

La especie vegetal *Phyllanthus orbicularis* Kunth: Evaluación de sus potencialidades genotóxicas y antígenotóxicas

Autoría principal

Angel Sánchez Lamar¹, Jorge Luis Fuentes Lorenzo², Monserrat Llagostera Casal³, Mirle Ferrer Pérez³.

Otros autores

Alena Alonso², Jordi Barbé³, Marioly Vernhes², Elizabeth Cuétara⁴, Mario Fiore⁵, Rosella De Salvia⁵, Enrico Cundari⁵, Renata Cozzi⁶.

Colaboradores

Gladys Fonseca López¹, Nancy Cápiro Trujillo¹, Ligia Baluja Millares¹, Enrique F. Prieto Miranda³, Nadine Alvarez³, Alba Álvarez³, Tatiana Festary⁴, Jeannete Rico⁴, Ruggero Ricordy⁵, Paolo Perticone⁵, Francesca Degrassi⁵, Carles Cristófol³.

Entidad ejecutora principal

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25, No.455,Vedado, C. Habana, Cuba.

Entidades participantes

²Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN), Calle 30 No. 502, Playa, C. Habana.

³Universidad Autónoma de Barcelona. Dpto. de Genética y Microbiología, Barcelona, España.

⁴Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y F, Vedado, C. Habana, Cuba.

⁵Istituto di Biologia e Patologia Molecolare, CNR, Roma, Italia.

⁶Dipartimento di Biologia, Università "Roma TRE", Roma, Italia.

Autor para correspondencia

Angel Sánchez Lamar.

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, UH.

Calle 25, No. 455, e/ I e J, Vedado, Plaza, C. Habana, Cuba. Fax: 8321321.

Telefono: 8328542

E-mail: alamar@fbio.uh.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ Dr. **Angel Sánchez-Lamar** (30%): Profesor Titular, Jefe del Grupo de Genética Toxicológica de la Facultad de Biología.
- ✓ Dr. **Jorge Luis Fuentes Lorenzo** (20%): Investigador Auxiliar, del Departamento de Radiobiología del CEADEN.
- ✓ Dra. **Monserrat Llagostera Casal** (20%): Investigadora Principal del Departamento de Genética i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.
- ✓ Dra. **Mirle Ferrer Pérez** (10%): Investigadora del Departamento de Genética i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.
- ✓ MSc. **Alena Alonso Martín** (5%): Investigadora Agregada, Departamento de Radiobiología del CEADEN.

- ✓ Dr. **Jordi Barbé** (3%): Jefe del Departamento de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.
- ✓ MSc. **Mariolys Vernhe Tamayo** (2%): Investigadora Agregada, Departamento de Radiobiología del CEADEN.
- ✓ MSc. **Elizabeth Cuétara Lugo** (2%): Investigadora Agregada del INOR.
- ✓ Dr. **Mario Fiore** (2%): Técnico de primer grado del Istituto di Biologia e Patologia Molecolare, CNR, Roma.
- ✓ Dra. **Rosella De Salvia** (2%): Investigadora Agregada del Istituto di Biologia e Patologia Molecolare, CNR, Roma.
- ✓ Dr. **Enrico Cundari** (2%): Investigador Titular del Istituto di Biologia e Patologia Molecolare, CNR, Roma.
- ✓ Dra. **Renata Cozzi** (2%): Profesora Auxiliar del Departamento de Biología, Tercera Universidad de Roma.

Resumen

Las mutaciones en el DNA de células somáticas están involucradas en la patogénesis de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer y la aterosclerosis. En la aplicación de medidas quimiopreventivas más racionales para estas afecciones de la salud humana, se ha incrementado el empleo de las plantas, o productos derivados de ellas (pigmentos, vitaminas, carotenos, flavonoides), como sustancias capaces de reducir o inhibir la actividad de agentes mutagénicos y/o carcinogénicos. Cuba cuenta con una vasta flora y tradición popular en el uso de la medicina verde; sin embargo, los estudios dirigidos a la evaluación genético-toxicológica y a la acción antimutagénica de ésta, son realmente escasos. La especie *Phyllanthus orbicularis* Kunth (Euphorbiaceae), es una especie endémica cubana, científicamente avalada por poseer actividad antiviral frente al virus de la hepatitis B, al virus herpes bovinos tipo-1 (BHV-1) y a los herpes simple HSV-1 y HSV-2. También se conocen datos acerca de su toxicidad sistémica (tanto aguda como subcrónica), composición fitoquímica y evaluación farmacognóstica. En la presente propuesta, se resumen los resultados obtenidos por un equipo multidisciplinario de investigadores, al estudiar la genotoxicidad y la antigenotoxicidad del extracto acuoso de *P. orbicularis*. En las publicaciones que contienen dichos resultados (nueve artículos en revistas científicas de visibilidad internacional) se presenta la evaluación genotóxica pormenorizada del extracto vegetal, realizada con una batería de diferentes ensayos de genotoxicidad. También se caracterizan su bioactividad protectora del DNA, describiéndose las bases fundamentales de los mecanismos de acción antimutagénica frente a reconocidos mutágenos modelos, tanto de naturaleza física como química (rayos-x y γ , peróxido de hidrógeno, mitomicina C, aminas aromáticas e hidrocarburos policíclicos aromáticos). La caracterización tóxicol-genética tributa a los estudios preclínicos requeridos para iniciar el uso de esta especie en tratamientos antivirales. Por otra parte, el hallazgo de su capacidad de proteger al DNA, amplía el conocimiento acerca del potencial terapéutico que posee y aportando información esencial para proponer su empleo en la terapia de enfermedades relacionadas con las mutaciones somáticas. El conjunto de los resultados propuestos a premio contribuyen al cumplimiento de una de

las líneas priorizadas de trabajo del Ministerio de Salud Pública: “avaluar científicamente el uso de plantas medicinales”. Ellos han sido presentados y defendidos, exitosamente, a través de: dos tesis doctorales, cuatro tesis de maestría, siete tesis de diploma y diez eventos científicos (cinco internacionales y cinco nacionales). A su vez, han sido objeto de cuatro reconocimientos o premios, entre ellos: "Premio al resultado científico más destacado, de la Agencia de Energía Nuclear y Avances Tecnológicos del CITMA". (2004) por el trabajo titulado "Mecanismos de genotoxicidad y antigenotoxicidad del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* HBK".

Comunicación Corta

Introducción

Las mutaciones en el DNA de células somáticas están involucradas en la patogénesis de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer, la aterosclerosis y afecciones neurodegenerativas. (Riley *et al.*, 2012; Cervelli *et al.*, 2012; Zech *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014). Con el objetivo de mejorar la salud humana, se han incrementado las investigaciones encaminadas a la aplicación racional de medidas quimiopreventivas en las enfermedades relacionadas con la mutación somática. En este sentido, diversos extractos de plantas o productos derivados de ellas (pigmentos, vitaminas, carotenos, fenolactonas, flavonoides y taninos) han sido identificados como sustancias capaces de reducir o inhibir la actividad de agentes mutagénicos (De Flora and Izzotti, 2007; Nagy *et al.*, 2009;). Especies como: *Maytenus ilicifolia*, *Peltastes peltatus* y *Camellia sinensis* (té verde), son reconocidas por el potente efecto antimutagénico y/o anticarcinogénico de sus fitocomponentes polifenólicos (Horn and Ferraõ, 2003; Katiyar, 2011). En ocasiones, existen géneros en los que una buena proporción de sus especies tienen propiedades quimioprotectoras. Tal es el caso del género *Phyllanthus* (Phyllanthaceae), con especies ampliamente usadas por la medicina tradicional en países de Asia, África, América del Sur y el Caribe (Thyagarajan *et al.*, 1988; Unander *et al.*, 1990) y en el que, varias de ellas, poseen propiedades antivirales, antioxidante, anticlastogénica y antimutagénica.

Cuba cuenta con una vasta flora y tradición popular en el uso de la medicina verde; sin embargo, los estudios dirigidos a la evaluación genético-toxicológica y a la acción anticarcinogénica de ésta, son realmente escasos. *Phyllanthus orbicularis* Kunth, es una especie endémica cubana queha sido avalada científicamente por su actividad antiviral frente al virus de la hepatitis B, el virus herpes bovinos tipo-1 (BHV-1) y los herpes simple HSV-1 y HSV-2 (del Barrio *et al.*, 1994; del Barrio y Parra, 2000; Fernández Romero *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2009; Roques, 2011).

Así mismo, del extracto acuoso obtenido de ella, se han publicado estudios relacionados con su toxicidad sistémica (tanto aguda como subcrónica), farmacognosia y composición fitoquímica (Rivera, 1995; Gutiérrez *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la política para la protección del ambiente en correspondencia con el lineamiento 133 del PCC, nuestro trabajo se orientó a evaluar la citotoxicidad, genotoxicidad y antigenotoxicidad del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*.

Citotoxicidad del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*.

El extracto acuoso de *P. orbicularis* es una mezcla compleja de sustancias naturales en la que pueden coexistir componentes con efectos beneficiosos o perjudiciales para la salud humana. Los estudios precedentes acerca de su composición revelaron la presencia de saponinas, taninos, fenoles, alcaloides y flavonoides, que son familias fitoquímicas a las que pertenecen sustancias con efecto tóxico (*Imanishi et al., 1991; Jinsart et al., 1992*). La citotoxicidad del extracto fue evaluada con la línea celular de cultivo permanente CHO (células de ovario de Hamster chino). Se tomaron en consideración los parámetros siguientes: el crecimiento de la población celular, el índice mitótico (IM), la capacidad de formar colonias (CFC) y las fases del ciclo celular. Esto permitió conocer la relación existente entre las concentraciones aplicadas a las células y los efectos tóxicos producidos. Por debajo de los 100 µg/mL, más allá de ser inocuo, el extracto resultó beneficioso para la sobrevivencia celular. Sin embargo, aplicado a concentraciones superiores a su LD₅₀ (639 µg/mL), reducción de la CFC y el IM, inducción de apoptosis y acumulación de células retenidas en fase G₁ y G₂. Esta evaluación constituye un complemento fundamental, a nivel celular, de los estudios preclínicos que se exigen para introducir una especie en las prácticas fitoterapéuticas de la medicina cubana. La capacidad de bloquear la proliferación celular en la fase G₂ y de inducir apoptosis constituyen propiedades de esta planta que, por primera vez, fueron puestas en evidencia con este trabajo. Así mismo, potencialmente, pudieran ser de utilidad en la quimioterapia de enfermedades tumorales.

Caracterización genotóxica del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*.

La evaluación genotóxica de sustancias con propiedades terapéuticas científicamente demostradas, es otro de los requisitos preclínicos exigidos por las agencias internacionales que regulan los procedimientos a seguir en el desarrollo de nuevos fármacos (ICH, 1995; OCED, 2006). Tal evaluación se realiza en el intervalo de concentraciones en que el agente evaluado no causa efectos tóxicos letales. En este sentido, el estudio de citotoxicidad precedente permitió conocer cuál era ese intervalo de referencia para evaluar la genotoxicidad de *P. orbicularis* en ensayos in vitro.

Como examen preliminar de la genotoxicidad de este extracto se probó si era capaz de inducir aberraciones cromosómicas en células CHO. Los tratamientos de 3 y 18 h (con y sin activación metabólica) no indujeron aberraciones cromosómicas. No obstante, el hecho de que el daño genético puede expresarse a diferentes niveles de complejidad de la organización biológica, conlleva a que los estudios de genotoxicidad, científicamente rigurosos, se realicen con el empleo de una batería de ensayos capaces de registrar la genotoxicidad a nivel de la molécula de DNA, el gen y los cromosomas. La aplicación de este principio metodológico, en nuestra investigación, derivó en los resultados siguientes: i) en la evaluación del daño genético a nivel de la estructura primaria del DNA, se emplearon los ensayos SOS Chromotest (*Escherichia coli*) y Conversión génica (*Saccharomyces cerevisiae*), en ninguno de ellos se obtuvo resultados de genotoxicidad positiva, ii) a nivel de gen, se examinó la capacidad mutagénica con ensayos de reversión génica en dos modelos experimentales diferentes: *Salmonella typhimurium* (Test Ames) y *Saccharomyces cerevisiae* (Cepa D7 ileu⁻), en ningún caso se obtuvo mutagenicidad positiva, iii) el análisis de la

genotoxicidad a nivel cromosómico contó con los ensayos de aberraciones cromosómica, micronúcleos y anafases anormales; el primero de ellos ratificó el resultado preliminar de que el extracto no produce efecto clastogénico sobre los cromosomas, los dos últimos pusieron en evidencia que, a las concentraciones que producen toxicidad sistémica (0.5 mg/mL) de las células, el extracto induce daño aneugénico lo cual significa que es capaz de interferir con la segregación cromosómica. Este conjunto de resultados permitió establecer, en base a ensayos in vitro, un perfil genotóxico del extracto; a fin de confirmarlo se aplicó el ensayo in vivo SMART, en alas de *Drosophila melanogaster*, con el cual es posible detectar simultáneamente eventos mutagénicos, recombinogénicos, clastogénicos y aneugénicos. Los resultados fueron concordantes con la evidencia de que, en tratamientos que producen alta toxicidad sistémica, el extracto induce daño aneugénico. En la conclusión, a dosis no tóxicas, *P. orbicularis* no es genotóxico; el efecto aneugénico aparece sólo a concentraciones muy superiores a las que ejerce su acción antiviral.

Propiedades antigenotóxicas del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*.

P. orbicularis es una fuente natural de agentes capaces de reducir o inhibir el daño genético inducido por xenobióticos. La investigación llevada a cabo demostró que el extracto acuoso de esta planta posee un amplio perfil antigenotóxico, protege al DNA frente a peróxido de hidrógeno, mitomicina-c y rayos-x; actúa como antimutágeno frente a las aminas aromáticas m-fenilendiamina (m-PDA), 2-aminofluoreno (2-AF), 1-aminopireno (1-AP), 2-aminoantraceno (2-AA) y 9-aminofenantreno (9-AP), tal efecto se produjo con el siguiente orden decreciente: m-PDA > 2-AA > 2-AF > 9-AP > 1-AP; así mismo, frente al hidrocarburo policíclico aromático B(a)P, la azida sódica y la metil-nitro-nitrosoguanidina; reduce la genotoxicidad de las radiaciones gamma. En total, este producto vegetal es activo en reducir o (en algún caso) inhibir completamente la genotoxicidad de 12 xenobióticos diferentes cuya naturaleza y modos de dañar al DNA pueden diferir. Ello presupone que, desde el punto de vista mecanístico, el extracto contiene sustancias que protegen tanto ante mutágenos directos como promutágenos, ya sean físicos como químicos, oxidantes o alquilantes. En este sentido, la presente investigación ha logrado dilucidar que: la acción como secuestrador de radicales hidroxilo, la asociación química directa con el mutágeno, la inhibición de enzimas activadoras de promutágenos y alguna forma de activar mecanismos celulares que eliminen el daño ya producido, figuran entre los modos de acción de este extracto para ejercer su protección, según sea la circunstancia experimental. El hallazgo de esta propiedad es el componente de originalidad científica más importante en este trabajo ya que amplía las potencialidades de uso terapéutico de esta especie vegetal.

Conclusiones

El extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* es un producto vegetal que, al ser aplicado en concentraciones no citotóxicas (<639 µg/mL) a células de mamíferos, no induce daño genético. Ello significa que posee una potencialidad genotóxica prácticamente nula y que puede ser recomendado para su uso como antiviral en fase de ensayos clínicos. Adicionalmente, es un potente agente protector del DNA, con amplio perfil de acción antigenotóxica y antimutagénica, propiedad que lo avala como candidato farmacológico promisorio para el desarrollo de nuevas estrategias

quimiopreventivas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las mutaciones somáticas.

Bibliografía

- Álvarez AL, del Barrio G, Kouri V, Martínez PA, Suárez B, 22. Parra F. In vitro anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Phytomedicine*. 2009; 16: 960-6.
- Cervelli T., Borghini A., Galli A. and Andreassi M.G. (2012). DNA Damage and Repair in Atherosclerosis: Current Insights and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 16929-16944.
- Del Barrio G, Caballero O, Rivas LD, García D. (1994). Efectos de *Phyllanthus orbicularis* sobre el HBsAg del virus de la hepatitis B. *Avances Biotecnol Modern*, 2, 236.
- Del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity 17. of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J ethnopharmacol*. 2000; 72: 317-22.
- Deng H., Gao K., Jankovic J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology* 10, 337–348.
- Fernández Romero JA, Del Barrio Alonso G, Romeu Alvarez B, Gutiérrez Y, Valdés VS, Parra F. (2003). In vitro antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. *Phytother Res*, 17, 980–982.
- Gutiérrez Y, Miranda M, del Barrio G, Varona N, Mayoral 21. JL. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica preliminar de *Phyllanthus orbicularis*. *Rev Cuba Farm*. 2000; 34: 56-62.
- Horn R.C. and Ferraõ V.M. (2003). Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis* 18(2), 113–118.
- Imanishi, H., Sasaki, Y. F., Ohta, T., Watanabe, M., Kato, T., and Shirasu, Y. (1991). Tea tannin components modify the induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen treated cultured mammalian cells and mice. *Mutat. Res*. 259(1), 79–87.
- Jinsart, W., Ternai, B., and Polya, G. M. (1992). Inhibition of rat liver cyclic AMP-dependent protein kinase by flavonoids. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 205–211. 23.
- Katiyar S. (2011). Green tea prevents non-melanoma skin cancer 8. by enhancing DNA repair. *Arch Biochem Biophys*. 508, 152-8.
- Nagy M., Križková L., Mučaji P., Kontšeková Z., Šeršeň F. and Krajčovič J. (2009). Antimutagenic Activity and Radical Scavenging Activity of Water Infusions and Phenolics from *Ligustrum* Plants Leaves. *Molecules* 14, 509-518.
- OECD (2006) Test Guidelines – Health Effects OECD Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects Test No. 482: Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro. OECD Publishing, 23/10/1986 - 7 páginas
- Riley BD, Culver JO, Skrzynia C, *et al*. Essential elements of genetic cancer risk assessment, counseling, and testing: updated recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling* 2012; 21(2):151–161.
- Rivera F, Vidal AT, Lòpez EM, Ferrer M, Sotolongo ME. (1995). Toxicidad aguda y subcrònica de un extracto de *Phyllanthus orbicularis*. *Rev. Cubana Farm. (Supl. Especial)* 30, 35–36.

Roque A. (2011). Efecto de *Phyllanthus orbicularis* sobre la viabilidad celular y el antígeno de superficie de la hepatitis B en células PLC/PRF/5. - Revista Cubana de Farmacia 45(4), 536-544.

Silvio De Flora *, Alberto Izzotti (2007). Mutagenesis and cardiovascular diseases Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. Mutation Research 621, 5–17.

Thyagarajan, S. P., Thirunalasundari, T., Subramanian, S., Venkateswaran, P. S., and Blumberg, B. S. (1988). Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. Lancet 2, 764–766.

Unander D.W., P.S. Venkateswaran, I. Millman, H. Bryan, B.S. Blumberg (1990) *Phyllanthus* species: Sources of new antiviral compounds, In: J. Janick, J.E. Simon (eds.), Advances in new crops, Timber Press, Portland, O.R. pp:518-521.

Zech M., Nübling G., Castrop F., Jochim A. *et al.* (2013). Disease Gene Mutations and Age-Related Neurodegenerative Disorders. PLoS One 8(12), e82879.

Publicaciones

1. Sánchez-Lamar, A, Cozzi, R, Cundari, E, Fiore, M, Ricordy, R. and De Salvia, R. (1999) *Phyllanthus orbicularis* aqueous extract cytotoxic, genotoxic and antimutagenic effects in the CHO cell line. Toxicol. Appl. Pharmacol., 161: 231-239. (Grupo 1, FI: 3,63)
2. Ferrer M., A. Sánchez- Lamar, J.L. Fuentes, J. Barbé, M. Llagostera. (2001) Studies on the antimutagenesis of *Phyllanthus orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. Mutation Research 498: 99- 105. (Grupo 1, FI: 2,48)
3. Ferrer M., A. Sánchez- Lamar, J.L. Fuentes, J. Barbé, M. Llagostera. (2002) Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using Salmonella assay. Mutation Research 517: 251-254. (Grupo 1, FI: 2,48)
4. Sánchez- Lamar A., J.L. Fuentes, G. Fonseca, N. Cápiro, M. Ferrer, A. Alonzo, L. Baluja, R. Cozzi, R. De Salvia, M. Fiore, M. Llagostera. (2002) Assessment of the potencial genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using *in vitro* and *in vivo* assays. Toxicology Letters 136/2: 87-96. (Grupo 1, FI: 3.24)
5. Ferrer M., C. Cristófol, A. Sánchez-Lamar, J.L. Fuentes, J. Barbé, M. Llagostera (2004) Modulation of rat and human cytochromes P450 involved in PhIP and 4-ABP activation by an aqueous extract of *Phyllanthus orbicularis*, Journal of Ethnopharmacology 90: 273–277. (Grupo 1, FI: 2,26)
6. Alonso A., Fuentes J.L., Prieto E., Sánchez-Lamar A., Ferrer M., Barbe J. and Llagostera M., (2005). Antigenotoxic effect of the aqueous extract of *Phyllanthus orbicularis* HBK in γ -irradiated *Escherichia coli* cells. Recent Progress in Medicinal Plants (Houston) 10,15-23. (Grupo 1, FI: 0,0)
7. Jorge Luis Fuentes, Alena Alonso, Elizabeth Cuétara, Mariolys Vernhe, Nadine Alvarez, Angel Sánchez-Lamar and Montserrat Llagostera, (2006). Usefulness of the SOS Chromotest in the study of medicinal plants as radioprotectors. Int. J. Radiat. Biol. 26(2), 1 – 7. (Grupo 1, FI: 2,17)
8. Alonso A., Fuentes J.L., Sánchez-Lamar A., Llagostera M. (2010). Antimutagenic Effect of *Phyllanthus orbicularis* Against gamma-Radiation. Lat. Am. J. Pharm. 29(1), 1-5. (Grupo 2, FI: 0.31)

9. Cuétara E.B., Alba Álvarez, Alena Alonso, Mariolys Vernhe, Angel Sánchez-Lamar, Tatiana Festary and Jeannete Rico (2012). A microanalytical variant of the SOS Chromotest for genotoxicological evaluation of natural and synthetic products. *Biotecnología Aplicada* 29:108-112. (Grupo 3, FI: 0,0)