

Review

Ficocianina de *Arthrospira platensis* como posible fármaco anticancerígeno: revisión de estudios *in vitro* e *in vivo*

Steffen Braune¹, Anne Krüger-Genge², Sarah Kammerer¹, Friedrich Jung¹ and Jan-Heiner Küpper^{1,3,*}

¹ Institute of Biotechnology, Molecular Cell Biology, Brandenburg University of Technology Cottbus-Senftenberg, 01968 Senftenberg, Germany; steffen.braune@b-tu.de (S.B.); sarah.kammerer@b-tu.de (S.K.); friedrich.jung@b-tu.de (F.J.)

² Department of Healthcare, Biomaterials and Cosmeceuticals, Fraunhofer-Institute for Applied Polymer Research (IAP), 14476 Potsdam-Golm, Germany; anne.krueger-genge@iap.fraunhofer.de

³ Carbon Biotech Social Enterprise AG, 01968 Senftenberg, Germany

* Correspondence: Jan-Heiner.Kuepper@b-tu.de

Resumen:

La aplicación de fármacos citostáticos o sustancias naturales para inhibir el crecimiento y la progresión del cáncer es un tema importante y en constante evolución en la investigación sobre el cáncer. Ha habido un aumento del interés en los biorecursos marinos, en particular las algas, así como las cianobacterias y sus ingredientes bioactivos.

Los productos de biomasa seca de *Arthrospira* (Espirulina) y *Chlorella* han sido categorizados como “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). De particular importancia es un ingrediente de *Arthrospira*: la ficocianina, un pigmento biliproteico fluorescente azul-rojo, soluble en agua y no tóxico. Se informa que es el principal ingrediente activo de *Arthrospira* y se ha demostrado que tiene propiedades terapéuticas, incluidas actividades antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y anticancerígenas. En la presente revisión, se resumen los datos *in vitro* e *in vivo* sobre los efectos de la ficocianina en diversas células tumorales y en células de tejidos sanos. Se analiza el conocimiento existente sobre los mecanismos moleculares subyacentes y las estrategias para mejorar la eficacia de las posibles terapias contra el cáncer basadas en ficocianina.

Palabras clave: ficocianina; *Arthrospira platensis*; cáncer; tumor; fármaco; *in vitro*; *in vivo*

1. Introducción

En las últimas décadas, los productos de origen natural, no sintético, han adquirido una importancia cada vez mayor para la prevención y el tratamiento del cáncer

debido a los efectos secundarios tóxicos de muchos fármacos sintéticos contra el cáncer [1–4]. La *Arthrospira platensis* (AP), a menudo llamada “espirulina”, pertenece al filo de las cianobacterias con capacidad fotosintética característica [5]). Estas cianobacterias filamentosas, gramnegativas o algas verdeazuladas se consideran una de las fuentes de dichas sustancias bioactivas naturales (Figura 1) [6,7].

Hasta ahora, los estudios toxicológicos *in vivo* de la AP no han revelado ningún efecto tóxico sobre los riñones, el hígado, el sistema reproductivo o la fisiología corporal durante o después de la administración de dosis agudas o crónicas [8–10]. Una evaluación de seguridad realizada por la Farmacopea de los Estados Unidos, basada en una revisión de la literatura de PUBMED de 1966 a 2009, y en informes de eventos adversos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) concluyó que la AP tiene una seguridad de Clase A [11]. Varios productos de biomasa seca de AP también han sido categorizados como “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) por la FDA. Una dosis recomendada para adultos suele estar en el rango de 3 a 10 g de AP por día. Las dosis máximas de AP aplicadas de 30 g/día no provocaron ningún efecto secundario negativo [12]. Se ha demostrado que el consumo regular de una masa seca de AP considerablemente menor (pero también de ficocianina) reduce la inflamación intestinal, mejora la permeabilidad del tejido intestinal y aumenta la diversidad de la microbiota intestinal, por ejemplo, en ratas con una dieta rica en grasas (por ejemplo, 3 g de AP por día), pero también en ratones aparentemente sanos (por ejemplo, 2,1 g de AP por día) [13–16].

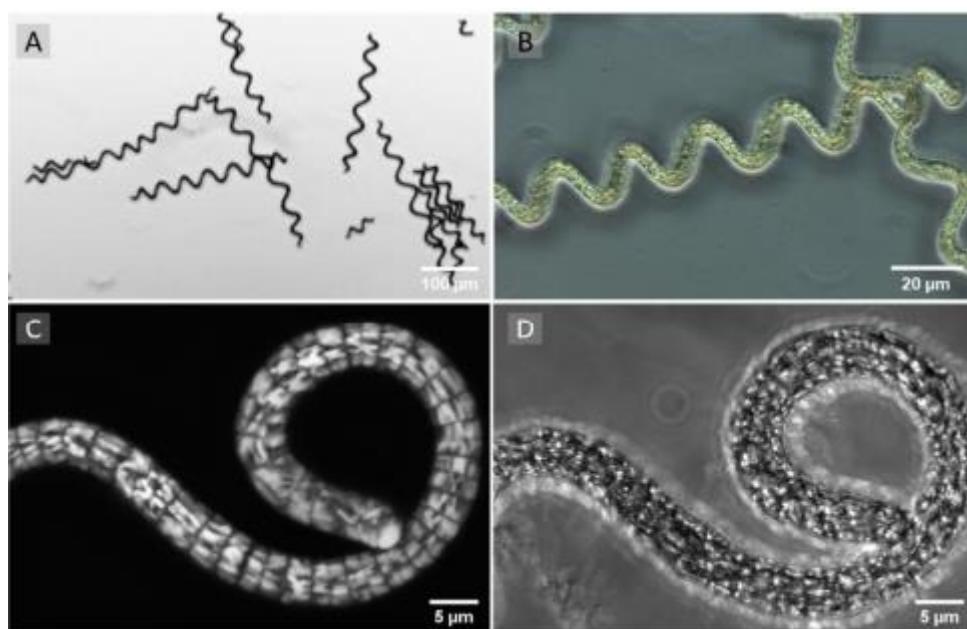


Figura 1. (A,B) Imágenes representativas de contraste de fase de *Arthrospira platensis* (AP) no fijada. (C) Proyección ortogonal de una pila de imágenes de microscopía láser de barrido tridimensional (47 imágenes individuales) de AP.

Microscopía láser de barrido sin etiquetas de una muestra no fijada. La muestra se extrajo a una longitud de onda de 555 nm. Se detectaron emisiones entre 650 nm y 700 nm. (D) Imagen en modo transmitido de la misma posición. Las imágenes se tomaron con un aumento primario de 100 veces con un Axio Observer.Z1/7 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania).

Los análisis de la composición de aminoácidos mostraron que la AP es al menos comparable a la soja desde el punto de vista nutricional y se acerca al estándar de ingesta óptima de proteínas de la Organización Mundial de la Salud/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (OMS/FAO) [17]. Además, se considera que la AP es una fuente de minerales, vitaminas y antioxidantes, incluidos **la ficocianina (PC)**, los carotenoides, los tocoferoles y los compuestos fenólicos [6,7,12,18–25]. Según el proceso de producción y extracción, se describe que dos de los ingredientes afectan a las células tumorales: la PC y los exopolisacáridos. Sin embargo, dado que Challouf et al. pudieron demostrar recientemente que los polisacáridos extracelulares no están presentes en los extractos acuosos y no tienen efecto citotóxico sobre las células tumorales [26], la PC puede considerarse una sustancia activa clave. Otros ingredientes que afectan las funciones celulares son la clorofila, la ficoeritrina, la vitamina C, los ácidos γ-linoleicos y el α-tocoferol [27–31]. Estos últimos solo están presentes en cantidades mínimas en la AP o no se ha descrito que afecten a las células tumorales. La PC es una proteína oligomérica que consta de cantidades iguales de subunidades α y β (con un peso molecular de aproximadamente 18 y 21 kDa, respectivamente) [32,33]. Los pares αβ principalmente construyen el pigmento como un trímero (αβ)3 o hexámero (αβ)6. Tanto las subunidades α como las β tienen un cromóforo de bilina, que contiene anillos tetrapirróticos lineales que están unidos al aminoácido cisteína de la apoproteína mediante enlaces tioéter [34]. Las aplicaciones médicas del PC son de interés debido a sus propiedades antiinflamatorias, antivirales, anticancerígenas, inmunoestimulantes y antioxidantes [35].

Estudios recientes sobre el PC en el campo del cáncer revelaron un efecto inhibidor significativo sobre el crecimiento de células cancerosas de manera dependiente del tiempo y la dosis. Se han encontrado múltiples mecanismos, incluyendo la inducción de la apoptosis, la detención del ciclo celular, la inhibición de la replicación del ADN y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [32,36–38]. Mientras que la apoptosis aumentó significativamente en las células cancerosas, el PC tuvo una toxicidad considerablemente menor en las células de tejidos sanos, lo que lo convierte en un candidato apropiado para aplicaciones quimioterapéuticas [35,39,40].

En la presente revisión, resumimos los efectos del PC en células que se originan en diversos tumores, o en células de tejido sano en estudios *in vitro* e *in vivo*. Además, se discute el conocimiento existente de los mecanismos moleculares subyacentes.

2. Efectos anticancerígenos de la ficocianina

La PC es un pigmento biliproteico no tóxico, soluble en agua y fluorescente azul-rojo (emisión de ~650 nm) [33,41]. Se informa que es el principal ingrediente activo de la AP [42] y se ha demostrado que tiene propiedades terapéuticas, incluidas actividades anticancerígenas [43–45]. A nivel celular, las características básicas de las células tumorales incluyen proliferación celular descontrolada, inmortalización celular, crecimiento celular invasivo y, en muchos casos, pérdida de la capacidad de apoptosis [46].

Los efectos farmacológicos de los medicamentos citostáticos en general tienen como objetivo inhibir la proliferación de células tumorales mediante la detención del ciclo celular o la inducción de la muerte de células tumorales. La mayoría de los medicamentos citostáticos se derivan de compuestos naturales [47].

La evidencia acumulada sugiere que el PC tiene un potente efecto anticancerígeno en varios tipos de cáncer (como cáncer de mama [48,49], cáncer de hígado [50], cáncer de pulmón [51,52], cáncer de colon [53], leucemia [42] y cáncer de médula ósea [54]) *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, incluso el tratamiento con PC en dosis altas no induce síntomas tóxicos significativos ni mortalidad en experimentos con animales [55,56].

La Tabla 1 resume los resultados de los estudios *in vitro* relacionados con los tipos de tumores analizados, las líneas celulares utilizadas, las concentraciones de PC para los experimentos de crecimiento celular y los tiempos de aplicación, la proliferación celular, las concentraciones inhibitorias máximas medias (CI50) y la morfología celular. Aunque las concentraciones y los tiempos de exposición, y posiblemente también la pureza del PC, diferían en gran medida entre los estudios, los resultados mostraron claramente la detención del ciclo celular y, a menudo, se indujo la apoptosis/necrosis de las diversas células tumorales [55]. Por el contrario, el PC tuvo casi ningún efecto proliferativo o incluso leve sobre las células originadas en tejido normal [35].

Tabla 1. Efectos de la ficocianina en el crecimiento de varias líneas de células tumorales. (-: no indicado).

Tumor Type	Cell Line	Phycocyanin Concentration	Application Time (h)	Proliferation (%)	IC50	Morphology	Ref.
Cervical carcinoma	HeLa	80; 200	µg/mL	72; 24	-32; -20	> 1104	µg/mL epithelial [57,58]
Human colorectal adenocarcinoma	HCT116	50	µg/mL	48	-73	18.8	µg/mL epithelial [59]
Pancreatic adenocarcinoma	Capan-1	100	µM	72	-80	6.2	µM epithelial [55]
Pancreatic adenocarcinoma	BxPC3	100	µM	72	-100	15.1	µM epithelial [55,60]
Pancreatic adenocarcinoma	PA-TU-8902	0.3	g/L	24	-82	-	epithelial [55,60]
Human ductal pancreas carcinoma	PANC-1	100	µM	72	-70	12.2	µM epithelial [55]
Hepatoblastoma	HepG2	100	µM	72	-76	13	µM epithelial [55]
Hepatoblastoma	HepG2	7; 50	µg/mL	24; 48	-61; -75	1.75; 22.3	µg/mL epithelial [59,61]
Prostate carcinoma	DU145	100	µM	72	-70	18	µM epithelial [55]
Large cell lung cancer	H460	100	µM	72	-95	14	µM epithelial [55,62]
Lung adenocarcinoma	A549	50	µg/mL	24	-38	99.2	µg/mL epithelial [55,62]
Alveolar adenocarcinoma	A549	60	µg/mL	48	-64	-	epithelial [63]
Nsc broncho carcinoma	H1299	4.8	µM	24	-11.3	-	epithelial [33]
Nsc broncho carcinoma	H460	4.8	µM	24	-3.7	-	epithelial [33]
Nsc broncho carcinoma	LTEP-A2	4.8	µM	4	-14.5	-	epithelial [33]
Human colorectal adenocarcinoma	HT-29	50; 200	µg/mL	48; 72	-63; -100	-	epithelial [63,64]
Triple negative breast cancer	MDA-MB-231	20	µM	6	-82	5.98	µM epithelial [65]
Triple negative breast cancer	MDA-MB-231	294	µg/mL	24	-30	294	µg/mL epithelial [57]
Ductal carcinoma	BT-474	20	µM	6	-80	8.45	µM epithelial [65]
Breast cancer	MCF-7	20; 100	µM	6; 72	-58; -65	15.4; 33	µM epithelial [4,65]
Breast cancer	MCF-7	5.66	µg/mL	48	-	5.66	µg/mL epithelial [66]
Breast cancer	MCF-7	40	µM	72	-53	-	epithelial [49]
Mammary gland adenocarcinoma	SKBR 3	20	µM	6	-60	17.7	µM epithelial [65]
Squamous cell carcinoma, cervix	SiHa	376	µg/mL	24	-35	376	µg/mL epithelial [57]
Malignant melanoma	A375	40	µM	72	-54	-	epithelial [49]
Chronic myelogenous leukemia	K562	100	µM	96	-49	-	lymphoblast [42,67]
Histiocytic tumor	AK-5	60	µM	72	-70	60	µM macrophage [42,67]

3. Mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por ficocianina en células tumorales

Un mecanismo importante para tratar tumores es la inducción de la apoptosis celular. Se han descrito varias vías por las cuales la PC puede dañar las células tumorales e inducir la apoptosis [57]. Mecánisticamente, la PC ejerce su actividad anticancerígena al reducir la proliferación y migración celular e inducir la apoptosis, así como la detención del ciclo celular (Figura 2). Obviamente, la PC puede penetrar la membrana celular de las células tumorales cultivadas *in vitro*, ya que se encontró en el citosol de las células HepG2 después del tratamiento [68]. Localizada cerca de las mitocondrias, fue demostrado que la PC inhibe el crecimiento de células HeLa a través de vías intrínsecas dependientes de las mitocondrias. Li et al. demostraron que la PC inhibe el crecimiento de células HeLa de manera dependiente de la dosis [58]. Activa la vía del citocromo c mitocondrial al alterar la relación Bcl-2/Bax (Bcl-2, proteína antiapoptótica; Bax, proteína proapoptótica; la relación Bcl-2/Bax representa el grado de inducción de apoptosis). Además, Subhashini y colaboradores demostraron la activación de caspasas y la inducción de la escisión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) [42]. La escisión e inactivación de PARP-1 podría desactivar la respuesta celular inmediata a los daños del ADN, como la reparación por escisión del ADN [69]. Después de la suplementación de PC al sobrenadante de células tumorales, se observaron cambios morfológicos notables. Estos comprenden la contracción celular, la formación de ampollas de membrana, la condensación nuclear y citoplasmática, la escisión endolítica del ADN en pequeños fragmentos oligonucleosómicos, la formación de cuerpos apoptóticos y micronúcleos característicos de la apoptosis

(Figura 3). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores en los que las células cancerosas tratadas con agentes anticancerígenos mostraron signos morfológicos típicos de la apoptosis, como la contracción y la formación de ampollas de membrana [58,64,70].

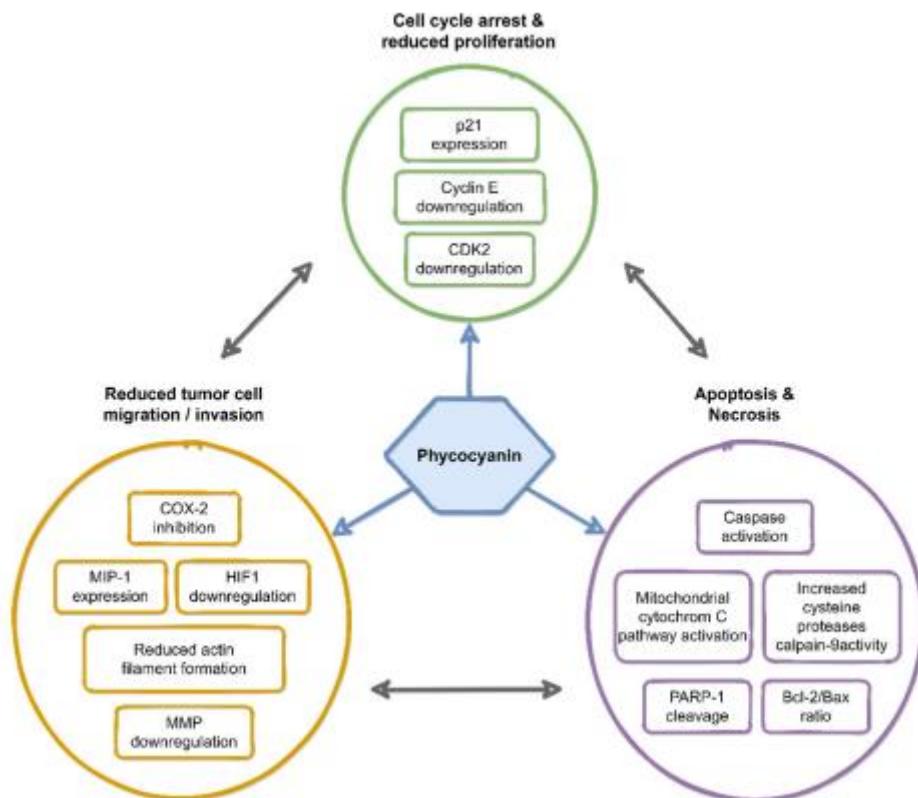


Figura 2. Resumen de los mecanismos moleculares informados de la actividad anticancerígena inducida por ficocianina.

La PC también afectó la invasión de células tumorales. En las células de cáncer de mama MDA-MB-231, los filamentos de actina se redujeron mientras que el potencial de migración disminuyó con la suplementación con PC [65]. La PC es un inhibidor de la ciclooxygenasa 2 (COX-2), que convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas y desempeña un papel clave en la progresión tumoral y la resistencia química [71–73]. La prostaglandina-E2 es un producto estrechamente regulado de la COX-2, que promueve la angiogénesis [74,75]. Los inhibidores de la COX-2 también aumentaron la expresión de E-cadherina en las células de cáncer de colon Caco2 [76]. Además, la COX-2 se correlacionó positivamente con la invasión tumoral, la metástasis y el mal pronóstico en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

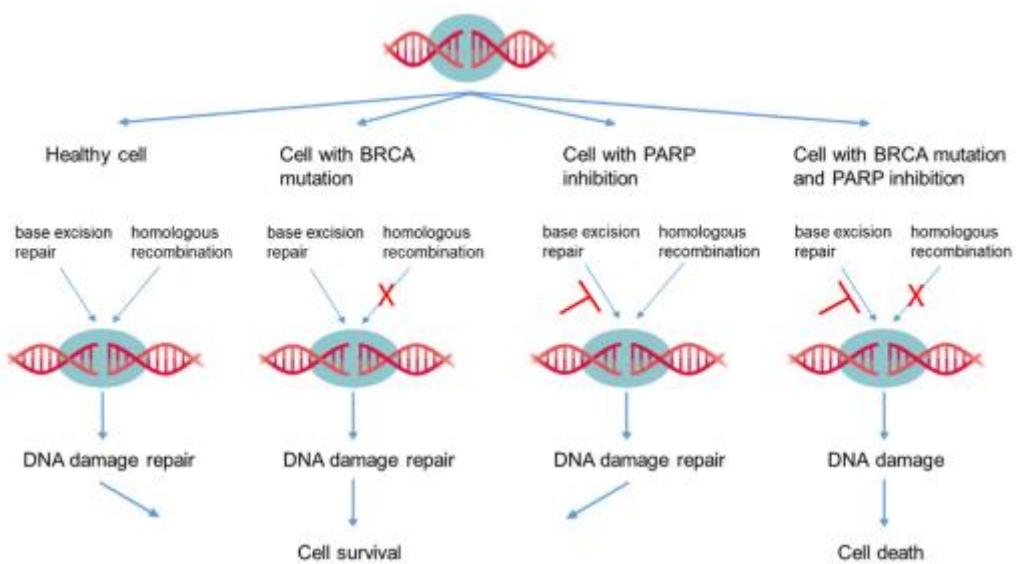


Figura 3. El papel de los defectos genéticos (p. ej., BRCA) y la inhibición de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en el proceso de apoptosis. Como ejemplo, la reparación de dos roturas independientes de cadena sencilla (o roturas agrupadas)

Se ha demostrado que las metaloproteasas de matriz (MMP-2 y MMP-9), necesarias para la invasión de los tejidos circundantes y la metástasis tumoral, son reguladas negativamente por la PC [77,78]. Además, se ha demostrado que se regula negativamente el HIF-1, que se asocia con una mayor demanda de oxígeno y angiogénesis, así como la expresión de MCP-1 (que se correlaciona positivamente con el pronóstico metastásico en el entorno tumoral). Esta regulación negativa también promovió la expresión de MIP-1 (que desempeña un papel en la reducción de la angiogénesis) [77].

De manera similar, la PC indujo un aumento de la actividad de la calpaína-9 en las células de cáncer de colon, una proteasa de cisteína que aumenta la concentración intracelular de Ca²⁺ [78]. Por lo tanto, contribuye a la apoptosis mediada por fármacos al regular negativamente la expresión del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ), que está relacionado con la progresión tumoral. Otros mecanismos antitumorales incluyeron la inhibición de la señalización Wnt/β-catenina del cáncer de colon y la regulación negativa de la expresión de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas α y δ (PPAR α , PPAR δ) [79].

La regulación del ciclo celular es importante en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular normal, por lo que la disfunción de la regulación del ciclo celular está estrechamente relacionada con el desarrollo tumoral [46]. Si bien el ciclo celular normal está bien regulado, las células tumorales pueden proliferar infinitamente. El ciclo celular incluye tres puntos de control principales que deben

superarse con éxito para la división celular: el punto de control G1/S, el punto de control G2/M y el punto de control del huso. Si no se supera uno o más de estos puntos de control, se produce una detención del ciclo celular y, finalmente, la apoptosis. La suplementación del medio de cultivo celular con PC provocó una detención en la fase G0/G1 en las células tumorales colorrectales HT-29 y las células de cáncer de pulmón A549.

De este modo, se bloqueó la síntesis de ADN y se inhibió la proliferación de células tumorales [63]. Diferentes grupos informaron que el PC también podría bloquear la progresión del ciclo celular G2/M. Esto se encontró en las células de cáncer de páncreas PANC-1 [41], en las células de cáncer de ovario humano SKOV-3 [79,80] y en las células de hepatoblastoma HepG2 (68).

Se descubrió que las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 tienen diferentes grados de detención del ciclo celular en la fase G0/G1 [29,47] mediante la expresión del inhibidor 1 de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) (p21), así como mediante la regulación negativa de la expresión de ciclina E y CDK2 [65]. Además, se demostró que la PC evita que las células leucémicas (K562) entren en la fase S, y las células se detuvieron en la fase G1 [35]. En conjunto, estos mecanismos inducidos por la PC tienen el efecto de inhibir la proliferación celular y, a su vez, promover la apoptosis/necrosis [77].

El amplio rango de inhibición de la proliferación por PC, desde el 3,7% hasta el 100% en diferentes líneas celulares de cáncer, es sorprendente. Una hipótesis que podría explicar esto es la heterogeneidad genética bien conocida de los diferentes tipos de cáncer, pero también puede haber una heterogeneidad sustancial de células cancerosas dentro de un tumor. Hace cuarenta años, Nowell informó que la evolución intratumoral a través de la mutación y la selección continúa después de la iniciación del tumor [81]. Se sabe que las deficiencias en la reparación del ADN conducen a tasas de mutación más altas que en las células normales [82]. Como resultado, un tumor puede contener una colección genéticamente diversa de subclones hasta que sea clínicamente detectable [83]. Por lo tanto, la heterogeneidad intratumoral puede conducir al hecho de que la terapia tumoral solo puede llevar a una parte de las células tumorales, pero no a todas las células, a la apoptosis/necrosis. Esta podría ser una razón por la que la alta heterogeneidad intratumoral se asoció con un peor resultado en la terapia tumoral convencional en estudios clínicos [84–86].

4. Estrategias para posibles terapias contra el cáncer basadas en ficocianina

En la actualidad, los efectos del PC sobre las líneas celulares tumorales se analizan de forma bastante sustancial en múltiples estudios *in vitro* (véase la Tabla 1). Los datos de los escasos estudios *in vivo* se resumen en la Tabla 2. El conjunto de datos comprende estudios con enfoques únicos y combinados (fármacos y técnicas), en

tratamientos orales y locales (Tabla 2). Actualmente, el PC no se utiliza clínicamente como fármaco contra el cáncer, ya que los efectos de una monoterapia parecen no ser lo suficientemente eficientes [51]. Además, la corta vida media in vivo del PC impone algunas limitaciones a la aplicación en medicina [87].

Muy recientemente, Jiang y sus colaboradores publicaron un estudio para superar estos obstáculos [57] mediante el uso de un sistema de administración basado en nanopartículas que consiste en carboximetilquitosano, un material que ha demostrado ser soluble en agua, biodegradable, biocompatible y no tóxico [88]. Además, añadieron un péptido ligando específico de CD59 (CD59sp) a la nanopartícula para su focalización en tumores. Se informó que el CD59 se expresaba en gran medida en muchos tumores sólidos, como el cáncer de colon [89], el cáncer de pulmón [90], el cáncer de páncreas [91] y el cáncer de ovario [82,92], mientras que el CD59 solo se expresaba marginalmente en células normales [90]. Un primer estudio reveló que los efectos antitumorales del CD59sp que contenía el sistema de administración de PC eran más efectivos que la sustancia sola o el sistema de administración de PC sin péptido de focalización *in vitro* (células HeLa) así como *in vivo* (ratones desnudos BALB/c hembra, [57]). Además de las nanopartículas de carboximetilquitosano, también se han utilizado portadores de liposomas para incorporar ingredientes de algas, y se demostró que mejoran la absorción celular [93].

Otra estrategia es la funcionalización de nanopartículas con PC en combinación con otras sustancias, como el monometileter de hematoporfirina para la terapia fotodinámica no invasiva contra el cáncer (TFD) [94,95]. En estudios con modelos de cáncer de hígado y de mama en ratones, se inyectaron nanopartículas recubiertas de PC en el área del tumor y se excitaron con luz láser de infrarrojo cercano (NIR). Esta estrategia permite la aplicación de PC como fotosensibilizador inductor de ROS y, además, permite la visualización fotoacústica/térmica del progreso del tratamiento debido a sus propiedades de fluorescencia. La generación de ROS inducida localmente da como resultado apoptosis y necrosis. En combinación con un tratamiento térmico adicional, se demostró que el crecimiento del tumor disminuyó en estos estudios sin efectos secundarios tóxicos sistémicos. Sin embargo, también se ha demostrado que la aplicación oral o local de PC (sin un sistema de administración basado en nanopartículas) reduce el peso del tumor y la velocidad de formación en la PDT [48,96].

La combinación de PC con otros compuestos naturales de organismos marinos, que complementan específicamente el efecto sobre las células tumorales a través de diferentes mecanismos, parece abrir nuevas vías para la terapia de tumores.

Tabla 2. Resumen de estudios in vivo que investigan la influencia de la ficocianina en el crecimiento de varios tumores.

Tumor Type	Tumor Induction	Animal Model	Combination Drug/Technique	Phycocyanin Concentration	Treatment Duration	Ref.
Lung	Injection of A549 cells (right flank)	Rat (nude)	Betaine	370.0 mg/kg body weight per day, food supplement	28 days	[51]
Lung	Injection of A549 cells (armpit area) Injection of 1,2-dimethyl-hydrazine dihydro-chloride (subcutaneous)	Mouse (nude)	All-trans retinoic acid	0.2 mL (320 mg/mL) per day, injected in tumor area	10 days	[52,97]
Colon		Rat, Sprague-Dawley	Piroxicam	Up to 200 mg/kg body weight per day, food suppl.	42 days	[77,98,99]
Ehrlich ascites carcinoma (EAC)	Injection of EAC cells (peritoneum)	Mouse, Swiss albino	Cisplatin	0.5 g/kg body weight of AP, food suppl.	14 days pre and 14 days post inocul.	[100]
Esophag. Squamous cell carc.	ESCC EC9706 Injection of SiHa/HeLa cells (axillary fossa/armpit area)	Mouse		Injected in tumor area		[101]
Cervix		Mouse, BALB/c	Nanoparticles functionalized: CD95p and PC	Injected in tumor area/tail vein once every 2 days	20 days	[57,102,103]
Liver	Injection of H22 cells (armpit area)	Mouse, BALB/c	Photodynamic therapy (PDT)	0.02 mL (10 mg/mL) per day injected in tumor area	10 days	[96]
Breast	Injection of MCF-7 cells (spleen area)	Mouse, BALB/c	PDT	2 mL (320 mg/mL) per day	13 days	[48]
Breast	Injection of MCF-7 cells (right abdomen)	Mouse, BALB/c	PDT, Nanoparticle coated with hematoporphyrin mono-methyl ether and PC	100 µL nanoparticle solution (3 µg/g) injected in tumor, per day, once every 2 days	14 days	[95]
Breast	Injection of 4T1 cells (subcutaneous)	Mouse, BALB/c	PDT, Nanoparticles functionalized with PC	100 µL nanoparticle solution (cor. 150 µg/mL PC)	14 days	[94]

Los primeros estudios demostraron que el PC puede mejorar potencialmente la eficacia de los fármacos contra el cáncer actualmente disponibles [57]. La combinación de PC y topotecan en células de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP) aumentó la actividad de la caspasa-9 y la caspasa-3, aumentó los niveles de radicales libres de oxígeno (ROS), indujo la apoptosis de las células tumorales y redujo los efectos secundarios del topotecan en un modelo de tumor de rata [104]. La combinación de piroxicam (un fármaco antiinflamatorio no esteroide tradicional) con PC en la carcinogénesis de colon de rata inducida por 1,2 dimetilhidrazina (DMH) mostró un efecto más del 70% mayor que los fármacos de un solo uso. La fragmentación del ADN aumentó y la expresión de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) y los niveles de prostaglandina E2 (PGE-2) se redujeron significativamente. Además, también se redujeron el número y el tamaño de los tumores [98,99]. La combinación de ácido retinoico all-trans (ATRA) con PC podría reducir significativamente la dosis y los efectos secundarios de ATRA en células tumorales pulmonares A549. La terapia de combinación reguló significativamente a la baja la proteína antiapoptótica Bcl-2, reguló al alza la expresión de la proteína proapoptótica Caspasa-3, inhibió la expresión de la proteína relacionada con el ciclo celular CDK-4 y Ciclina D1, inhibió la expresión de la proteína reguladora del complemento CD59 e indujo la apoptosis en células HeLa [52,97]. Cuando las células de cáncer de pulmón A549 se trataron con betaina, la viabilidad celular A549 disminuyó en un 50%, y la combinación de betaina y PC disminuyó la viabilidad en un 10-20% adicional [51]. La expresión de NF-κB se redujo, la cantidad de proteína proapoptótica p38 MAPK aumentó y se indujo un arresto del ciclo celular G2/M [51]. En un estudio animal muy reciente en 220 ratones albinos suizos hembra, Hashem et al. descubrieron que la combinación de AP (0,5 g/kg de peso

corporal, po) además de cisplatino (40 µg/ratón/ip), un fármaco quimioterapéutico ampliamente utilizado con actividad de amplio espectro, promovió las funciones apoptóticas y citotóxicas del cisplatino en el grupo de combinación contra el carcinoma de ascitis de Ehrlich después de dos semanas de aplicación [100]. Además, AP alivió significativamente los impactos hematotóxicos, hepatotóxicos y nefrotóxicos inducidos por cisplatino en ratones normales. Estos estudios muestran que la adición de PC a fármacos anticáncer ya bien establecidos podría mejorar significativamente la terapia del cáncer. Además, la dosis del citostático podría reducirse, lo que a menudo conduce a efectos secundarios tóxicos menos severos.

Más allá de la mitigación de la actividad del cáncer, Ji y colegas informaron la influencia de PC en la transición epitelial-mesenquimal (EMT) [105]. La EMT es un proceso fundamental e intrincado que aumenta el potencial metastásico del cáncer cervical. Los autores indujeron EMT por TGF-β1 en células de cáncer cervical. PC inhibió EMT en células de Caski al regular negativamente la expresión de la proteína N-cadherina y al alza a través de la vía de señalización TGF-β/smads. Además, la C-ficocianina (C-PC) podría inhibir la expresión de los factores de transcripción Twist, Snail y Zeb1 relacionados con EMT. Además, el C-PC podría inhibir la migración e invasión de células de Caski inducidas por TGF-β1. Concluyeron que el C-PC revirtió la transición epitelial a mesenquimal inducida por TGF-β1 en células de cáncer cervical y reguló a la baja la vía de señalización TGF-β/smads [105].

En este sentido, es de considerable importancia que el PC no afectara negativamente a las células no malignas, de modo que sean posibles terapias de dosis alta (ver Tabla 3). Los estudios *in vivo* no mostraron toxicidad, efectos adversos ni mortalidad durante las pruebas de toxicidad aguda del PC en ratas y ratones [106,107]. Esto se aplicó incluso a la alimentación oral de 3000 mg [106] o 5000 mg [52,108] por kg de peso corporal. La administración intraperitoneal de 70 mg [109] e incluso 200 mg de PC por kg de peso corporal [110] tampoco reveló ningún efecto adverso en ratas.

Tabla 3. Efectos de la ficocianina en el crecimiento de líneas celulares no tumorígenas y células primarias.

Cell Origin	Cell Type	Phycocyanin Concentration	Appl. Time (h)	Prolif. (%)	IC50	Morphology	Ref.
Ovary (Chin. Hamster)	CHO	20	µM	6	≈	-	[58]
Mammary gland	MCF-10A	25	µg/mL	24	↑	>20	-
Skin	HSF	1000	µg/mL	24	≈	-	epithelial [65]
Skin	CCD-986sk	40	µM	72	+42	-	fibroblast [62]
Skin	Hs68	100	µM	72	≈	-	fibroblast [35]
Liver	LO2	100	µM	72	≈	-	fibroblast [49]
Liver	QSG-7701	100	µM	72	≈	-	epithelial [55]
Human heart ventricle	AC-16	100	µM	72	≈	-	[55]
Kidney cortex	HK-2	100	µM	72	≈	-	epithelial [55]
Peripheral blood	NK-82	100	µM	72	≈	-	NK cells [55]
Endothelium of umbilical vein	HUVEC	100	µM	72	≈	-	epithelial [55]
Endothelium of umbilical vein	HUVEC	50	µg/mL	80	+31	-	epithelial [111]
Connective tissue (Mouse)	L929	596	µg/mL	24	-25	596 µg/mL	fibroblast [57]

-: not given, ↑: increase, ≈: approximately equal/unchanged.

5. Efecto de la ficocianina en las células tumorales en comparación con las células no malignas. Por qué la PC es tóxica para las células tumorales pero no tóxica para las células no malignas aún no está claro y es tema de mucho debate. Se pueden plantear hipótesis sobre diferentes vías moleculares que podrían brindar acceso a este enigma y ayudar a resolverlo en el futuro. Las diferencias en la función de las células no malignas en comparación con las células tumorales ofrecen un enfoque para responder a esta pregunta.

La característica subyacente de las células cancerosas es el desarrollo de inestabilidad genómica, que promueve el desarrollo y la acumulación de mutaciones relevantes para el cáncer, que finalmente conducen a la transformación maligna [46]. Una diferencia entre las células cancerosas y las células no malignas consiste en cambios genéticos o epigenéticos que pueden conducir a un crecimiento tumoral descontrolado. En los organismos sanos, la estabilidad genómica está controlada por varios mecanismos de reparación.

Las células de mamíferos comprenden una variedad de mecanismos de reparación que potencialmente detectan y reparan daños en el ADN, como roturas de cadena sencilla, aductos de bases u oxidaciones de bases, etc., y por lo tanto mantienen la integridad genómica. Los sistemas de reparación importantes incluyen la reparación por escisión de bases y nucleótidos (BER, NER), así como la reparación de roturas de cadena doble por recombinación homóloga (HR) o unión de extremos no homólogos (NHEJ) [8,112]. Las enzimas PARP-1 y PARP-2 de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) reconocen roturas de cadena sencilla y doble a través de sus dominios de unión de dedos de zinc y contribuyen a la reparación del ADN mediante la activación enzimática de la BER u otros mecanismos [10–12,113]. Al inhibir la PARP, las roturas de cadena sencilla ya no se reparan y se producen roturas de cadena doble durante la siguiente división celular en el núcleo, lo que luego conduce a la apoptosis. En células no malignas, los daños en el ADN pueden repararse mediante recombinación homóloga. Este contexto se muestra en la Figura 3.

Los inhibidores de PARP, cuando se utilizan específicamente en pacientes con defectos del gen BRCA, ofrecen la posibilidad de atacar las células tumorales y conducirlas a la apoptosis, mientras que en las células sanas del mismo organismo, la reparación de las roturas de cadena sencilla debe continuar (ver Figura 3).

Reddy informó que la PC tiene propiedades inhibidoras de PARP, posiblemente mediadas por la liberación de citocromo c de las mitocondrias con la activación de la caspasa 3 después de la apoptosis [114]. Esta escisión de PARP podría entonces excluir los dominios catalíticos de PARP y presumiblemente inhabilitar a PARP para coordinar la reparación y el mantenimiento posteriores de la integridad del genoma.

Esto ya se ha logrado en la escisión de PARP por apoptosis mediada por PC de células K562 (linfoblastos de pacientes con leucemia mieloide crónica) [42]. Esto demuestra claramente que la inhibición de PARP con PC en combinación con un defecto genético como BRCA puede conducir a la apoptosis de células tumorales.

Para muchos de los tipos de tumores que se muestran en la Tabla 1, se describen mutaciones de los genes supresores de tumores BRCA1 y/o BRCA2 [115–119]. Las mujeres con mutaciones de BRCA tienen un riesgo de entre el 50 y el 80 % de desarrollar cáncer de mama antes de los 70 años [120], y un riesgo adicional del 40 al 65 % de desarrollar cáncer de ovario. Los hombres con mutaciones de BRCA tienen un riesgo de entre 2 y 7 veces mayor de desarrollar cáncer de próstata. Ambos sexos enfrentan un riesgo de entre 2 y 4 veces mayor de desarrollar cáncer de colon o de páncreas [115–119]. La AP podría inducir la apoptosis en esos tipos de tumores.

Los pacientes con mutaciones en otros genes clave dentro de la vía de reparación del daño del ADN también pueden responder al tratamiento con inhibidores de PARP, y la identificación de estas alteraciones podría aumentar significativamente el porcentaje de pacientes que pueden beneficiarse de la PC [121].

Vale la pena mencionar el gen RAD51C (como BRCA1 ubicado en el cromosoma 17), que se identificó con más detalle en 2010 [122]. Después de BRCA1 y 2, es el único gen de alto riesgo encontrado hasta ahora, y por eso se lo denomina BRCA3 [123]. Los defectos también conducen a un aumento significativo del riesgo (aproximadamente el mismo que BRCA1/2): según el conocimiento actual,

aproximadamente entre el 60% y el 80% de las mujeres con mutación RAD51C desarrollan cáncer de mama, y entre el 20% y el 40% desarrollan cáncer de ovario. Se identificaron otros defectos genéticos asociados con el aumento moderado de un riesgo de desarrollar un tumor de mama o de ovario en un estudio familiar basado en la población (estudio COGS [124]).

6. Conclusiones

Los datos indican que la Ficocianina puede considerarse un fármaco seguro para reducir o inhibir el crecimiento de células tumorales. La combinación con otros fármacos contra el cáncer y/o radioterapia podría permitir la reducción de la dosis efectiva de fármacos contra el cáncer establecidos, lo que minimizaría los efectos secundarios relacionados con la dosis y mejoraría el resultado terapéutico. Además, la encapsulación del PC podría prolongar la vida media y, por lo tanto, podría mejorar la efectividad.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que todos los estudios mostrados se realizaron utilizando líneas celulares cancerosas. Antes del uso clínico, se deben realizar estudios que involucren células tumorales primarias y animales para

demostrar si aparecen resultados comparables. Ahora se está preparando un estudio que utilice células de un tumor así como células del tejido sano vecino y que mostrará si esta hipótesis puede resolver el enigma de por qué el AP conduce a la apoptosis de células tumorales pero no daña las células humanas no malignas primarias.

Contribuciones de los autores: F.J., S.K. y J.-H.K. fueron responsables de la obtención de fondos. F.J., J.-H.K. y S.B. diseñaron y conceptualizaron la revisión. Todos los autores realizaron la búsqueda bibliográfica, la preparación del borrador original, así como la revisión y edición. F.J. y S.B. diseñaron las tablas y las figuras.

Todos los autores revisaron el manuscrito de manera crítica. Todos los autores leyeron y aceptaron la versión publicada del manuscrito.

Financiación: Esta investigación fue financiada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), número de subvención 85036717.

Agradecimientos: En esta sección puede reconocer cualquier apoyo brindado que no esté cubierto por las secciones de contribución del autor o financiación. Esto puede incluir apoyo administrativo y técnico, o donaciones en especie (por ejemplo, materiales utilizados para experimentos).

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.