_{50} = 35 \mu\text{mol/L}$), así como la respuesta quimioluminiscente de células fagocíticas estimuladas con zimosán opsonizado.

La Fc administrada por vía oral en dosis de 25 a 300 mg/kg presentó actividad anti-inflamatoria en los cuatro modelos de inflamación evaluados, la cual se explica al menos en parte, por la inhibición que produce sobre la generación de LTB_4 , PGE_2 , FNT- α y óxido nítrico; efecto que podría estar relacionado con la capacidad antioxidante demostrada para el preparado purificado de Fc.

La tesis consta de 8 capítulos. El primero constituye una introducción general. El segundo presenta una revisión bibliográfica con una detallada y extensa información sobre las diferentes vías de generación de las ERO en los organismos vivos, los mecanismos para su control y la participación que tienen en procesos patológicos como la inflamación. Sobre esta patología se brindan elementos de los diferentes mediadores que participan en ella, así como sobre su abordaje terapéutico actual. El tercero describe los materiales y métodos que se emplearon en el desarrollo del trabajo experimental. El cuarto muestra los resultados de la tesis, el cual incluye 20 figuras y 8 tablas.

Continúa en la página 106.

Tabla 4. Resultados del análisis histopatológico realizado a cortes de tejido renal de ratones tratados con Cisplatino (CDDP), bajo pre-tratamiento realizado con sales de bismuto.

Grupo	Dosis (mg/kg)			Observaciones	Daño (%)
	SBC	NB	CDDP		
1	-	-	-	Tejido normal.	0
2	-	-	10	Abundantes cilindros hialinos en la luz tubular.	100
3	100	-	-	Aislados cilindros en la médula renal.	10
4	500	-	-	Tumefacción granular de las células del epitelio y depósitos amorfos en la luz.	15
5	1 000	-	-	Tumefacción granular de las células del epitelio y depósitos amorfos en la luz.	15
6	100	-	10	Presencia moderada de cilindros.	50*
7	500	-	10	Cilindros aislados.	30*
8	1 000	-	10	No se observan cilindros o aparece alguno aislado.	20*
9	-	40	10	No se observan cilindros o aparece alguno aislado.	20*

* p < 0,05 Diferencias significativas respecto al grupo sólo tratado con CDDP

3. Meyer K.B., Madias N.E. Cisplatin Nephrotoxicity. *Miner. Electrolyte Metab.*, 20, 201, 1994.

4. Comelison T.L., Reed E. Nephrotoxicity and hydration management for Cisplatin, carboplatin and ormaplatin. *Gynecol. Oncol.*, 50, 147, 1993.

5. Schaeppli U., Heyman I.A., Fleischman R.W. Cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119-875): Preclinical toxicologic evaluation of intravenous injection in dogs, monkeys and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 25, 230, 1973.

6. Litterst C.L., LeRoy A.F., Guarino A.M. Disposition and distribution of platinum following parenteral administration of cis-Dichlorodiammineplatinum (II) to animals. *Cancer Treat. Rep.*, 63, 1485, 1979.

7. Abdel Gayoum A.A., El Jenjan K.B., Ghwarsha K.A. Hyperlipidaemia in cisplatin induced nephrotic rats. *Human Experimental Toxicology*, 18, 454, 1999.

8. Aull J.L., Allen R.L., Bapat A.R., Daron H.H., Friedman M.E., Wilson J.F. The effects of platinum complexes on seven enzymes. *Biochem. Biophys. Acta*, 571, 352, 1979.

9. Imura N., Naganuma A., Satoh M., Chen J.T. Trace elements as useful

tools for cancer chemotherapy. In *Human Health and Disease*. Alan R. Liss Editions. New York, 443, 1988.

10. Prasad A.S. Role of metallothionein in human health. *J. Lab. Clin. Med.*, 120, 357, 1992.

11. Satoh M., Aoki Y., Tohyama C. Protective role of metallothionein in renal toxicity of cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 40, 358, 1997.

12. Kondo Y., Satoh M., Imura N., Akimoto M. Tissue-specific induction of metallothionein by bismuth as a promising protocol for chemotherapy with repeated administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) against bladder tumor. *Anticancer Res.*, 12, 2303, 1992.

13. Naganuma A., Satoh M., Imura N. Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice. *Cancer Res.*, 47, 983, 1987.

14. Castillo J. et al. Procedimiento de obtención de subcitrate de bismuto coloidal, Cuba, Pat. No. 22 097, 1992.

15. Samada M., Gonzalez J., Velasco C., Alfonso C., Castillo J. Three treatment schemes with colloidal bismuth

subcitrate (Q-ULCER) in peptic ulcer with *Helicobacter pylori*. *Arch. Med. Res.*, 30, 1, 55, 1999

16. Wieriks J., Hespe W., Jaitly K.D., Koekkoek P.H., Lavy V. Pharmacological properties of Colloidal Bismuth Subcitrate (CBS, De-Nol). *Scand. J. Gastroenterol.*, 17, 11, 1982.

17. Centro de Química Farmacéutica. Monografía subcitrate de bismuto coloidal. Ciudad de La Habana, 1, 1993.

18. Fawcett J.K., Sett J.E. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Path.*, 13, 156, 1960.

19. Bartels H., Böhrer M., Heirli C. Serum kreatininbestimmung ohne enteissen. *Clin. Chim. Acta*, 37, 193, 1972.

20. Mizushima Y., Sassa K., Hamazaki T., Fujishita T., Oosaki R., Kobayashi M. Diuretic response to cyclophosphamide in rats bearing a matrix metalloproteinase-9-producing tumor. *Br. J. Cancer*, 78, 1030, 1998.

21. Sigarrosa A. Biometría y Diseño Experimental. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana, 78, 1985.

22. Kondo Y., Satoh M., Imura N., Akimoto M. Effect of bismuth nitrate given in combination with cis-diamminedichloroplatinum (II) on the antitumor activity and renal toxicity of the latter in nude mice inoculated with human bladder tumor. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 29, 19, 1991.

23. Zhong Y. Protective effect of Bismuth Nitrate pretreatment on cisplatin nephrotoxicity. *Chinese Journal Pharmacol. Toxicol.*, 6, 281, 1992.

24. Basinger M.A., Jones M.M., Gilbreath S.G.I.V., Walker E., Fody E.P., Mayhue M.A. Dithiocarbamate-induced biliary platinum excretion and the control of cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89, 279, 1989.

25. Basinger M.A., Jones M.M., Holscher M.A. L-Methionine suppresses pathological sequelae of cisplatin in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14, 568, 1990.

26. Arús L., Delgado R., Handal E., Prieto S., Juan A. Castillo. Protección del subcitrate de bismuto coloidal sobre la nefrotoxicidad inducida por Cisplatino en ratas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 32, 19, 2001.

Continuación de la página 102.

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTI-INFLAMATORIAS DE LA FICOCIANINA, PIGMENTO MAYORITARIO DE LA *Spirulina (Arthospira) máxima* . . .

En el quinto capítulo se discuten los resultados del trabajo. El sexto presenta las conclusiones y recomendaciones. El séptimo contiene 213 referencias bibliográficas y el octavo es un apéndice con todas las abreviaturas utilizadas en la tesis.

La novedad del trabajo radica en el descubrimiento de que la Fc presenta propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias no descritas con anterioridad, sentando las pautas para la evaluación de este producto natural en el tratamiento de determinadas patologías, además de aportar un valor agregado a la *Spirulina* como suplemento nutricional.

El aporte social radica, en que se perfila para un suplemento nutricional de producción nacional, así como para uno de sus componentes, un nuevo uso en el tratamiento y la prevención de patologías asociadas al estrés oxidativo y la inflamación.