

## Un novedoso ligando cianobacterial para la L-selectina humana extraída de *Aphanizomenon flos aquae* –

### Su potencial papel en la biología de las células madre *in vitro* y *in vivo*

Jensen GS, Hart AN, Zasko LAM, Drapeau C, Gupta N, Schaeffer DJ, Cruickshank JA

#### Introducción

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos *in vitro* y *in vivo* de StemEnhance®, un extracto de *Aphanizomenon flos-aque* (AFA) enriquecido con un novedoso ligando para L-selectina humana, en la fisiología de la célula madre. La L-selectina es una molécula de adhesión involucrada en la migración celular, la adhesión celular, y la retención versus la liberación de células madre de la médula ósea dentro de la circulación de la sangre. La estimulación de la L-selectina conduce a la externalización de los receptores de quimiocina preformados CXCR4, los cuales son específicos para la quimiocina SDF-1 (por sus siglas en inglés: Stromal Derived Factor-1). (Figura 1). La vinculación de SDF-1 a CXCR4 lleva a la externalización de las moléculas de adhesión que se sujetan a la células madre en la médula ósea. SDF-1 actúa como un poderoso atrayente de las células madre y por eso ayuda en la retención de las células madre dentro del entorno de la médula ósea.

Se demostró que cualquier interferencia con el eje CXCR4/SDF-1 es uno de los varios mecanismos contribuyentes involucrados en la liberación de las células madre de la médula ósea. Por eso, cualquier componente que interfiera con el CXCR4 o el SDF-1 tiene el potencial de actuar como un movilizador de la célula madre.

Hay muchas formas de apoyar la movilización de las células madre. Por ejemplo el G-CSF (por sus siglas en inglés: Granulocyte Colony-Stimulating

Factor), el componente natural en el cuerpo que estimula la movilidad de las células madre, funciona al menos en parte al incrementar el nivel de enzimas proteolíticas específicas que degradan el SDF-1, por consiguiente desestabilizando el eje CXCR4/SDF-1. Otros componentes tal como el AMD-3100 promueve la movilización celular al bloquear CXCR4, una vez más desestabilizando el eje CXCR4/SDF-1. Finalmente los bloqueadores de la L-selectina reducen la densidad del CXCR4 en la superficie de la membrana de las células madre, y por esa razón cae la regulación del eje CXCR4/SDF-1. Debido al proceso fisiológico involucrado en cada uno de estos mecanismos de acción, las movilizaciones provocadas por cada uno de estos mecanismos muestran diferente magnitud, tiempo de inicio y duración. La movilización producida por el G-CSF y el AMD-3100 comienza en unos pocos días, dura unos días y puede conducir a un incremento en el número de las células madre en la

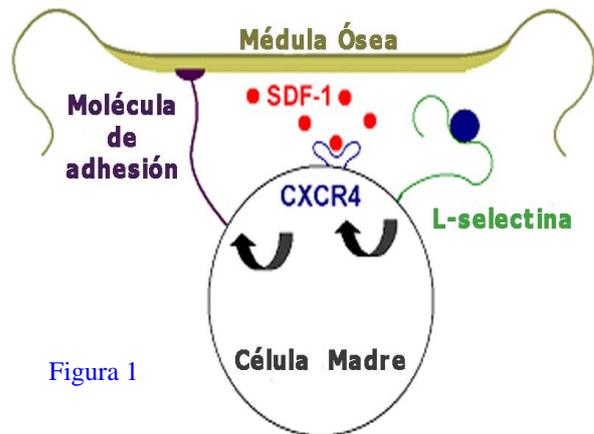


Figura 1

circulación, por arriba de las 100 veces. Por el contrario, la movilización provocada por los bloqueadores de L-selectina es más transitoria y de mucha menos magnitud. La movilización observada después del consumo de StemEnhance fue rápida, pasajera y moderada, por esa razón nosotros hipotetizamos que AFA contiene un bloqueador de la L-selectina.

## Métodos y Resultados

AFA contiene un ligando para la L-selectina humana. Para determinar si AFA contiene un ligando de la L-selectina (molécula de vinculación). ‘Dynabeads’ paramagnéticas (cuentas desarrolladas tecnológicamente para la separación inmunomagnética) revestido con L-selectina humana fue incubadas con un extracto de agua de AFA (AFA-W) (Figura 2). Después de la incubación las Dynabeads fueron lavados y cualquier material ligado del extracto de AFA fue desprendido de las moléculas de la L-selectina y a continuación pasado por el gel para electroforesis.

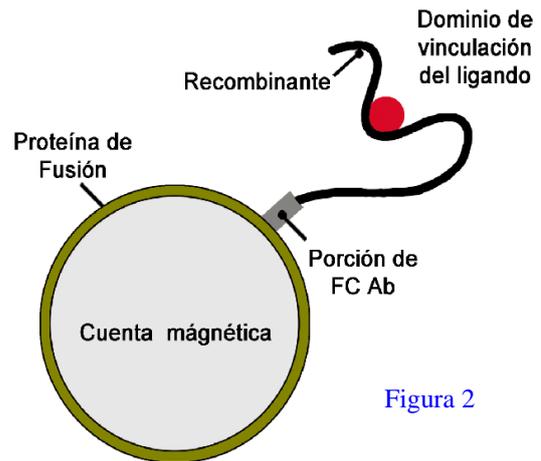


Figura 2

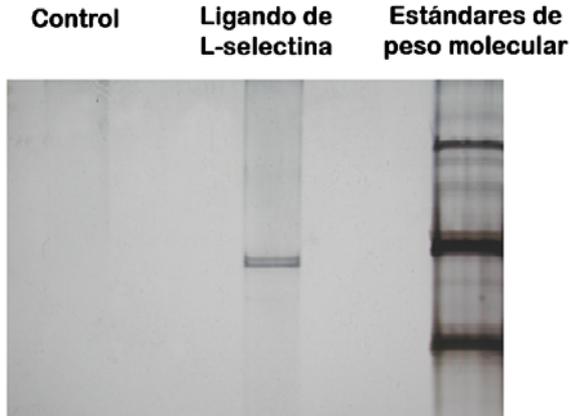


Figura 3

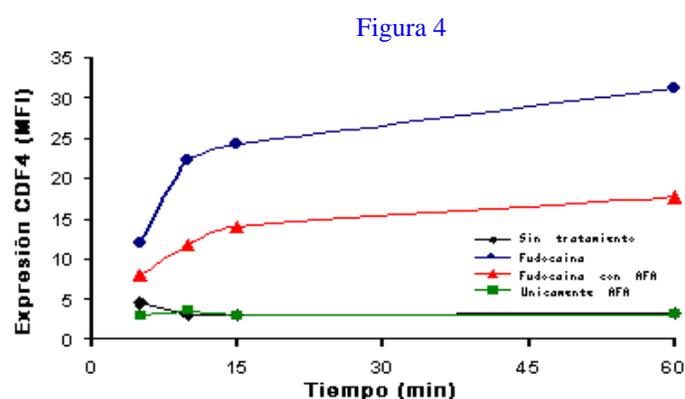
Este proceso reveló que AFA contiene un ligando de L-selectina que aparece ser un dímero hecho de dos proteínas que poseen un peso molecular de 57 y 54 kDa respectivamente (Figura 3). Al usar el mismo protocolo con la Espirulina, se determinó que la Espirulina no contiene un ligando de la L-selectina.

### AFA-W específicamente reduce el TQ1 ‘immunostaining’ de L-selectina en las células humanas PMN

La L-selectina posee un específico emplazamiento vinculante cuya activación da lugar a la externalización de CXCR4. Para determinar si el ligando de la L-selectina presente en AFA vincula al emplazamiento de vinculación activa de la L-selectina, examinamos el efecto de AFA-W en las propiedades vinculantes del anticuerpo monoclonal de la L-selectina anti-humana TQ1. TQ1 es un anticuerpo que específicamente liga el emplazamiento de vinculación fisiológica activa de la L-selectina. La incubación de linfocitos con AFA-W redujo la vinculación de TQ1 en aproximadamente

50 veces, indicando que el ligando de la L-selectina de AFA efectivamente se liga al emplazamiento de vinculación activa de la L-selectina.

AFA-W inhibe la expresión de CXCR4 inducida por fucoidina en las células CD34<sup>+</sup> de la médula ósea. Era importante determinar si el ligando de la L-selectina encontrado en AFA era un estimulante o un inhibidor de la L-selectina. Sabemos que la estimulación de la L-selectina conduce a un incremento en la externalización del CXCR4, la cual puede ser cuantificada al medir la densidad de los receptores de CXCR4 en la superficie de las células madre. La incubación de las células madre de la médula ósea con AFA-W no tuvo ningún efecto en la densidad de CXCR4, indicando que el ligando de L-selectina de AFA no era un estimulante de la L-selectina (Figura 4; línea verde).



Con el objetivo de investigar si el ligando era un bloqueador de la L-selectina se examinó el efecto de AFA-W en el incremento de la densidad de CXCR4 inducida por la fucoidina. (Figura 4). La fucoidina es un polisacárido de sulfato conocido por estimular la L-selectina. La fucoidina provocó un incremento de 8 veces más de la densidad de CXCR4 (línea azul), la cual fue inhibida (~50%) al incubarse con AFA-W (línea roja). Por esa razón, AFA contiene un bloqueador de la L-selectina.

### El consumo de StemEnhance® resultó en un incremento momentáneo de la circulación de las células CD34<sup>+</sup>

Como previamente se describió en la literatura científica, los bloqueadores de la L-selectina tienen el potencial para ser efectivos movilizadores de las células madre, al modular el eje CXCR4/SDF-1. Por esa razón probamos la habilidad de movilización del inhibidor de la L-selectina contenido en AFA en humanos. Usando un paradigma doble-ciego cruzado, el nivel de circulación de las células madre CD34<sup>+</sup> fue comparado en 15 individuos antes y después de la ingestión de 1 gramo de StemEnhance® o placebo. StemEnhance® (StemTech

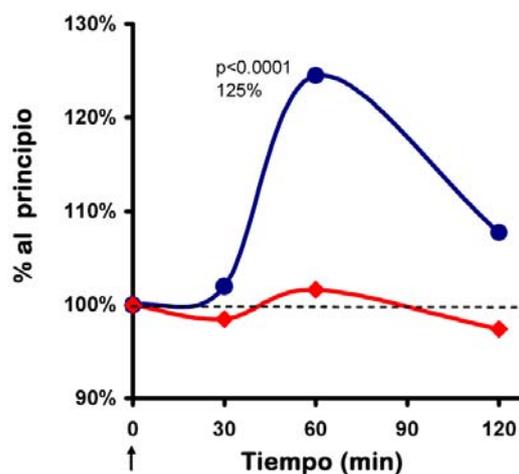
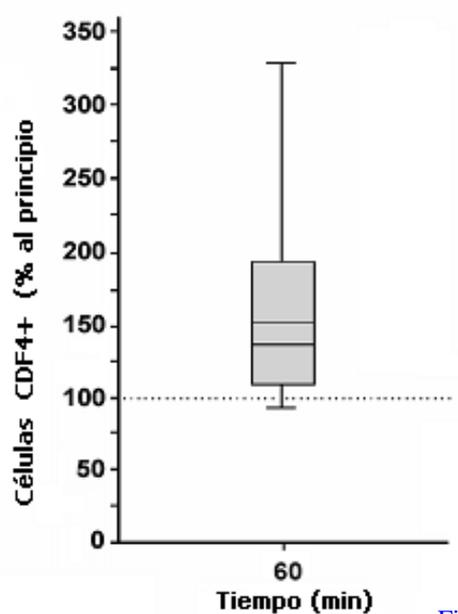


Figura 5

Health Sciences, Inc., CA) es una fórmula patentada del citoplasma y una fracción de la pared celular de la biomasa de toda la planta, enriquecida aproximadamente 5 veces más por el contenido del ligando de la L-selectina comparado con la biomasa cruda de AFA.

El consumo de StemEnhance® resultó en 60 minutos en un incremento de  $25 \pm 1\%$  en el número de células madre circulando en la sangre ( $p < 0.0001$ ) (Figura 5). El número de células madre  $CD34^+$  en la circulación regresó a su punto de inicio alrededor de 3 o 4 horas después de su consumo. Esto se dio en contraste con el placebo, el cual resultó con solamente unas menores fluctuaciones de los niveles de las células  $CD34^+$  en la circulación de la sangre 2 horas después del consumo.



Para probar la repetibilidad del efecto por el consumo de StemEnhance® en los niveles de las células  $CD34^+$  en la sangre periférica, 16 experimentos separados se realizaron en un voluntario. El promedio del incremento en el número de circulación de células madre fue de  $53 \pm 16\%$ , con una media proporcional de 36 % y un aumento máximo y mínimo de 233% y -4% respectivamente (Figura 6).

Figura 6

## Argumentos

Las estrategias para un régimen alimenticio que apoye la biología de las células madre representa un campo emergente en la investigación médica y nutricional. La cianobacteria AFA ha sido estudiada por sus propiedades antioxidantes y efectos inmuno-modificadores, ambos efectos en humanos e in vitro. AFA contiene un número de compuestos que han sido sometidos a mucha investigación, incluyendo el poderoso antioxidante de la ficocianina, un complejo polisacárido con poderosas propiedades inmuno-modificadoras y el neuromodulador feniletilamina responsable de la experiencia de energía mental reportada por los consumidores.

Se ha reportado aquí que AFA también contiene un novedoso componente que específicamente vincula el área activo de la L-selectina humana. Se compone de dos subunidades con un peso aparente de 54-57 kDa. Este ligando de la L-selectina humana, obtenido de la extracto de agua de AFA, fue capaz de

modular la respuesta funcional de los linfocitos humanos in vitro. La expresión del receptor CXCR4, la cual es causada por el efecto bien conocido de la fucoidina sobre la L-selectina, fue disminuida cuando la fucoidina y el extracto de agua de AFA fueron agregados simultáneamente, indicando que el ligando de la L-selectina de AFA estaba compitiendo con la fucoidina por la vinculación a el emplazamiento activo de la L-selectina.

Un estudio doble-ciego cruzado controlado con un placebo mostró que el consumo de StemEnhance® resultó en un pequeño pero significativo aumento en el número de células madre CD34<sup>+</sup> circulando en la sangre, llegando al máximo punto una hora después del consumo. El efecto fue estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ). Hay sin embargo una fluctuación significativa de un día a otro en el efecto de StemEnhance® o en la habilidad para cuantificar con precisión el efecto. Por eso, para evaluar la naturaleza de esta fluctuación, hicimos una prueba en un individuo durante 16 días experimentales. El incremento en el número de células madre en la sangre después del consumo de StemEnhance® promedió  $52 \pm 16\%$  y varió en gran medida entre el 96% y el 333% del valor inicial. De manera interesante, el promedio de respuesta en el individuo examinado repetidamente y el promedio de respuesta de StemEnhance® en el estudio doble-ciego cruzado que incluyó a 12 personas, fue similar, indicando la relativa consistencia de la respuesta y que el ensayo de doble-ciego cruzado puede de hecho haberle restado importancia al efecto de StemEnhance®.

Recientes estudios han puesto en evidencia el potencial papel de los movilizadores de las células madre en el mantenimiento óptimo de la salud. Recientemente, numerosos estudios concluyeron que el nivel de las células madre CD34<sup>+</sup> circulando en la sangre era un buen indicador de salud.