



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE

BIOTECNOLOGÍA – BIOLOGÍA VEGETAL

***Efectos citotóxicos sobre células tumorales de la
Ficocianina extraída de microalgas***

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor/a: Raquel Gandía Almorox

Tutor/a: Carmen Ramírez Castillejo

Marzo de 2021

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	vi
1.1	Generalidades de microalgas.....	vi
1.1.1.	Composición bioquímica de las microalgas.....	vi
1.2	C-Ficocianina	vii
1.3	Propiedades	viii
1.4	Producción, extracción y purificación.....	x
1.5	Industria y comercio	xii
1.6	Cáncer y ficocianina	xiv
2	HIPÓTESIS	xv
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	xvi
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	xvi
4.1	Extracción y purificación de C-PC	xvi
4.2	Métodos de procedimiento experimental.....	xxii
4.3	Análisis de mecanismos de acción y efectos secundarios	xxii
4.4	Perspectiva de futuro	xxviii
4.4.1	Cultivo recombinante:.....	xxviii
4.4.2	Combinación con otros medicamentos:	xxviii
4.4.3	Combinación con Terapia Fotodinámica.....	xxviii
4.5	Propiedad intelectual.....	xxix
5	CONCLUSIONES.....	xxx
	REFERENCIAS	xxxi

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura tridimensional de la Ficocianina, representación esquemática del ficobilisoma y organización celular de una cianobacteria (VIII)

Figura 2: Esquema del proceso de producción, extracción y purificación de la C-Ficocianina (XVII)

Figura 3: Esquema del ciclo celular y su regulación (XXIII)

Figura 4: Regulación de la expresión de MDR1 por C-PC (XXVII)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición bioquímica en porcentaje en peso seco de las especies más cultivadas de microalgas (VII)

Tabla 2: Mecanismos de acción antioxidante de la ficocianina y ficocianobilina (IX)

Tabla 3: Métodos de producción de C-PC según la especie de microalga (XI)

Tabla 4: Producción en toneladas en peso seco de las especies más cultivadas de microalgas (XII)

Tabla 5: Empresas dedicadas al comercio de C-Ficocianina (XIV)

Tabla 6: Distintos métodos de extracción, estado físico de la biomasa de partida y principales características de estos (XIX)

Tabla 7: Rendimientos en miligramos de C-Ficocianina por gramo de biomasa en peso seco obtenidos con distintos métodos de extracción (XX)

Tabla 8: Métodos de purificación y grado de pureza (XXI)

LISTADO DE ABREVIATURAS:

AAPH: Dihidruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AP: Proteína activadora

APC: Aloficocianina

COX: Ciclooxygenasa

C-PC: C-Ficocianina

DHA: Ácido docosahexaenoico

FISH: Hibridación fluorescente in situ

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

MAPKs: Proteína quinasa activadas por mitógeno

MDR: Resistencia a múltiples drogas

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa

ONOO⁻: Peroxinitrito

PBP: Ficobiliproteína

PCB: Ficocianobilina

PDT: Terapia fotodinámica

PE: Ficoeritrina

PGE: Prostaglandina

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TNF: Factor de necrosis tumoral

ABSTRACT

Microalgae have been used as food by different populations for years, now it is the scientific community who puts the focus on them. One microalga in particular, the cyanobacterium *Arthrospira* is the fundamental component of spirulina food, used as a dietary supplement in many countries. C-PC is one of the proteins that constitute it, it is a complementary photosynthetic pigment for cyanobacteria. In the study of its properties, they have discovered that it has an antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, neuroprotective effect, and being the subject of this review, anticancer effect.

To obtain a global vision of this protein, the characteristics of its culture and the most used extraction and purification methods will first be presented. The industries and companies that are dedicated to the production and trade of phycocyanin or its chromophore group, phycocyanobilin, are also discussed.

The use of C-PC against cancer cell lines is a novelty, numerous studies corroborate its action against cell proliferation and in favour of apoptosis, but the specific mechanisms of action are yet to be discovered. In this review, the results of these experiments are collected and the cell targets which are affected by C-PC are detailed.

Finally, light is shed upon the future possibilities that a compound such as C-Phycocyanin promises to bring, which is why it is encouraged to continue research in that direction.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de microalgas

Las microalgas son microorganismos acuáticos fotosintéticos que según su género se pueden encontrar de forma filamentosa, unicelular o en colonia¹. Su origen evolutivo no coincide en un antepasado en común, sino más bien corresponden a un grupo polifilético, proveniente de una amplia variedad taxonómica. Esto las hace ser muy diversas, encontrándose microalgas procariotas, cómo lo son las cianobacterias y el reino monera, y eucariotas, como reinos protista y plantae¹. Además, pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica, viviendo de manera libre, endosimbiótica, parásita o de liquen^{1,2}.

El interés por las microalgas se remonta a la antigüedad, ya que en poblaciones de África y América las incluían en su dieta diaria por su alto contenido proteico¹. Posteriormente su uso se ha ampliado a la industria alimentaria, promoviendo su utilización, no solo gracias a su acción colorante de manera natural, sino también a su alto contenido proteico y lipídico en ácidos grasos insaturados³.

Actualmente existen empresas e industrias que tienen como finalidad el estudio y aprovechamiento de las microalgas², principalmente cosmética, farmacológica, biodiesel, acuícola y biomédica. En estas estudian la posibilidad de su cultivo a escala industrial, gracias a que se ha visto la producción de metabolitos secundarios y de biomasa como un recurso de alto rendimiento³.

Su reciente éxito radica en la facilidad de cultivo, obteniendo una gran diversidad y cantidad de metabolitos en poco tiempo, sin estar condicionado a una época del año obteniendo rendimientos constantes. Sus requerimientos de crecimiento son muy sencillos: luz, una fuente de carbono basada en azúcares, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio, ya sea en sistemas abiertos o cerrados. Estas características conducen a una conclusión clara, su capacidad de uso industrial³.

1.1.1. Composición bioquímica de las microalgas

La composición bioquímica de las microalgas depende de la especie, sin embargo, también se encuentran diferencias entre las mismas, esto difiere según sus condiciones de cultivo, como lo son pH, salinidad o exposición a la luz. Aun así, estas se destacan por su alto contenido proteico que puede superar el 50% del peso en seco superando a alimentos como lo son el huevo o la soja⁴. Las microalgas son capaces de sintetizar una gran cantidad de aminoácidos. Son también

una fuente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido docosaheptaenoico (DHA) o los ácidos omega 3 y 6, y de vitaminas como la A, B1, B2, B12, C, E, ácido fólico o biotina ^{4,5}. En la siguiente tabla se muestra el valor nutricional de las principales microalgas cultivadas.

Tabla 1. Composición bioquímica en porcentaje en peso seco de las especies más cultivadas de microalgas ⁵

ESPECIE	PROTEÍNAS	HIDRATOS DE CARBONO	LÍPIDOS
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7

1.2 C-Ficocianina

Un compuesto característico de las microalgas que ha llamado la atención de la comunidad científica por sus potenciales características es la C-Ficocianina (C-PC). Esta corresponde a un tipo de proteínas caracterizadas por estar compuestas de dos cadenas aminoacídicas simples, grupos prostéticos que se encuentran unidos a los residuos de cisteína propios de la apoproteína por un grupo sulfhidro ⁶. Este grupo de proteínas es denominado ficobiliproteína (PBP), y son encontradas en la mayor parte de algas verdeazuladas ⁷. Las ficobiliproteínas son proteínas coloras, autofluorescentes y solubles en agua, clasificadas según su espectro de absorción en cuatro grandes grupos: ficoeritrinas, ficocianinas, ficoeritrocianinas y aloficocianinas ⁸. En el caso de la C-PC (ficocianobilina, PCB), es una bilina con anillos de tetrapirrol lineales abiertos, y forma el mencionado enlace tioeter (sulfhidro) ⁹.

Distintos tipos de ficobiliproteínas interaccionan entre sí, formando estructuras complejas que se encuentra en la membrana de los tilacoides y se encarga de la absorción de luz para el aparato fotosintético, denominadas ficobilisomas ⁸ (ver figura 1). Las C-PC son las más abundantes de las PBP en el ficobilisoma, son de color azul y con un espectro de absorción que va de 610 a 620 nm, sin embargo, también encontramos otros componentes como la aloficocianina (APC) de color azul-verde y con espectro de absorción de 650 a 665 nm y la ficoeritrina (PE) de color rosado y

con absorbancia de 540 a 570 nm ⁷. Sus estructuras son muy estables, aunque pueden maximizar su absorción debido a cambios de pH, luz o temperatura, y cabe destacar que a diferencia de otros pigmentos fotosintéticos no poseen un átomo de metal en su estructura ⁸. La disposición geométrica de estos pigmentos alrededor del ficobilisoma les permite crear una cadena de transferencia de energía entre ellos hasta llegar a la clorofila otorgándoles la capacidad de realizar la fotosíntesis en profundidades donde la clorofila no sería capaz de absorber luz ^{10,11}.

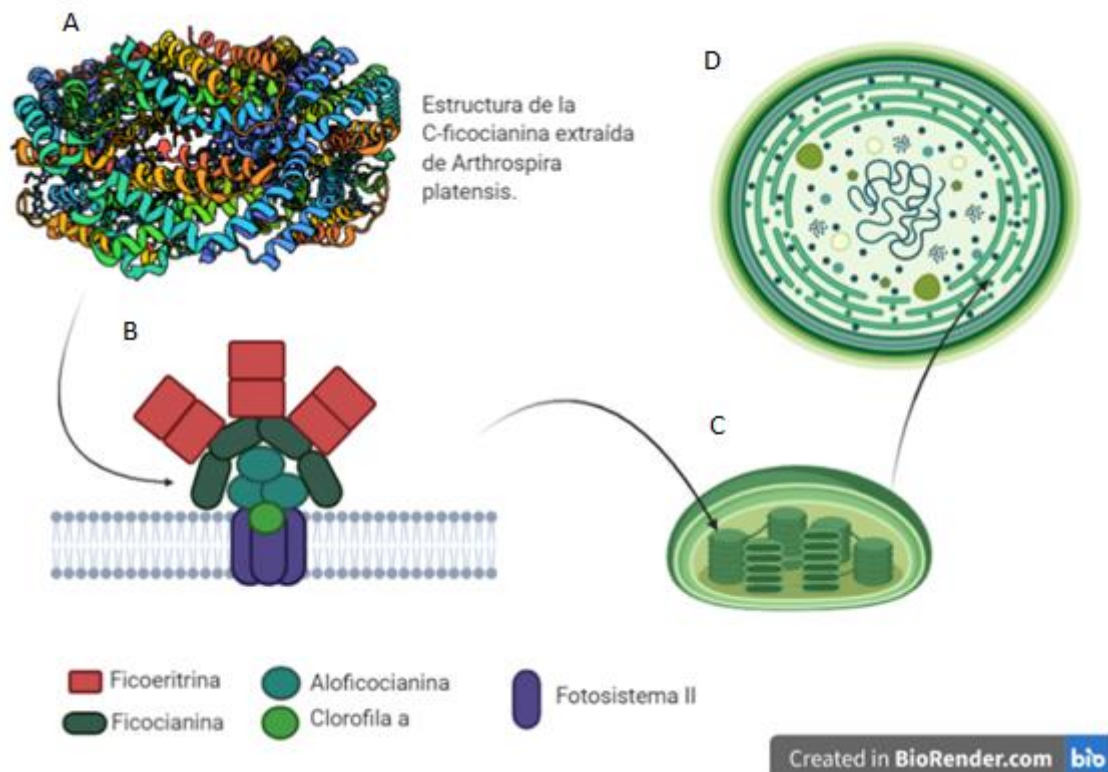


Figura 1. Estructura tridimensional de la C-Ficocianina (PDB ID 1GH0) extraída de *Arthrospira platensis* (A); Conformación del ficobilisoma a partir de las distintas ficobiliproteínas: ficoeritrina y aloficocianina (B); Pigmentos antena alrededor de la clorofila en el fotosistema II, que a su vez se encuentra en la membrana de los tilacoides dentro del cloroplasto (C). Representación de la organización celular de una cianobacteria (D). Figurada generada en Biorender.com

1.3 Propiedades

El interés que ha despertado recientemente la ficocianina y su grupo cromóforo se explica por los múltiples efectos terapéuticos que se han demostrado.

A continuación, se comentan los más estudiados:

- Efecto antioxidante: Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producen un daño oxidativo en las células que puede afectar diversos componentes de esta, como son la membrana, proteínas o incluso el ADN, y puede acarrear enfermedades cardiovasculares, degenerativas o diabetes entre otras ⁶. La manera de combatirlo es a través de mecanismos antioxidantes, pudiendo ser enzimáticamente o no. La C-PC actúa no enzimáticamente a través de la captación de radicales libres de oxígeno. Cabe destacar su similitud estructural con la bilirrubina, el componente antioxidante celular por excelencia ⁸. También se ha demostrado su efecto antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* ¹², los mecanismos de acción se agrupan en la siguiente tabla:

Tabla 2. Mecanismos de acción antioxidante de la ficocianina y ficocianobilina

COMPUESTO BIOACTIVO	ORGANISMO PRODUCTOR	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIA
Ficocianobilina (PCB)	Arthrospira platensis	Elimina radicales libres de AAPH*	¹³
		Inhibición de la degradación de DNA mediada por ONOO**	¹²
	Arthrospira sp.	Inhibición parcial de la NADPH oxidasa	¹⁴
Ficocianina	Arthrospira sp.	Eliminación de radicales libres	^{15,16}

Tabla 2: AAPH*: Dihidruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano). ONOO⁻** : Peroxinitrito. Las distintas moléculas conocidas como radicales libres sobre los que la ficocianina actúa son: radical hidroxil (OH), radical peroxil (ROO), radical aloxil (RO), anión superóxido (O₂⁻), ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ¹⁷

- Efecto antiinflamatorio e inmunomodulador: Numerosos estudios muestran como la C-ficocianina actúa sobre distintos componentes de la respuesta inflamatoria, por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Nemoto-Kawamura ¹⁸ observaron como aumentaba los niveles de inmunoglobulina A (IgA) y disminuía los de inmunoglobulina E (IgE) lo que se traduce en promover la tolerancia frente a la reacción alérgica. Otros estudios han demostrado que se inhibe la liberación de histamina por los mastocitos y

citoquinas proinflamatorias como TNF- α , isoleucina-6 entre otras ⁷. Además, disminuye la permeabilidad vascular inhibiendo el proceso de inflamación general al inhibir la activación del factor de transcripción nuclear kappa (NF- κ β) que regula genes determinantes en el proceso inflamatorio y bloquea la cascada de señales de las protein-kinasas actividades por mitógeno (MAPKs), también se ha demostrado que es un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima involucrada tanto en procesos inflamatorios como cancerígenos ^{7,8,19}.

- Efecto anticancerígeno: Se ha demostrado que la C-ficocianina posee distintas dianas de acción que ayudarían en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades oncológicas como son: cáncer de mama, hígado, pulmón, colon y leucemia ²⁰. Esta revisión se va centra en la propiedad anticancerígena de la C-ficocianina, por lo que se profundizará en ella más adelante.
- Propiedad fluorescente: Al desintegrarse del ficobilisoma cuando son extraídas, las ficobiliproteínas adquieren una propiedad fluorescente que comparada a otros fluoróforos poseen un alto coeficiente de extinción molar. Se utiliza conjugadas con inmunoglobulinas, proteína A o avidina para microscopía fluorescente, etiquetado de proteínas, anticuerpos y ácidos nucleicos, como marcador en geles de electroforesis, en inmunoensayos o en la hibridación fluorescente in situ (FISH) ^{9,17}.
- Otros efectos: Con la combinación de los efectos antes descritos se ha visto que el tratamiento con C-ficocianina puede tener efectos hepato y neuro protectores, antidiabético, antimicrobial, entre otros ^{8,10}.

1.4 Producción, extracción y purificación

Entre las especies que se cultivan para la extracción de C-ficocianina destaca *Arthrospira platensis* aunque también se utilizan otras cianobacterias como las especies del género *Anabaena* ¹¹ o rodofitas (algas rojas), siendo *Galdieria sulphuraria* uno de los ejemplos más estudiados ²¹. En función de la especie elegida se utilizará un método u otro de producción. En la siguiente tabla se resumen los más comunes:

Tabla 3. Métodos de producción de C-ficocianina según especie de microalga ¹¹

MÉTODO DE PRODUCCIÓN	CARACTERÍSTICAS	ESPECIE	REFERENCIAS
Fotoautótrofa	<ul style="list-style-type: none"> - Estanques abiertos (open ponds o raceways) en el exterior -Factor limitante: cantidad de luz solar -Desventajas: posibles contaminaciones 	<i>Arthrospira platensis</i>	22-25
Heterótrofa	<ul style="list-style-type: none"> -Estanques cerrados en el interior -Factor limitante: fuente de carbono, nitrógeno suministrada -Desventajas: bajo crecimiento y contenido de pigmentos para <i>Arthrospira platensis</i>. 	<i>Galdieria sulphuraria</i>	26-29
Mixótrofa	<ul style="list-style-type: none"> -Estanques cerrados en el exterior -Ventajas y desventajas del crecimiento foto y heterótrofo -Mejores valores de crecimiento que en estanques abiertos 	<i>Arthrospira platensis</i>	30,31

Al igual que cualquier otro cultivo su crecimiento va a depender de factores bióticos (bacterias, virus y otros competidores) y abióticos (luz, temperatura, salinidad, pH, concentración de nutrientes del medio) y aunque se trata de microorganismos con gran capacidad de adaptación dependiendo del fin del cultivo interesarán unas condiciones u otras ⁸. En general para la obtención de C-PC desde *Arthrospira* se utilizan los fotobiorreactores abiertos sin control de temperatura, pero con control de pH (con la adición de bicarbonato o dióxido de carbono) para inhibir el crecimiento de otros competidores, con estas condiciones el contenido de C-PC llega al 14% de las proteínas totales. Para mejorar este dato ya existen estudios que modificando estos factores abióticos han conseguido aumentarlo ⁹.

En cuanto a la extracción de la C-PC hay que destacar la complejidad que supone el pequeño tamaño de las células de estos microorganismos añadido a la resistencia que posee su pared

celular. Existen métodos mecánicos, químicos y enzimáticos que se combinan de distinta forma en función del grado de purificación que se requiera ⁸.

El grado de purificación de la C-PC se calcula con el ratio de absorbancia de la C-PC a 620 nanómetros y el resto de los aminoácidos aromáticos de las proteínas totales a 280 nanómetros. Así se ha estipulado que un ratio mayor de 0,7 se considera aceptable como suplemento alimenticio. A partir de un ratio de 3,9 se considera aceptable como agente reactivo y por encima de 4 se acepta para su uso como compuesto analítico ^{11,17}.

1.5 Industria y comercio

Desde la década de los 50 se comenzaron a cultivar algas y microalgas de forma industrial. Un cultivo impulsado por la industria alimentaria debido a su alto contenido proteico, tanto para consumo humano como para piensos animales. Años después fue la industria del combustible la que siguió impulsando su cultivo para llegar a la década de los 80 con una producción (mayormente asiática) de una tonelada. Entre los géneros más cultivados y comercializados se encuentran *Arthrospira*, *Chlorella* o *Dunaliella*. En la tabla 4 se muestra la producción en el año 2006. Durante los siguientes años el cultivo de estos microorganismos comenzó a utilizarse también en otras industrias, aparte de comercializar la biomasa otras industrias vieron el alto valor que podían tener compuestos producidos por las microalgas como pueden ser los carotenoides, los ácidos grasos polinsaturados, las ficobiliproteínas o la astaxantina ¹.

Tabla 4. Producción en toneladas en peso seco de las especies más cultivadas de microalgas ^{1,5}

MICROALGA CULTIVADA	PRODUCCIÓN ANUAL EN PESO EN SECO	PAÍSES PRODUCTORES	APLICACIÓN Y PRODUCTOS	REFERENCIA
<i>Arthrospira</i>	3000 ton	China, India, EE. UU., Myanmar, Japón	Nutrición, cosméticos, ficobiliproteínas	¹
<i>Chlorella</i>	2000 ton	Taiwán, Alemania, Japón	Nutrición, acuicultura, cosméticos	¹
<i>Dunaliella salina</i>	1200 ton	Australia, Israel, EE. UU., China	Nutrición, cosméticos, betacarotenos.	¹

La primera compañía en comercializar la ficocianina fue la japonesa DIC Corporation, bajo el nombre de Linablu® pero no es hasta el año 2013 cuando se autoriza su uso como colorante alimenticio por la FDA (Food and Drug Administration) estadounidense ⁸ , , además, en un momento en el que la búsqueda de recursos naturales que puedan sustituir a productos sintéticos se convierte en una demanda social siendo la ficocianina y su grupo cromóforo (ficocianobilina) una alternativa viable ⁹. En 2014 se aprueba su uso en la Unión Europea y desde este momento se establece como uno de los principales colorantes azules en la industria alimentaria, estando presente en multitud de productos y sin la necesidad del etiquetado E- ¹⁰. Actualmente la producción de biomasa de microalgas se sitúa en 5000 toneladas al año, generando una facturación en dólares de $1,25 \times 10^9$ ³², sin embargo, la producción y comercialización de las ficobiliproteínas en general se encuentra lejos de estas cifras, su precio va a depender del grado de purificación que se le haya aplicado. Se puede obtener desde los 3 a 25 dólares por milígramo cuando el pigmento se encuentra en su forma nativa hasta los 1500 dólares por milígramo cuando se conjuga con otras moléculas ⁵.

Existen multitud de empresas centradas en el cultivo de microalgas para la comercialización de biomasa o de productos obtenidos a partir de ellas como son:

- Binmeibio: empresa china especializada en la producción de ficocianina extraída de *Arthrospira platensis*.
- Algaenergy: empresa española dedicada al cultivo de microalgas y productos derivados de ellas.
- Pharmamar: empresa centrada en la oncología y su tratamiento a través de productos marinos, esta empresa española cotiza en bolsa.
- Solazyme: líder en el uso de microalgas como combustible. Estadounidense.

Además, en la siguiente tabla se detallan las que comercializan con la C-ficocianina.

Tabla 5. Empresas dedicadas al comercio de C-ficocianina⁹

EMPRESA	PRODUCTO	APLICACIONES	PAÍS	REFERENCIA
DIC (Dainippon Ink and Chemicals)	Linablue®	Colorante alimenticio	Japón	33
Japan Algae Co, Ltd.	Pigmento espirulina	Colorante alimenticio	Japón	34
ProZyme, Inc	PhycoPro™	Ensayos inmunológicos, fluorescentes, etiquetas para la clasificación de células, marcadores en electroforesis en gel, cromatografía	EE. UU.	35
Norland Biotech	Ficocianina natural	Colorante alimenticio, cosméticos, grado de purificación válido para análisis	China	36
Hash Biotech Labs	C-Ficocianina	Microscopía de fluorescencia, FISH, FACS, FCS, etiquetado de proteínas, anticuerpos y ácidos nucleicos.	India	37

1.6 Cáncer y ficocianina

La farmacognosia y la aplicación medicinal de las sustancias naturales llega también al mundo de la ficocianina, y en particular en las enfermedades neoplásicas que tanto han proliferado en las sociedades envejecidas del primer mundo. El cáncer es actualmente una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, siendo el 30% de estas debido a factores de riesgo de carácter comportamental y/o alimentarios como falta de actividad física, consumo alcohol y/o de tabaco, sobrepeso... Los tipos de cáncer con más mortalidad son el de pulmón, hígado, estómago, colon y mama³⁸.

El cáncer se caracteriza por una proliferación descontrolada de las células, existen dos tipos de genes que regulan esta proliferación: los protooncogenes y los genes supresores de tumores, cuando sufren una mutación los protooncogenes reciben el nombre de oncogenes y motivan esta proliferación celular, los genes supresores de tumores mutados son incapaces de bloquear el crecimiento celular³⁹.

En los últimos años, la heterogeneidad tumoral ha resultado ser el verdadero caballo de batalla de la oncología, siendo las poblaciones de lenta división y con autorrenovación las células más implicadas en la resistencia de los tumores a quimioterapia y en las metástasis. Son las células iniciadoras de tumores o células madre tumorales, estas células tienen la capacidad de invadir el torrente sanguíneo y extravasarse en otro órgano, tras una fase de adaptación al microambiente tisular puede generar un nuevo tumor ⁴⁰.

Ante esta situación distintos tratamientos vienen utilizándose para curar esta enfermedad, o al menos limitar su expansión. La cirugía, la radioterapia o la quimioterapia son los métodos convencionales, pero no siempre funcionan o son viables para todos los pacientes ⁷. La **quimioterapia** es hoy en día el más utilizado, distintos medicamentos se aplican para frenar el ciclo celular en las células cancerosas atacando directamente el ADN o proteínas implicadas en su división. El problema es la baja especificidad contra las células cancerosas, esto provoca que células sanas también se vean afectadas por el tratamiento ⁴¹.

Además, las células cancerosas pueden presentar resistencia a la quimioterapia: el llamado fenotipo MDR (Multi-drug resistance) por sus siglas en inglés es aquel que presenta una sobreexpresión de proteínas de membrana transportadoras cuya función es expulsar sustancias al exterior. Este tipo de fenotipo no solo es capaz de adquirir resistencia al medicamento administrado, sino que reconoce otros medicamentos con estructuras o mecanismos de acción similares dificultando el tratamiento quimioterapéutico, aunque se cambie de medicamento ^{39,41}.

Actualmente hay muchas investigaciones sobre la **inmunoterapia** como tratamiento contra el cáncer. Se define como la estimulación o inhibición del sistema inmune para ayudar al cuerpo en su lucha contra el cáncer y otras enfermedades, se trata un tipo de terapia biológica en la que se utilizan sustancias producidas por organismos vivos para combatir el cáncer ⁴².

2 HIPÓTESIS

En la continua búsqueda de este tipo de sustancias se empieza a estudiar la C-Ficocianina que, como se ha explicado, posee varias propiedades con efectos antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral. En las siguientes páginas se va a tratar de dar una respuesta a la pregunta ¿Funcionaría la ficocianina como tratamiento contra células tumorales o las células iniciadoras de tumor? A través de la revisión de los experimentos llevados a cabo hasta el momento.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

La revisión se ha implementado mediante la búsqueda de artículos científicos proveniente de bases de datos como PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) que contuvieran las palabras clave del tema a tratar, empezando de lo más general con palabras como microalgas y ficobiliproteínas y profundizando después con ficocianina o proteínas implicadas en el desarrollo del cáncer. Para la selección me he centrado en el año de publicación, pensando en que las últimas publicaciones tendrían en cuenta lo ya escrito e investigado sobre este tema.

Además, se ha consultado en páginas web de empresas relacionadas con microalgas y ficocianina que se han añadido a la bibliografía utilizando la herramienta Cuttly.com para acortar la URL.

La bibliografía se generó implementando la base de datos y gestor de bibliografía Mendeley (<https://www.mendeley.com/>) y para la creación de las figuras se utilizó la plataforma de diseño gráfico BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Para la recolección de datos con propiedad intelectual dentro del mercado relacionadas principalmente a patentes de la CPC, se han llevado a cabo mediante las bases de datos de Patentscope (<https://patentscope.wipo.int/>), Espacenet (<https://worldwide.espacenet.com/>) y Depatisnet (<https://www.dpma.de/english/search/depatinet/index.html>).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción y purificación de C-PC

Para los métodos empleados en la extracción y purificación de la C-FC se adjunta un esquema en la figura 2 que resume todo el proceso desde el cultivo de microalgas hasta la caracterización del producto final.



Figura 2. Esquema del proceso de producción, extracción y purificación de la C-Ficocianina ³.

Figurada generada en BioRender.com

La especie que se utiliza para la comercialización de C-FC es la *Arthrospira platensis*, la ventaja que presenta esta especie frente a otras tiene relación con su disponibilidad más que las características de la C-FC que produce, aunque sí hay que destacar que es de los pocos microorganismos que puede crecer de manera fotoautótrofa en estanques abiertos o canales (raceways) sin verse superado por otros microorganismos competidores. Esta característica abarata su cultivo, por lo que se ha elegido frente a otras especies ³⁰.

Como se ha comentado anteriormente *A. platensis* puede crecer de manera fotoautótrofa, heterótrofa o mixótrofa (fotoheterótrofa). En el último caso su tasa de crecimiento va a depender de la luz recibida (fotosíntesis) y de la glucosa administrada (respiración aeróbica) aunque los resultados de crecimiento muestran una tasa mayor ^{26,31} aún no se ha conseguido escalar este modelo de crecimiento de manera industrial, de manera que se sigue trabajando en fotobiorreactores. En esta situación la mejor opción es ajustar los parámetros de temperatura, pH, luz o salinidad, que van a optimizar primero el crecimiento en biomasa y después la acumulación de la C-FC. El medio de cultivo Zarrouk es el que más se repite para el crecimiento de *Arthrospira platensis* en la bibliografía consultada, este medio contiene en (g/L)

NaNO₃, 2.50; K₂HPO₄, 0.50; NaHCO₃, 10.00; NaCl, 1.00; MgSO₄·7 H₂O, 0.2; CaCl₂·2 H₂O, 0.02; FeSO₄·7 H₂O, 0.01. (a veces con modificaciones) ^{26,30}.

Para maximizar la síntesis de C-FC se utilizan intensidades de luz bajas o medias. Se ha visto que el operón con los genes que producen las dos cadenas alfa y beta de la apoproteína está regulado por la intensidad lumínica en *Arthrospira platensis*, lo que concuerda con la función de este pigmento antena, cuando la clorofila no es capaz de excitarse debido a una baja intensidad lumínica las ficobiliproteínas aumentan el rango de absorción y transfieren esa energía hasta el core del fotosistema permitiendo así la fotosíntesis ^{3,30}.

Las cianobacterias poseen una pared celular muy resistente, por ello, la elección del método de extracción más adecuado se relaciona directamente con la máxima recuperación de la C-PC ⁴³. El primer paso es decidir desde que estado físico se va a trabajar, existen métodos para la extracción desde la biomasa seca o húmeda. En la siguiente tabla se resumen las características de algunos de los métodos ³

Tabla 6. Distintos métodos de extracción, estado físico de la biomasa de partida y principales características de estos ³.

METODO DE EXTRACCIÓN	BIOMASA	VENTAJAS	LIMITACIONES	REFERENCIAS
Congelación y descongelación	Seca y húmeda	Simple, rápida, reproducible, libre de materiales corrosivos, no desnaturalizante	No se ha probado a escala industrial	30,44,45
Tratamiento con ultrasonidos	Seca y húmeda	Alto rendimiento a pequeña escala	No se ha probado a escala industrial	43
Precipitación fraccionada con sulfato de amonio	Seca y húmeda	Barata, fiable y fácil. No desnaturalizante.	Utiliza también ultrasonidos de alta frecuencia, lo que dificulta su escalado	46,47
Homogenización de células en mortero	Húmeda	Rápida	Posibles contaminaciones	45
Extracción con ácido orgánico (ácido acético) e inorgánico (ácido clorhídrico)	Húmeda	Extracción directa del pigmento ficocianobilina	Altas concentraciones del ácido pueden causar desnaturalización	45
Extracción con agua	Húmeda	100% Atóxica	Muy lenta	45

En general se prefiere trabajar desde la biomasa húmeda y el método que mejores rendimientos produce es el de congelación (-80°C) y descongelación (25°C) en un solo ciclo y usando agua como solvente ⁴⁸. Trabajar desde biomasa seca supone someterla a altas temperaturas lo que produce una pérdida de la ficocianina en la extracción, se cree que por la sensibilidad de esta proteína a la temperatura y a su posición periférica en el ficobilisoma ^{45,49}. Aunque puede presentar otras ventajas, en el estudio llevado a cabo por Jayant Mahadev Doke Jr ⁴⁴ se concluye que sometiendo la biomasa a 1 hora de secado con aire circulando (25 °C) y su posterior

tratamiento con un tampón de fosfato pH 7, 0.1M, la C-PC se obtiene con mayor pureza con una bajada del rendimiento de entre un 5 y 7 por ciento, a lo que hay que añadir la ventaja de trabajar en seco en cuanto a almacenamiento y transporte ⁴⁴.

Numerosos estudios se han centrado en la optimización del proceso de extracción, en la siguiente tabla se muestran los rendimientos de algunos de ellos, sin embargo, un mejor rendimiento en cuanto a cantidad no significa que la C-ficocianina extraída sea de calidad. Los siguientes pasos de purificación y caracterización son los que van a determinar esta calidad.

Tabla 7. Rendimientos en miligramos de C-Ficocianina por gramo de biomasa en peso seco obtenidos con distintos métodos de extracción.

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	BIOMASA	PRODUCTIVIDAD (mg C-PC/ g ps)	REFERENCIA
Ultrasonidos con perlas de vidrio	Húmeda	43.75	43
Secado con aire circulando + tampón fosfato	Seca	80	44
Congelación / Descongelación	Húmeda	172.84	48
Ultrasonidos	Congelada	99.75	49

Para la purificación el método con mejores resultados es la cromatografía de intercambio iónico. La base teórica de este método es utilizar la diferencia de fuerza iónica entre un compuesto, en este caso la C-Ficocianina y un solvente resultando en su unión, después revertir el pH para obtener el compuesto puro. Este método puede combinarse con otros métodos para garantizar una purificación mayor ⁵⁰.

En la siguiente tabla se muestran los grados de purificación alcanzados utilizando la cromatografía de intercambio iónico combinada con tratamientos previos.

Tabla 8. Métodos de purificación y grado de pureza

TRATAMIENTO	PUREZA PREVIA AL TRATAMIENTO	PUREZA ALCANZADA	RENDIMIENTO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
Cromatografía de intercambio iónico en un solo paso	0.75	4.58	14%	Precipitación con sulfato de amonio (65%)	51
Cromatografía de intercambio iónico con dos pasos de precipitación previa	0.99	4.33	33%	Precipitación con sulfato de amonio (40%)	52
Cromatografía de intercambio iónico con dos pasos de precipitación previa	0.80	4.42	45.6%	Precipitación fraccionada en dos pasos con sulfato de amonio (25% y 50%)	53
ATPE + Cromatografía de intercambio iónico	1.18	Tras ATPE: 5.22 Tras CII: 6.69	Tras ATPE: 66% Tras CII: No hay datos	ATPE: Sistema de dos fases acuosas	54

Pureza calculada con el ratio A620/A280 excepto en el estudio realizado por Chun-Yen Chen⁵⁰ que la absorbancia utilizada fue de 620 nm.

Estos métodos resultan en grados de pureza mayores de 4, su uso como compuesto analítico queda garantizado. Para conseguir grados de pureza suficientes para el uso alimentario no son necesarios tantos pasos en la purificación pudiendo alcanzarse tras la precipitación con sulfato de amonio⁵⁵.

4.2 Métodos de procedimiento experimental

Para comprobar si C-PC tiene efectos citotóxicos sobre células tumorales se han elegido los siguientes tipos de cáncer y líneas celulares:

- Leucemia mieloide crónica: afecta a las células mieloides (productoras de células sanguíneas en la médula ósea, donde crecen, se dividen y pueden extenderse por el torrente sanguíneo ⁵⁶. La línea celular con la que se ha experimentado es la K562, perteneciente a un paciente con leucemia crónica mieloide ⁵⁷.
- Cáncer colorrectal: se produce en el revestimiento interno del intestino grueso, puede estar localizado solo en el colon o solo en el recto, pero a menudo se propagan de uno a otro ⁵⁸. Las líneas celulares utilizadas fueron: HT-29 se obtuvo de una paciente de 44 años con adenocarcinoma colorrectal ⁵⁹ y COLO 205 de un paciente con metástasis ⁶⁰.
- Cáncer de mama: Afecta al seno casi exclusivamente a mujeres, aunque los hombres pueden padecerlo ⁶¹. Las líneas celulares escogidas fueron la MCF-7 que se obtuvo de una paciente de 69 años con metástasis ^{62,63} y la MDA-MB-31 ⁶⁴.
- Cáncer de pulmón y línea celular A549, obtenida del tejido epitelial de un paciente con cáncer de pulmón ⁶⁵.
- Cáncer de ovario: Se utilizaron células HeLa, afectadas por un adenocarcinoma en el cuello uterino ⁶⁶, células de ovario de hámster chino y la línea celular humana SKOV3 ⁶⁷.

En cuanto al modo de administración de la C-PC la mayoría de los estudios incubaron las células en presencia de C-Ficocianina obtenida de *Arthrospira platensis* tras una extracción usando ciclos de congelación y descongelación, precipitación con sulfato de amonio y uno o varios pasos de distintas técnicas cromatográficas. En el estudio llevado a cabo por R. Tangham utilizaron C-Ficocianina extraída de otra cianobacteria: *Oscillatoria tenuis* ⁶⁵ y en dos de los experimentos se utilizaron las cadenas alfa ⁶⁰ y beta ⁶⁸ obtenidas de C-Ficocianina recombinante.

4.3 Análisis de mecanismos de acción y efectos secundarios

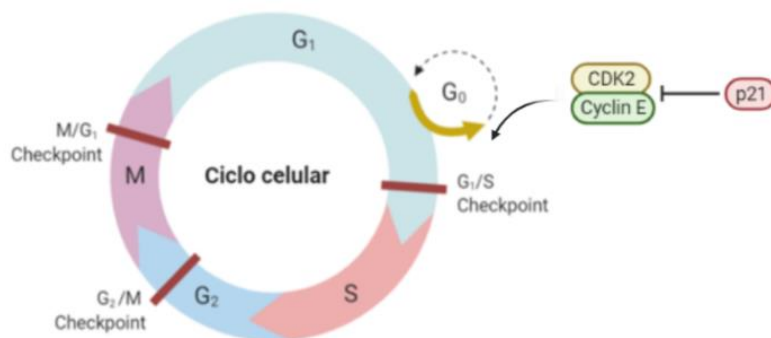
La C-PC se ha estudiado en diversos artículos sobre las líneas celulares antes mencionadas, para tener una visión global de los mecanismos de acción se han agrupado de la siguiente manera:

- Efecto sobre el ciclo celular: Una de las características del cáncer es la división descontrolada de las células, en células normales existen puntos de control (checkpoints) durante el ciclo celular para asegurar que la división sea correcta, estos

puntos de control son unas de las dianas terapéuticas de los medicamentos contra el cáncer ²⁰.

Se ha comprobado que la C-PC posee la capacidad de detener el ciclo celular en el punto G0/G1 en las líneas HT-29, A549, MDA-MB-31 ²⁰ y K562⁵⁷, en el estudio llevado a cabo por R. Thangam ⁶⁵ se contabilizaron el número de células en distintas fases del ciclo celular utilizando la citometría de flujo, tras el tratamiento con C-PC se comprobó que había un incremento de células en fase G1 y un descenso en la fase S (fase de replicación del ADN) y G2, lo que conlleva la detención del ciclo celular y por tanto la proliferación celular ⁶⁵. Otro estudio llevado a cabo por M. Ravi ⁶⁴ corroboró estos resultados sobre la línea MDA-MB-31, además explica esta detención a través de la concentración celular mediante una qPCR (PCR cuantitativa) de tres proteínas reguladoras del ciclo celular: ciclina E, CDK2, y p21. La regulación de estos tres componentes se muestra en la figura 3. Tras la qPCR se vio que los niveles de CDK y ciclina-E descendían mientras que los de p21 ascendían, produciendo así la detención en fase G1 y el impedimento de continuar a fase S ⁶⁴.

Por otro lado J. Ying ⁶⁹ trabajó con la línea celular SKOV3 y observó que la C-PC producía la detención del ciclo celular en el punto de control G2/M, en este punto se comprueba si el ADN está dañado y se impide su paso a la fase de mitosis en tal caso, desencadenando la apoptosis ⁶⁹.



Created in BioRender.com bio

Figura 3. Esquema del ciclo celular y su regulación. Se muestran las proteínas activadoras del ciclo CDK2 y Cilina-E, la proteína inhibitoria p21 y los puntos de control del ciclo celular o checkpoints. Figura generada en BioRender.com

- **Efecto apoptótico:** la apoptosis o muerte celular programada es un proceso activo de auto destrucción que poseen las células, es fundamental que exista un equilibrio entre proliferación y apoptosis para una correcta homeostasis celular, este equilibrio no se da en células tumorales^{66,70}. Este proceso se puede activar por dos vías: por la vía endógena en la que el citocromo c se transloca al citoplasma y activa a las caspasas 3 y 9 y vía exógena en la que un estímulo exterior activa a las caspasas 3 y 8^{20,66}. La activación de la apoptosis produce cambios morfológicos, moleculares y bioquímicos⁵⁷.

La C-PC ha demostrado ser capaz de aumentar los niveles de apoptosis específicamente en células cancerígenas sobre todas las líneas celulares anteriormente mencionadas³⁹, para ello se han estudiado como afectan a distintos componentes de la apoptosis:

Liberación del citocromo c: El citocromo c es una proteína de transporte electrónico que participa en la fosforilación oxidativa, su liberación desde la mitocondria al citoplasma activa a otros factores propapotóticos y forma el apoptosoma junto a la caspasa-9, APAF-1 y dATP⁵⁷ es una de las primeras respuestas de la activación de la apoptosis⁶⁶. Tras la incubación con C-PC se ha visto que las células tumorales activan la liberación del citocromo c en células HeLa⁶⁶, SKOV3⁶⁷, K562⁵⁷, MCF-7⁶², MDA-MB-31⁶⁴, COLO 205⁶⁰.

Activación de caspasas: Las caspasas son una familia de cisteína proteasas encargadas de iniciar o efectuar la respuesta apoptótica, se sintetizan como precursores que se activan como respuesta a un estímulo⁷⁰, la C-PC es capaz de activarlas, en concreto activa a las caspasas 3, 8 y 9 en la línea SKOV3⁶⁷, a la caspasa 9 en la línea MCF-7⁶² y en la línea MDA-MB-31⁶⁴, a las caspasas 2, 3, 4, 6, 8, 9 y 10 en la línea HeLa⁶⁶ y a las caspasas 3 y 9 en la línea COLO-205⁶⁰

Incremento del ratio Bcl2/Bax: Estas dos proteínas pertenecen a la misma familia y están asociadas a la membrana de la mitocondria, el equilibrio entre Bcl2 (proteína antiapoptótica) y Bax (proteína propapotótica) es uno de los factores que regula la supervivencia celular⁵⁷, así pues cuando se reduce la expresión de Bcl2 y/o se incrementa la expresión de Bax la permeabilidad de la membrana mitocondrial aumenta desencadenando la liberación del citocromo c⁷⁰. En la línea K562 tras el tratamiento con C-PC la expresión de Bcl2 descendió, mientras que la de Bax se mantuvo, el equilibrio se desplazó hacia la apoptosis⁵⁷. El mismo patrón de expresión se vio en las líneas HeLa⁶⁶, MCF-7⁶². Por el contrario, en la línea COLO-205 y en la línea SKOV3 se incrementó la expresión de Bax y se mantuvo constante la de Bcl2, de igual manera se favorece la apoptosis^{60,67}. Con la línea MDA-MB-31 se vieron cambios en las dos proteínas, el descenso de Bcl2 y el incremento de Bax⁶⁴.

Fragmentación del ADN: uno de los cambios bioquímicos que experimentan las células en apoptosis es la fragmentación del ADN nuclear mediante endonucleasas en oligómeros de entre 180 y 200 pares de bases ²⁰. Esta característica se observó en las líneas COLO-205 ⁶⁰, K562 ⁵⁷, HeLa ⁶⁶, HT-29 y A549 ⁶⁵. Junto a la fragmentación del ADN ocurren una serie de cambios morfológicos como la condensación de la cromatina (previa a la fragmentación), la formación de burbujas en la membrana y el encogimiento celular ^{20,66}.

- Efecto sobre la metástasis y la progresión tumoral: Una vez el tumor se ha desarrollado se ha estudiado que efecto tiene la C-PC sobre estas células y se ha descubierto que reduce la angiogénesis al reducir los niveles de la prostaglandina E2 ^{20,64}, su síntesis depende de la ciclooxigenasa-2 y la C-PC es capaz de afectar a su actividad:

Inhibición de COX-2: Las ciclooxigenasas son las enzimas que catalizan la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico ¹⁹, se ha visto que la concentración de prostaglandinas es más alta en células cancerígenas y que al bloquear su síntesis se inhibe el crecimiento del tumor ⁷¹. Se conocen dos formas de estas enzimas, la COX-1 que se expresa de forma constitutiva y la COX-2 que lo hace de forma inducible en respuesta a factores de crecimiento, promotores tumorales, oncogenes o mitógenos ¹⁹. La inhibición de COX-2 se consigue mediante los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs por sus siglas en inglés), sin embargo, estos medicamentos también inhiben a COX-1 y las prostaglandinas que forma son necesarias para mantener la integridad de la mucosa epitelial ⁷². La prostaglandina E2 (PGE2) es uno de los productos sintetizados por la COX-2, recientemente se ha visto que se comporta como un mitógeno y se ha relacionado con la angiogénesis tumoral, la formación de nuevos vasos para la supervivencia del tumor ⁶⁴. La PGE2 se relaciona con la E-cadherina, una glucoproteína que media la unión entre células, su inhibición se relaciona con el inicio de la metástasis, cuando se reducen los niveles de PGE2 se incrementan los de E-cadherina, favoreciendo la unión celular y reduciendo las posibilidades de metástasis ⁷³. La COX-2 es una de las enzimas que escapa a la regulación normal en tumores, inhibirla específicamente supondría un avance en el tratamiento del cáncer al impedir que el tumor siga creciendo ⁶⁴.

Estudios recientes caracterizan a la C-PC como un inhibidor selectivo de la COX-2 ^{19,20,39,57} aunque el mecanismo de inhibición no está claro se cree que la apoproteína y no el pigmento de la C-PC podría unirse a la COX-2 haciendo que su estructura se desestabilice y se inactive ^{19,74}.

En el crecimiento tumoral participan citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-2, Interferón- γ y TNF α , a las que la C-PC inhibe gracias al efecto antiinflamatorio antes mencionado, y aumenta los niveles de citoquinas antiinflamatorias como la IL-4. Por otro lado, la C-PC reduce los niveles de HIF-1 (factor inducible por hipoxia), una proteína que ayuda a la supervivencia del tumor aumentando su capacidad de sobrevivir en condiciones de estrés e hipoxia ²⁰.

Por último, la C-PC reduce los niveles de tres proteínas clave para la metástasis y la invasión de nuevos tejidos, son VEGF-A, MMP-2 and MMP-9, la primera es un factor de crecimiento endotelial vascular y las dos últimas pertenecen a una familia de proteasas de la matriz extracelular ⁷⁵.

- Efecto sobre la proteína MDR-1: Existe además una relación entre la COX-2 y la resistencia a otros medicamentos: la expresión de la proteína MDR-1 se induce con PGE2, NF- κ β y AP-1. Por un lado, el tratamiento con C-PC inhibe la formación de PGE2, reduciendo esa vía. Por otro lado, la C-PC también inhibe la translocación de Nf- κ β y AP-1 (proteína activadora-1) al núcleo, impidiendo que induzcan la transcripción del gen ⁷⁶. Además, MDR-1 se ve favorecida con la formación de ROS, especies que la C-PC por su efecto antioxidante neutraliza ^{17,76}. En la Figura 4 se muestra un esquema del proceso. La inhibición selectiva de COX-2 se ha demostrado en las líneas celulares MDA-MB-31 ⁶⁴, en HepG2 (una línea celular humana de cáncer de hígado) ⁷⁶, AK-5 (línea celular obtenida de un tumor histiocítico de rata) ⁷⁷ y en la línea RAW 264.7 (línea celular de macrófagos de ratón) ⁷⁸.

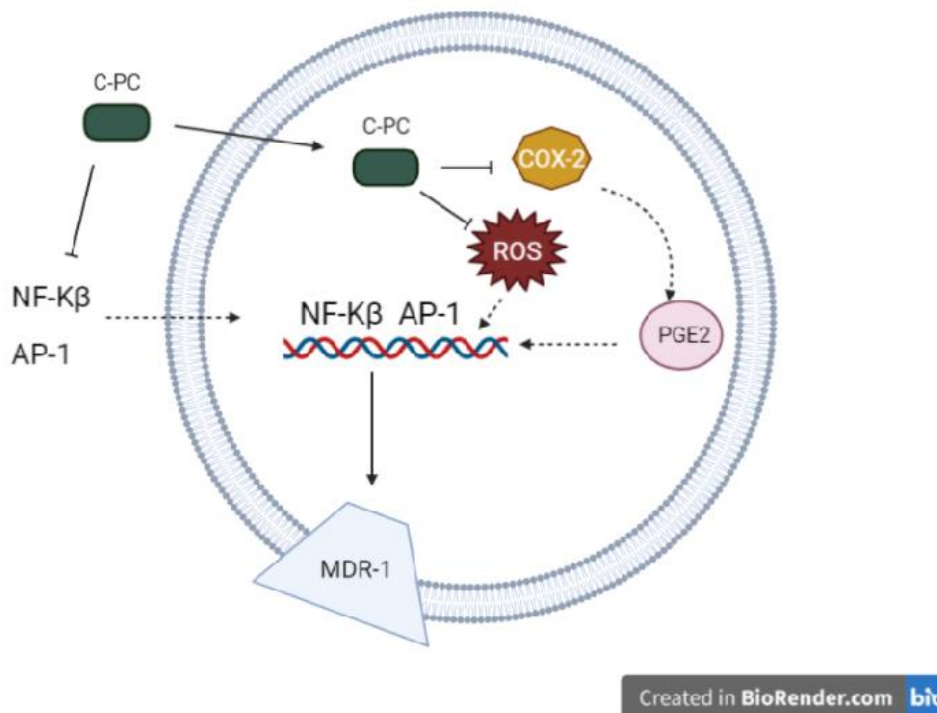


Figura 4: Regulación de la expresión de MDR1 por C-PC. Se muestra como la acción de ROS, PGE2, NF- κ B y AP-1 sobre MDR1 queda inhibida por C-PC. Figura generada en BioRender.com

- **Efectos secundarios y toxicidad:** Dado que el objetivo de esta revisión es proponer el uso de la C-PC como tratamiento contra el cáncer es importante comprobar si supone un riesgo para la viabilidad de las células normales. En los estudios sobre las líneas HeLa, K562 y MCF-7 se examinaron células sanas y la C-PC afectaba en menor medida^{62,68} o no afectaba su proliferación⁶⁶. También se estudió su toxicidad *in vivo* administrando por sonda distintas concentraciones a ratas y no se observó ningún cambio en el peso, los hábitos dietéticos, las células sanguíneas o en parámetros bioquímicos como la transaminasa glutámico-pirúvica o el contenido total de bilirrubina (entre otras). También se administró oralmente a ratones y tampoco se vieron efectos secundarios¹⁰. Caracterizando a la C-PC como una sustancia segura y no tóxica⁷³, aunque se necesitan estudios farmacocinéticos y metabólicos para corroborar la seguridad de su uso como medicamento^{6,10}.

4.4 Perspectiva de futuro

4.4.1 Cultivo recombinante:

Dado que la extracción y purificación de la C-PC presenta dificultades tanto técnicas como económicas la posibilidad de sintetizarla en otro organismo puede suponer una solución. Para ello debe darse la síntesis de las dos cadenas alfa y beta simultáneamente, así como la inserción del grupo cromóforo ³⁰. La mayor ventaja de este método es que gracias a la ingeniería genética una cola de histidinas se pudo insertar para una mejor purificación, se ha conseguido con éxito en la especie *Anabaena* ⁷⁹. También se ha conseguido la expresión de la cadena alfa en *Escherichia coli* ³⁰.

4.4.2 Combinación con otros medicamentos:

En vista de las propiedades que la C-Ficocianina posee la comunidad científica está estudiando su utilización combinada con otros medicamentos:

- Piroxicam: este medicamento antiinflamatorio no esteroideo combinado con la C-PC demostró reducir el tamaño y número de tumores en modelos de rata con cáncer de colon, también redujo la progresión del tumor y los efectos secundarios y la toxicidad del medicamento ^{75,80}.
- ATRA (All-Trans Retinoic Acid): una forma de la vitamina A normalmente utilizado contra el cáncer por sus efectos citotóxicos, su combinación con C-PC sobre la línea A549 resultó en un incremento de la apoptosis sobre estas células ⁸¹
- Topotecan (TPT): un inhibidor de la topoisomerasa I, al combinarlo con la C-PC la expresión de las caspasas 3 y 9 aumentó así como la generación de ROS en una línea celular de cáncer de próstata ⁸²
- Doxorubicina (DOX): antibiótico con efecto antitumoral, inhibe la síntesis de ADN y ARN ⁷³. Es uno de los medicamentos que la proteína MDR1 expulsa del interior celular. Su uso combinado con C-PC permite su acumulación y aumenta la sensibilidad de la línea HepG2 ⁷⁶.

4.4.3 Combinación con Terapia Fotodinámica

Recientemente se ha combinado con la terapia fotodinámica (PDT por sus siglas en inglés), es un tipo de tratamiento contra el cáncer que consiste en inyectar en el torrente sanguíneo una sustancia fotosensible, las células del cuerpo absorben esta sustancia, pero permanece por más tiempo en las células cancerosas. Tras la inyección se expone el tumor al tipo de luz con la longitud de onda específica a la que la sustancia reacciona y forma especies reactivas del oxígeno

provocando el estrés oxidativo en la célula que conlleva la apoptosis, la detención del ciclo celular o la necrosis ⁸³.

B. Li ⁶² aplicó el tratamiento con C-PC combinado con un láser de He-Ne sobre la línea MCF-7 y los resultados obtenidos sobre células tumorales fueron mejores que el tratamiento por separado de la C-PC y el láser: la cascada de señales apoptóticas se potenció, aumentaron los niveles de proteínas pro-apoptóticas como Fas y descendieron los de proteínas anti-apoptóticas como NF-k β y p53, al igual que los niveles del ARNm de CD44 ⁶². En otro estudio sobre la línea MDA-MB-31 S. Bharathiraja ⁸⁴ concluyó que únicamente la C-PC expuesta a la luz (625nm) reacciona generando ROS y produciendo el efecto citotóxico sobre las células cancerígenas, dado que la C-PC se acumula preferentemente en estas células el daño sobre otros tejidos sanos es mínimo ⁸⁴.

La utilización de la C-PC como sustancia fotosensible se estudió in vivo en ratas ⁶² pero aún no se ha llevado a cabo en humanos, sin embargo, presenta muchas ventajas en comparación a otras sustancias utilizadas como son la protoporfirina IX o la clorina e6, estas sustancias son hidrofóbicas lo que dificulta su inyección al formar agregados en soluciones fisiológicas. La C-PC al ser un pigmento natural no tóxico soluble en agua es más fácil de inyectar, además las células sanas son capaces de metabolizarla y eliminarla con facilidad. No obstante, se necesitan más estudios para poder afirmar que la C-PC cumple con los requisitos de ser utilizada como sustancia fotosensible en la terapia fotodinámica contra el cáncer ⁸⁴.

4.5 Propiedad intelectual

Hasta el momento existe una cantidad de 560 patentes relacionadas con el término según el servidor Patentscope, mientras que tras la búsqueda en Espacenet, se han establecido un total de 8.297 resultados, centrándose fundamentalmente en la producción de microalgas y la extracción y purificación de ficocianinas, debido a que, según los parámetros establecidos, se puede lograr un mayor rendimiento, lo que conlleva a una mayor rentabilidad y ganancias en diferentes aspectos para la empresa. Además, existen patentes sobre el diseño de etiquetas fluorescentes para la CPC, lo que demuestra el alto interés comercial de este producto en distintos sectores de la industria.

5 CONCLUSIONES

La C-Ficocianina es un pigmento natural obtenido de distintas especies de microalgas siendo el género *Arthrospira* el mayor representante para su producción. A partir de este género se ha desarrollado el alimento espirulina que lleva años comercializándose gracias a las propiedades nutricionales que se le han atribuido y que se han mostrado en este estudio. Así podemos concluir:

1. Las ficobiliproteínas son proteínas hidrosolubles que forman parte del aparato fotosintético de cianobacterias responsables de parte de estas propiedades nutricionales.
2. La C-Ficocianina, una de estas ficobiliproteínas, tiene gran capacidad antioxidante protege del estrés oxidativo neutralizando especies reactivas del oxígeno o su efecto antiinflamatorio, inactiva o inhibe proteínas implicadas en la inflamación la investigación sobre sus bioactividades ha continuado hacia el tratamiento contra el cáncer.
3. La producción de C-Ficocianina de modo fotoautótrofo es el método clásico de cultivo de cianobacterias, pero en el caso de la C-Ficocianina otros métodos como el cultivo recombinante están apareciendo con fuerza a nivel industrial para su comercialización.
4. También se han observado avances en los métodos de extracción y purificación destacando tratamientos de congelación y descongelación y cromatografía de intercambio iónico posterior. De esta manera se consigue un grado de purificación lo suficientemente alto como para utilizar la C-Ficocianina como agente reactivo. Aunque los elevados costes todavía son un hándicap.
5. La C-PC como tratamiento ha demostrado aumentar la apoptosis y reducir la proliferación celular de distintas líneas celulares cancerígenas *in vitro*. Se ha examinado su papel en la terapia contra la progresión tumoral y la metástasis con buenos resultados y se ha combinado con otros medicamentos que ya se utilizan potenciando su acción.

En conjunto representa una sustancia con un gran potencial terapéutico, sin embargo, se necesitan más estudios para poder afirmar que tiene efectos anticancerígenos y que es potencialmente útil en tratamiento antineoplásicos.

REFERENCIAS

1. Arrieta Bolaños, E. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas [Biotechnologic uses of microalgae]. *Rev Col. Microb Quím Clín Costa Rica* **14**, 8 (2008).
2. Camacho, P. & Flórez-Castillo, J. M. *Microalgas y sus aplicaciones biotecnológicas*. (2020). doi:10.13140/RG.2.2.15543.14247.
3. Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y. & Jing, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal* (2016) doi:10.1016/j.bej.2016.01.025.
4. Galarza, V. O. Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales. *Brazilian J. Food Technol.* (2019) doi:10.1590/1981-6723.04319.
5. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* (2006) doi:10.1263/jbb.101.87.
6. Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Remirez, D. & Rimbau, V. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* (2005) doi:10.2174/1389203033487216.
7. Alfaro-Alfaro, Á. E. *et al.* C-ficocianinas: Modulación del sistema inmune y su posible aplicación como terapia contra el cáncer. *Rev. Tecnol. en Marcha* **33**, 125–139 (2020).
8. Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoo, A. & Vasconcelos, V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* (2019) doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.010.
9. De Moraes, M. G., Da Fontoura Prates, D., Moreira, J. B., Duarte, J. H. & Costa, J. A. V. Phycocyanin from microalgae: Properties, extraction and purification, with some recent applications. *Industrial Biotechnology* vol. 14 30–37 (2018).
10. Mysliwa-Kurdziel, B. & Solymosi, K. Phycobilins and Phycobiliproteins Used in Food Industry and Medicine. *Mini-Reviews Med. Chem.* (2016) doi:10.2174/1389557516666160912180155.
11. Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G. & Al-Hazimi, A. Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycoyanin. *BioMed Research International* (2013) doi:10.1155/2013/742859.
12. Bhat, V. B. & Madyastha, K. M. C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) doi:10.1006/bbrc.2000.3270.
13. Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T. & Sakaguchi, M. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. in *Journal of Applied Phycology* (2000). doi:10.1023/a:1008175217194.
14. McCarty, M. F. Clinical potential of *Spirulina* as a source of phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food* (2007) doi:10.1089/jmf.2007.621.
15. Zhou, Z. P. *et al.* Factors that effect antioxidant activity of c-phycoyanins from *spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry* (2005) doi:10.1111/j.1745-4514.2005.00035.x.
16. González, R. *et al.* Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacol. Res.* (1999) doi:10.1006/phrs.1998.0409.
17. Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J. & Pedraza-Chaverri, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods* (2014) doi:10.1016/j.jff.2014.10.011.
18. Nemoto-Kawamura, C. *et al.* Phycocyanin enhances secretory IgA antibody response and suppresses allergic IgE antibody response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. (2004) doi:10.3177/jnsv.50.129.
19. Reddy, C. M. *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) doi:10.1006/bbrc.2000.3725.

20. Jiang, L. *et al.* Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment. *J. Cancer* (2017) doi:10.7150/jca.21058.
21. Sørensen, L., Hantke, A. & Eriksen, N. T. Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. *J. Sci. Food Agric.* (2013) doi:10.1002/jsfa.6116.
22. Jiménez, C., Cossío, B. R., Labella, D. & Niell, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. *Aquaculture* (2003) doi:10.1016/S0044-8486(02)00118-7.
23. Pulz, O. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2001) doi:10.1007/s002530100702.
24. Richmond, A., Lichtenberg, E., Stahl, B. & Vonshak, A. Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. *J. Appl. Phycol.* (1990) doi:10.1007/BF02179776.
25. Richmond, A. & Grobbelaar, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass* (1986) doi:10.1016/0144-4565(86)90002-8.
26. Chojnacka, K. & Noworyta, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* (2004) doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.002.
27. Graverholt, O. S. & Eriksen, N. T. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2007) doi:10.1007/s00253-007-1150-2.
28. Gross, W. & Schnarrenberger, C. Heterotrophic growth of two strains of the acidothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell Physiol.* (1995) doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078803.
29. Mühling, M., Belay, A. & Whitton, B. A. Screening *Arthrospira* (*Spirulina*) strains for heterotrophy. *J. Appl. Phycol.* (2005) doi:10.1007/s10811-005-7214-8.
30. Eriksen, N. T. Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2008) doi:10.1007/s00253-008-1542-y.
31. Marquez, F. J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N. & Nagai, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* (1993) doi:10.1016/0922-338X(93)90034-6.
32. Pulz, O. & Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2004) doi:10.1007/s00253-004-1647-x.
33. DIC Corporation. <https://cutt.ly/JjEi61C>.
34. Japan Algae Co. <https://cutt.ly/8jEoxQp> <https://cutt.ly/8jEoxQp>.
35. Prozyme. <https://cutt.ly/NjEpowe>.
36. Norland Biotech. <https://cutt.ly/ljEpHrN>.
37. Hash Biotech Labs. <https://cutt.ly/zjEpNIM>.
38. OMS. <https://cutt.ly/gjRteml>.
39. Fernandes e Silva, E. *et al.* C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multi drug resistance in cancer. *Pharmacological Reports* (2018) doi:10.1016/j.pharep.2017.07.018.
40. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* (2011) doi:10.1126/science.1203543.
41. Dickens, E. & Ahmed, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (United Kingdom)* (2018) doi:10.1016/j.mpsur.2017.12.002.
42. NIC: Instituto Nacional del Cáncer EE. UU.
43. Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P. & Kalil, S. J. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian J. Chem. Eng.* (2011) doi:10.1590/S0104-66322011000100006.
44. Doke, J. M. An Improved and Efficient Method for the Extraction of Phycocyanin from

- Spirulina sp. *Int. J. Food Eng.* (2005) doi:10.2202/1556-3758.1037.
45. Sarada, R., Pillai, M. G. & Ravishankar, G. A. 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) doi:10.1016/S0032-9592(98)00153-8.
 46. Chen, H. W. *et al.* Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from Spirulina platensis cultured using power plant flue gas. *Process Biochem.* (2014) doi:10.1016/j.procbio.2014.05.006.
 47. Soni, B., Trivedi, U. & Madamwar, D. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from Phormidium fragile and its characterization for antioxidant property. *Bioresour. Technol.* (2008) doi:10.1016/j.biortech.2006.11.010.
 48. Tan, H. T., Khong, N. M. H., Khaw, Y. S., Ahmad, S. A. & Yusoff, F. M. Optimization of the freezing-thawing method for extracting phycobiliproteins from arthrospira sp. *Molecules* (2020) doi:10.3390/molecules25173894.
 49. İlter, I. *et al.* Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using different techniques. *J. Food Compos. Anal.* (2018) doi:10.1016/j.jfca.2018.04.007.
 50. Yu, P., Wu, Y., Wang, G., Jia, T. & Zhang, Y. Purification and bioactivities of phycocyanin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2017) doi:10.1080/10408398.2016.1167668.
 51. Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N. & Walia, S. Extraction and purification of C-phycocyanin from Spirulina platensis (CCC540). *Indian J. Plant Physiol.* (2014) doi:10.1007/s40502-014-0094-7.
 52. Chen, C. Y. *et al.* Using an innovative pH-stat CO₂ feeding strategy to enhance cell growth and C-phycocyanin production from Spirulina platensis. *Biochem. Eng. J.* (2016) doi:10.1016/j.bej.2016.04.009.
 53. Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. & Ghosh, P. K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expr. Purif.* (2005) doi:10.1016/j.pep.2004.10.028.
 54. Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S. & Raghavarao, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *J. Chromatogr. A* (2006) doi:10.1016/j.chroma.2006.05.073.
 55. Wu, H. L., Wang, G. H., Xiang, W. Z., Li, T. & He, H. Stability and Antioxidant Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from Spirulina platensis. *Int. J. Food Prop.* (2016) doi:10.1080/10942912.2015.1038564.
 56. American Cancer Society (CML). <https://cutt.ly/7j2q7j1>.
 57. Subhashini, J. *et al.* Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem. Pharmacol.* (2004) doi:10.1016/j.bcp.2004.02.025.
 58. American Cancer Society (CR).
 59. Línea celular HT-29.
 60. Lu, W., Yu, P. & Li, J. Induction of apoptosis in human colon carcinoma COLO 205 cells by the recombinant α subunit of C-phycocyanin. *Biotechnol. Lett.* (2011) doi:10.1007/s10529-010-0464-9.
 61. American Cancer Society (CM).
 62. Li, B., Chu, X., Gao, M. & Li, W. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. (2010) doi:10.1093/abbs/gmp104.
 63. MCF 7.
 64. Ravi, M. *et al.* Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer* (2015) doi:10.1186/s12885-015-1784-x.
 65. Thangam, R. *et al.* C-Phycocyanin from Oscillatoria tenuis exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G₀/G₁ cell cycle arrest. *Food Chem.* (2013) doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.060.

66. Li, B., Gao, M.-H., Zhang, X.-C. & Chu, X.-M. Molecular immune mechanism of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2006) doi:10.1042/ba20050142.
67. Pan, R. *et al.* Spirulina phycocyanin induces differential protein expression and apoptosis in SKOV-3 cells. *Int. J. Biol. Macromol.* (2015) doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.09.039.
68. Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C. L. & Liu, Z. R. The recombinant β subunit of C-phycoyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Lett.* (2007) doi:10.1016/j.canlet.2006.04.002.
69. Ying, J. *et al.* Transcriptome analysis of phycocyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. *Gene* (2016) doi:10.1016/j.gene.2016.03.023.
70. Choi, A. M. K. & Wang, X. Apoptosis. in *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set* (2006). doi:10.1016/B0-12-370879-6/00030-2.
71. Karmali, R. A. Review: Prostaglandins and cancer. *Prostaglandins and Medicine* (1980) doi:10.1016/0161-4630(80)90086-5.
72. Vane, J. R., Bakhle, Y. S. & Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (1998) doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.
73. Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T. & Cai, Y. Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (2016) doi:10.1155/2016/7803846.
74. Copeland, R. A. *et al.* Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994) doi:10.1073/pnas.91.23.11202.
75. Saini, M. K. & Sanyal, S. N. Targeting angiogenic pathway for chemoprevention of experimental colon cancer using C-phycoyanin as cyclooxygenase-2 inhibitor. *Biochem. Cell Biol.* (2014) doi:10.1139/bcb-2014-0016.
76. Nishanth, R. P. *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) doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.011.
77. Pardhasaradhi, B. V. V., Mubarak Ali, A., Leela Kumari, A., Reddanna, P. & Khar, A. Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Mol. Cancer Ther.* (2003).
78. Roy, K. R. *et al.* C-Phycocyanin inhibits 2-acetylaminofluorene-induced expression of MDR1 in mouse macrophage cells: ROS mediated pathway determined via combination of experimental and In silico analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* (2007) doi:10.1016/j.abb.2007.01.006.
79. Cai, Y. A., Murphy, J. T., Wedemayer, G. J. & Glazer, A. N. Recombinant phycobiliproteins: Recombinant C-phycoyanins equipped with affinity tags, oligomerization, and biospecific recognition domains. *Anal. Biochem.* (2001) doi:10.1006/abio.2000.4979.
80. Saini, M. K., Vaiphei, K. & Sanyal, S. N. Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycoyanin. *Mol. Cell. Biochem.* (2012) doi:10.1007/s11010-011-1106-9.
81. Li, B. *et al.* The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycoyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* (2015) doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.009.
82. Gantar, M., Dhandayuthapani, S. & Rathinavelu, A. Phycocyanin induces apoptosis and enhances the effect of topotecan on prostate cell line LNCaP. *J. Med. Food* (2012) doi:10.1089/jmf.2012.0123.
83. PDT. <https://cutt.ly/6lW3kPA>.
84. Bharathiraja, S. *et al.* In vitro photodynamic effect of phycocyanin against breast cancer cells. *Molecules* (2016) doi:10.3390/molecules21111470.