

*Nota científica*

## ***Spirulina (Arthrospira) platensis* en la prevención del fotodaño celular producido por luz ultravioleta en ratones CF1**

**Lucía López-Agüero<sup>1</sup>, Mónica M. Storni<sup>1</sup>, M. Cristina Zaccaro<sup>1</sup>, Ana M. Stella<sup>2</sup> y Gloria Zulpa<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biología de Cyanobacteria, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2620 CP 1428, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Laboratorio de Ecoporfirinas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

\* Autor de correspondencia: cyanob@bg.fcen.uba.ar

### **Resumen**

El fotoenvejecimiento ocurre por exposición a radiaciones solares de longitudes de onda del ultravioleta (UV), debido a la liberación de un exceso de radicales libres, los cuales pueden producir la ruptura del DNA, dañar los lípidos de las membranas celulares e interferir con el funcionamiento celular. En la búsqueda de compuestos bioactivos capaces de reducir el aumento en la producción de radicales libres, originado por el estrés medioambiental, se ha señalado a las cianobacterias como fuente de numerosas sustancias bioactivas. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el efecto protector de *Spirulina (Arthrospira) platensis* en ratones expuestos a luz UVC. Ratones hembras adultas CF1, fueron tratados con *S. (Arthrospira) platensis* como complemento dietario y aplicación sobre la piel del extracto crudo etanólico de biomasa, e irradiados diariamente. Los ratones se pesaron semanalmente y al final de los tratamientos se extrajo sangre en la cual se determinó la actividad de creatina cinasa (ATP creatina N-fosfotransferasa, EC2.7.3.2) en plasma heparinizado y se realizaron cortes histológicos de la piel para evaluar el daño celular. La actividad de creatina cinasa, que aumentó por efecto del UVC, disminuyó un 49.44% con respecto al control, cuando se aplica a la piel con 100 µL de extracto crudo etanólico de *S. (Arthrospira) platensis*. En tanto que administrada como complemento dietario, disminuyó la actividad de creatina cinasa en un 27.21%. En conclusión, ambos tratamientos disminuyeron el fotodaño manteniendo la integridad de la epidermis e incrementando el número de folículos pilosos que en algunos casos dan origen a pelos dobles o triples lo cual indica que *S. (Arthrospira) platensis* es una fuente promisoriosa de productos naturales con efecto antienvjecimiento.

**Palabras clave:** *cianobacteria, Spirulina (Arthrospira) platensis, creatina cinasa, ratones, fotodaño.*

## Abstract

Exposition to solar light may cause photoaging, due to the production in excess of free radicals, responsible for the DNA molecule rupture, cellular membrane lipid damage and cellular metabolism interference. In the search of new bioactive compounds capable of reducing the free radicals produced by environmental stress, Cyanobacteria have been cited as a source of a variety of promising substances. The aim of this work is to evaluate the protective effect of *Spirulina*(*Arthrospira*) *platensis* on mice exposed to UVC light. Female adult mice CF1 were given *S. (Arthrospira) platensis* as dietary supplement or treated with biomass ethanolic crude extract topical formulation, and were daily irradiated. Mice were weighted every week. In order to evaluate the cellular damage, at the end of the experiment, creatin kinase (ATP creatin kinase N-phosphotranferase, EC 2.7.3.2) activity was determined in heparinized plasm and histological slices of the skin were prepared. Creatin kinase activity increased with UVC radiation and decreased by 49.44% compared with the control when the skin was treated with 100  $\lambda$  *S. (Arthrospira) platensis* ethanolic crude extract. Given as dietary supplement, *S. (Arthrospira) platensis* decreased creatin kinase activity by 27.21%. Both treatments decreased the photodamage keeping the epidermal integrity and increasing the number of hair follicles which occasionally produced double or triple hairs indicating that *S. (Arthrospira) platensis* is a promising source of natural compounds with anti-aging effect.

**Keywords:** *Cyanobacteria, Spirulina (Arthrospira) platensis, creatin kinase, mice, photodamage.*

## 1. Introducción

Los rayos ultravioleta lesionan los queratinocitos, melanocitos y fibroblastos cutáneos porque provocan la liberación de radicales libres, los cuales pueden producir la ruptura del ADN, dañar los lípidos de las membranas celulares e interferir con el funcionamiento celular (Herschenfeld y Gilchrest 1998). En consecuencia, la exposición repetida a la luz solar produce daños en la piel tales como arrugas, manchas y textura engrosada, y también alteraciones enzimáticas, dando como resultado su envejecimiento.

Este fotoenvejecimiento ocurre por exposición a radiaciones solares ultravioleta (UV) que se clasifican en ultravioleta A (UVA) de 320 a 400 nm, ultravioleta B (UVB) de 280 a 320 nm y ultravioleta C (UVC) de 100 a 290 nm. Las longitudes de onda entre 340 y 400 nm tienen efecto a nivel de dermis y actúan sinérgicamente con los rayos UVB en el fotoenvejecimiento y en la carcino-

génesis. El UVC es el principal agente de la carcinogénesis, y puede producir además quemaduras severas. La radiación UVC puede ser un problema para las personas que viven a gran altura sobre el nivel del mar, o en zonas con alta polución donde la capa de ozono está disminuida (Ke et al., 2008).

Existe un especial interés por encontrar una fuente natural que produzca compuestos bioactivos capaces de reducir el aumento en la producción de radicales libres originado por el estrés medioambiental, en particular por luz UV. En la búsqueda de este tipo de compuestos se ha señalado a las cianobacterias como fuente de numerosas sustancias bioactivas, tales como fitoreguladores con actividad de citocininas (Ördög y Pulz, 1996) que ejercen efecto anti-envejecimiento y regulan la división celular (Kieber, J. 2006). Tal es el caso de la citocinina sintética cinetina, que agregada a cultivos de piel humana, retrasa la aparición de características asociadas con el envejecimiento celular, evitando el daño oxidativo y

glioxidativo de las proteínas y el ADN (Arcuri, 2001; Hipkiss, 2001; Rattan, 2002). El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el efecto protector de *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cianobacteria) bajo la forma de complemento dietario o aplicación cutánea, en ratones expuestos a luz UVC.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Cepa cianobacteriana y obtención de biomasa

*Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cianobacteria) pertenece a la colección de cultivos del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biología de Cianobacteria, depositada en Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, adquirida comercialmente. Fue cultivada en un fotobiorreactor de 2 L de capacidad bajo un sistema semi-continuo, en medio Zarrouk (1966). El cultivo fue mantenido con luz fluorescente a  $45 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Quantum Radiometer Photometer, modelo LI-185B; Li-Cor, Lincoln, Nebraska 68504, USA), y un fotoperíodo de 12:12, aireación estéril y a temperatura controlada a 37°C.

Cada 15 días se retiró 1L de cultivo y se completó el nivel con adición de medio fresco. Para corroborar que el material biológico se encontraba en el mismo estado fisiológico se hicieron evaluaciones bioquímicas y de crecimiento. Valores promedio: densidad óptica promedio a 620 nm:  $0.168 \pm 0.003$ ; peso fresco promedio en g/100 mL de cultivo:  $10.00 \pm 1.476$ ; peso seco promedio en g/100 mL de cultivo:  $0.829 \pm 0.001$  y proteínas totales en mg/mL de cultivo  $0.175 \pm 1.60$ .

La biomasa de *S. platensis* obtenida fue separada del medio de cultivo por filtración, secada al aire, pulverizada y fraccionada en dosis para ser usada como complemento dietario. Con una alícuota de biomasa fresca se preparó el extracto crudo etanólico (Zulpa de Caire et al., 1990, modificado).

### 2.2 Ratones CF1

Hembras adultas crecidas y mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires).

### 2.3 Diseño experimental

36 ratones CF1 de 6 meses ( $31.31 \pm 2.21$  g cada uno), se dividieron en 6 grupos de 6 ratones cada uno y se alojaron en jaulas individuales. Fueron alimentados durante 30 días con producto comercial balanceado con/sin complemento dietario y agua ad libitum según correspondiera, recibiendo diariamente los siguientes tratamientos:

I. Dieta Comercial (DC)

II. DC+ irradiación con UVC.

III. DC+ irradiación con UVC+flancos derecho e izquierdo depilados ( $1 \text{ cm}^2$ )

IV. DC+ irradiación con UVC+flancos derecho e izquierdo depilados ( $1 \text{ cm}^2$ ) +aplicación cutánea de cada flanco con 100  $\mu\text{L}$  de extracto etanólico de *S. platensis*.

V. DC+1.5 mg de *S. platensis* como complemento dietario

VI. DC+1.5 mg de *S. platensis* como complemento dietario+irradiación con UVC

En los tratamientos con irradiación (5 minutos) se utilizó una lámpara Philips, 4W/G4 T5 Holland.,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , colocada a 20 cm de distancia de los animales.

### 2.4 Parámetros morfológicos y bioquímicos

Los ratones se pesaron semanalmente. Para evaluar el daño celular al finalizar los tratamientos se extrajo sangre por punción ocular y se dosó la actividad de creatina cinasa (CC): ATP creatina N-fosfotransferasa, EC2.7.3.2 en plasma heparinizado, por el método UV optimizado (CC-NAC: creatina cinasa activada por N-acetil cisteína), con reactivos Wiener Laboratorios SAIC-Argentina.

### 2.5 Cortes histológicos

A los 30 días de tratamiento los ratones fueron anestesiados con éter etílico y luego

sangrados. Para el estudio de cortes histológicos seriados se obtuvieron muestras de piel de todos los tratamientos (de la parte depilada en el caso de los tratamientos 3 y 4). Dichas muestras fueron fijadas con formaldehído 4% en (solución amortiguadora) 0.1M fosfato para realizar cortes de crióstato, coloreados con el Tricrómico de Masson (Ibañez *et al.*, 2007) y posteriormente observadas al microscopio óptico (20x).

### 2.6 Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio con las repeticiones correspondientes en cada caso (n=6). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y para detectar diferencias entre tratamientos y entre diferentes tiempos se usó la prueba de Tukey HDS ( $p < 0.05$ ).

## 3. Resultados

Los tratamientos aplicados durante los 30 días del experimento no modificaron el peso corporal de los ratones adultos CF1 verificándose solamente alteraciones en el metabolismo y en la piel.

Para evaluar el daño celular se determinó la actividad de creatina cinasa en plasma de sangre heparinizada de los ratones para cada tratamiento (Tabla 1). La actividad de la enzima aumentó un 28.59% en el tratamiento II (DC+irradiación con UVC) respecto del control I (DC). El daño celular medido por la enzima creatina cinasa fue mayor, con un 41.86%, en el tratamiento III (DC+irradiación con UVC+flancos derecho e izquierdo depilados, 1 cm<sup>2</sup>) con respecto al control I (DC). La depilación de los flancos derecho e izquierdo acentúa en un 10.32% el aumento de la enzima con respecto al tratamiento II no rasurado. Por otra parte, la actividad de creatina cinasa disminuye un 44.23 y 49.44% en el tratamiento IV (DC+ irradiación con UVC+flancos derecho e

izquierdo depilados (1cm<sup>2</sup>) + aplicación cutánea en cada flanco con 100 µL de extracto etanólico de *S. platensis*), con respecto a los controles irradiados (II y III). En el tratamiento V (DC+1.5 mg de *S. platensis* como complemento dietario), la actividad de creatina cinasa no muestra diferencia significativa con respecto al tratamiento I; mientras que en el tratamiento VI (DC+1.5 mg de *S. platensis* como complemento dietario + irradiación con UVC), la actividad de creatina cinasa disminuye un 27.21% con respecto al tratamiento II.

Los estudios histológicos muestran que en el tratamiento I la piel está completamente recubierta por la epidermis (Figura 1). Los folículos pilosos son cortos, no pasan al celular subcutáneo, encontrándose posiblemente en la fase de catagen o telogen (Cotsarelis, 2006). En contraste, la irradiación con UVC (tratamiento II) provoca la pérdida de epidermis, observándose zonas de dermis desnuda. Los folículos pilosos se encuentran en una etapa aparentemente regresiva, muchos incluso carecen de pelo (Figura 2). En el tratamiento III, que difiere del II por los flancos depilados, se observa lo mismo que en el caso anterior (Figura 3). En el tratamiento IV en el que la piel depilada está protegida por una aplicación con extracto de *S. platensis*, la epidermis está conservada a pesar de la irradiación mostrando más folículos que en los especímenes no tratados. El extremo basal del folículo parece tener una forma diferente y se aproxima al celular subcutáneo; lo cual podría ser el comienzo de anagen. Se observan folículos con pelos dobles o triples (Figura 4). Los animales que recibieron *S. platensis* como complemento dietario no mostraron diferencias con el tratamiento I (Figura 5). La epidermis está conservada. Los folículos pilosos son cortos, no pasan al celular subcutáneo, en tanto que en el tratamiento VI donde los

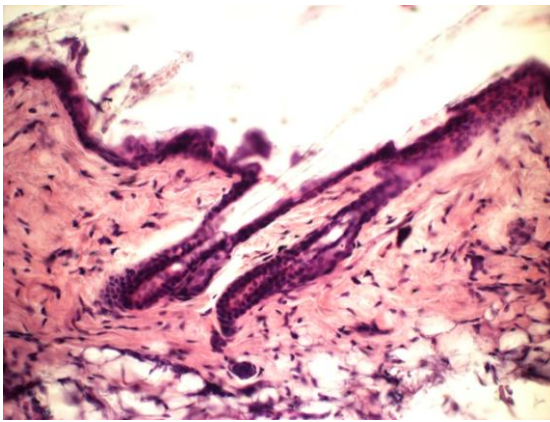
animales son irradiados con luz UVC, los folículos se encuentran en fase de crecimiento (anagen), son más largos y

tienen un bulbo muy desarrollado, además de mostrar una epidermis completa (Figura 6).

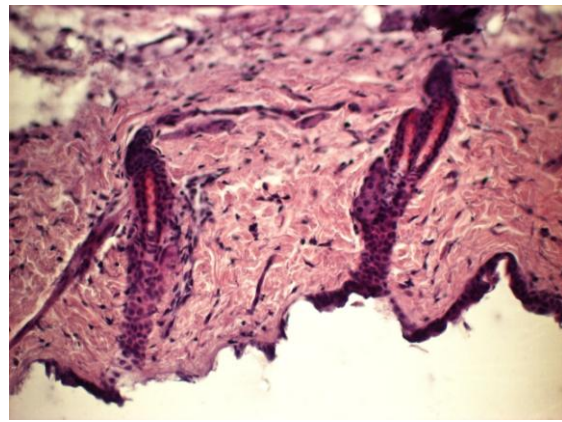
**Tabla 1:** Actividad enzimática de creatina cinasa (U/L) en plasma heparinizado de ratones bajo tratamientos del I al VI.

TRATAMIENTOS					
I	II	III	IV	V	VI
48.80±0.35 <sup>a</sup>	62.75±0.50 <sup>b</sup>	69.23±0.45 <sup>c</sup>	35.00±0.35 <sup>a</sup>	44.71±0.46 <sup>a</sup>	45.67±0.28 <sup>a</sup>

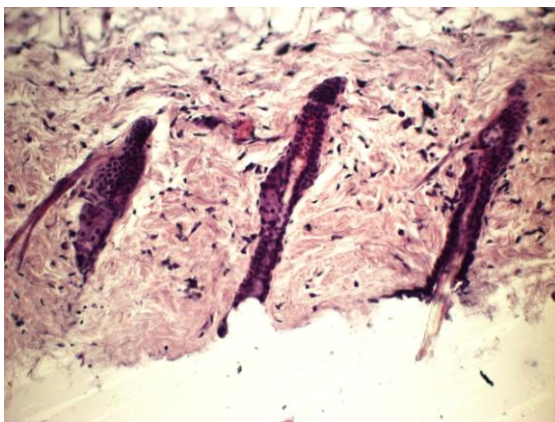
Tratamientos: I. Dieta Comercial DC; II. DC+5 min diarios de irradiación con UVC; III. DC+5 min diarios de irradiación con UVC con flancos derecho e izquierdo depilados; IV. DC+5 min diarios de irradiación con UVC con +flancos derecho e izquierdo depilados + aplicación cutánea en cada flanco con extracto etanólico 100 µL de *S.(Arthrospira) platensis* ; V. DC+1.5mg de *S.(Arthrospira) platensis* como suplemento dietario; VI. DC+1.5mg de *S. (Arthrospira) platensis* como suplemento dietario+5 min diarios de irradiación con UVC. Diferentes letras indican diferencias significativas (p< 0.05).



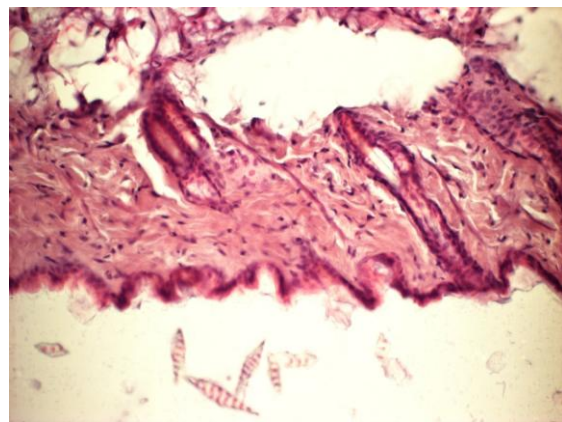
**Figura 1.** Corte histológico de piel de ratones CF1 del Tratamiento I.



**Figura 2.** Corte histológico de piel de ratones CF1 del Tratamiento II.

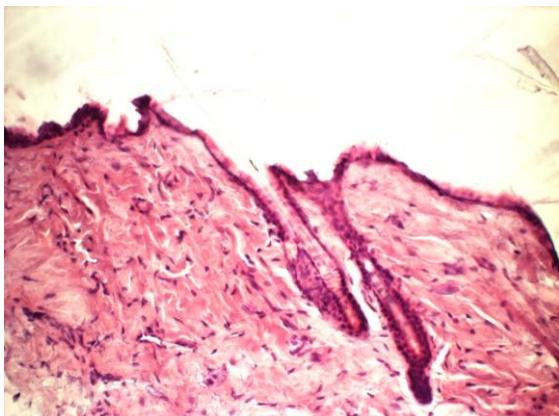


**Figura 3.** Corte histológico de piel de ratones CF1 del Tratamiento III.

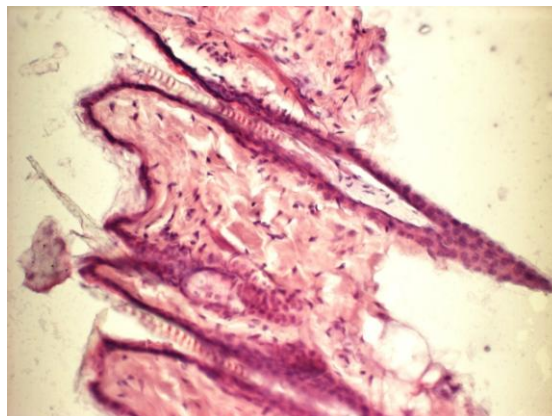


**Figura 4.** Corte histológico de piel de ratones CF1 del Tratamiento IV.





**Figura 5.** Corte histológico de piel de ratones CF1 del Tratamiento I.



**Figura 6.** Corte histológico de piel de ratones CF1 del Tratamiento IV.

#### 4. Discusión

Se sabe que niveles altos de creatina cinasa indican una alteración del funcionamiento celular que puede darse por diversos factores tales como la edad, el género, la raza, la masa muscular, la actividad física y la condiciones ambientales (Brancaccio *et al.*, 2008). Si bien en la bibliografía consultada no se consignan datos referentes a la relación entre los niveles de CC y tratamientos con *S. (Arthrospira) platensis*, hemos observado, en las condiciones de nuestro experimento, que tanto la ingesta de *S. (Arthrospira) platensis* como la aplicación de sus productos intracelulares protegen contra el fotodaño. Este efecto podría deberse a la presencia en *S. (Arthrospira) platensis* de sustancias con actividad biológica, tales como: reguladores del crecimiento vegetal,  $\beta$  carotenos, vitaminas, etc. (Zulpa de Caire *et al.*, 1979; Kapoor y Mehta, 1993). El efecto benéfico se verifica también en los estudios histológicos realizados, que muestran resultados similares a los inferidos por actividad de la CC.

#### 5. Conclusiones

Tanto la ingesta de *S. (Arthrospira) platensis* como la aplicación cutánea con extracto crudo etanólico de la biomasa protegen

contra el fotodaño, medido por la actividad de la enzima CC indicadora de daño celular. Así, *S. (Arthrospira) platensis* produce sustancias con efecto benéfico dando protección a la epidermis y favoreciendo el incremento del número de folículos pilosos que en algunos casos dan origen a pelos dobles y triples.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación indica que *S. (Arthrospira) platensis* es una fuente promisoría de productos naturales con efecto antienvjecimiento.

#### Reconocimientos

Dra Ángela Suburo, Universidad Austral, Argentina. (CONICET), por la realización e interpretación de los cortes histológicos.

Wiener Laboratorios SAIC-Argentina, por la gentil donación de los reactivos utilizados en la determinación de la actividad enzimática.

Este trabajo ha sido realizado en el marco del subsidio UBACYT X844, de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

#### Referencias

- Arcuri, A.M. 2001. N<sup>o</sup> furfuryladenina. *Dermac* 1:42-43.
- Brancaccio, P., Maffulli, N., Buonauro, R., Limongelli, F.M. 2008. Serum enzyme

- monitoring in sports medicine. *Clinical J Sports Medicine* 27(1):1-18.
- Cotsarelis, G. 2006. Epithelial stem cells: A folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 126:1459-1468.
- Herschenfeld, R.E., Gilchrest, B.A. 1998. The accumulative effects of ultraviolet radiation on the skin: photoageing. In: Hawk, J.L.M. (Ed) Photodermatology. Oxford University Press. New York, USA. pp 69-87.
- Hipkiss, A.R. 2001. On the struggle between chemistry and biology during aging. Implications for DNA repair, apoptosis and proteolysis, and a novel route of intervention. *Biogerontology* 2(3):173-178.
- Ibañez, J., Sosa, F., Verón, G., Vadillo, C., Aguirre, J., Navarro, S., Acevedo, S. 2007. Falso pseudoaneurisma del ventrículo izquierdo. *Rev Argent Cardiol* 75(5):21-23.
- Kapoor, R., Mehta, U. 1993 Utilization of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis* by rats. *Plant Food Hum Nutr* 43:1-7.
- Ke, M.S., Camouse, M.M., Swain, F.R., Oshtory, S., Matsui, M., Mammone, T., Maes, D., Cooper, K.D., Stevens, S.R., Baron, E.D. 2008. UV protective effects of DNA repair enzymes and RNA lotion. *Photochem Photobiol* 84(1): 180-184.
- Kieber, J. 2006. Cytokinins: Regulators of cell division. In: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.) Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts. pp. 543-569.
- Ördög, V., Pulz, O. 1996. Diurnal changes of cytokinin-like activity in a strain of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria), determined by bioassay. *Algological Studies* 82:57-67.
- Rattan, S.I.S. 2002. N<sup>6</sup>-Furfuryladenine (kinetin) as a Potential Anti-Aging Molecule. *J Anti-Aging Med* 5(1):113-116.
- Zarrouk, C. 1966. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Garner) Geitler. Tesis PhD Universidad de París, Francia. 198 p.
- Zulpa de Caire, G., Zaccaro de Mulé, M.C., Storni de Cano, M. 1979. Productos extracelulares de *Nostoc muscorum* Ag. (cepa 79 a) obtenidos en medios con y sin nitrógeno combinado. I: sus efectos sobre plántulas de arroz. *Int J Exp Bot (Phyton)* 37(1):1-13.
- Zulpa de Caire, G., Storni de Cano, M., Zaccaro de Mulé, M.C., Halperin, D.R. de. 1990. Antimycotic products from the Cyanobacterium *Nostoc muscorum* against *Rhizoctonia solani*. *Int J Exp Bot (Phyton)* 51(1):1-4.