

PHYLLANTHUS ORBICULARIS KUNTH: UNA ESPECIE ENDÉMICA CUBANA CON POTENCIAL PARA LA OBTENCIÓN DE DROGAS ANTIVIRALES

Autores principales: Gloria del Barrio Alonso¹ y Annele Roque Quintero

Otros autores: Vivian Kourí Cardellá y Luis Morier Díaz

Colaboradores: Francisco Parra Fernández, María de Oña, Suria Valdés García, Omelio Caballero Pérez, Luis Sarmiento Pérez, Licel Rodríguez Lay, Iriam Salazar Gutiérrez

Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana (UH). Calle 25 e/ J e I No 455. Vedado. Plaza de la Revolución. Teléfono. (07) 8321321, 8329241. Fax. (07) 8321321.

Otra entidad participante: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK)

¹ Autor de correspondencia. Correo electrónico gbarrio@infomed.sld.cu

² Autor de correspondencia. Correo electrónico aroque@fbio.uh.cu

Dra. Gloria del Barrio Alonso (43%). Diseñó y estableció la metodología de trabajo a realizar y el enfoque multidisciplinario de la investigación. Estableció la metodología para la pesquisa primaria y secundaria de la actividad antiviral que integra métodos convencionales (basados en ensayos *in vitro*, en cultivos celulares y marcadores virales clásicos) con herramientas de biología molecular, empleando placas de 96 pocillos y la determinación de ECP o criterios metabólicos en la medición de tal actividad. Participó activamente en la divulgación de los resultados a través de la tutoría de tesis de doctorado y maestrías en la temática, la elaboración de artículos científicos, un capítulo de un libro y la presentación de ponencias en congresos nacionales e internacionales. Es la coordinadora general por la parte cubana de los proyectos internacionales que financian parcialmente las investigaciones realizadas.

Dra. Annele Roque Quintero (43%). Participó en el asesoramiento de la estrategia diseñada y ejecutada para estudios antivirales. Diseñó y estableció la metodología de trabajo a seguir en los ensayos primarios y secundarios dirigidos a la evaluación antiviral frente al virus de la Hepatitis B (VHB). Fue la responsable directa de los ensayos bioquímicos y moleculares acerca del modo de acción de compuestos frente a VHB y en parte de los estudios de determinación de ADN con herpesvirus. Detectó y relacionó la presencia de determinados metabolitos en la planta y su posible acción en la actividad anti-hepatitis B. Participó activamente en la divulgación de los resultados a través de su Tesis doctoral, la elaboración de

artículos científicos, la presentación de ponencias en congresos nacionales e internacionales, y la tutoría de tesis de diplomas.

Dra. Vivian Kourí Cardellá (7%). Participó en parte del estudio anti-herpesvirus con el diseño de varios ensayos, fundamentalmente en el estudio con citomegalovirus y el análisis de los resultados del trabajo con estos agentes virales, así como en la escritura de algunos de los artículos científicos publicados.

MC. Luis Morier Díaz (7%). Participó con el servicio de los cultivos celulares para diversos ensayos antivirales. Colaboró en el diseño de estrategias de evaluación y análisis de resultados.

RESUMEN

La alta prevalencia de infecciones por agentes virales, así como su repercusión económica y social, hacen necesario el desarrollo de terapias antivirales efectivas. La evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de *Phyllanthus orbicularis* Kunth mostró una inhibición de la infectividad viral de herpesvirus (VHS-1, VHS-2) y enterovirus, así como una disminución de los niveles de diferentes marcadores virales de replicación de citomegalovirus humano (HCMV) y virus de la hepatitis B (VHB), en ambos casos de manera dosis-dependiente. Se demostró que la acción *in vitro* de esta planta sobre la replicación de los virus VHS-1, VHS-2 y VHB involucra más de un modo de acción; y sus efectos no se limitan a la inactivación directa de la partícula viral, sino a la acción sobre blancos virales específicos. La evaluación de la actividad de diferentes fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico, evidenció que la presencia de compuestos fenólicos, que actúan de forma sinérgica, tales como galatos de catequina y epicatequina, procianidina C1 y oligómeros o polímeros de procianidinas posibilitan la acción antiviral frente a VHS y VHB. El impacto científico del presente trabajo radica en que se informa por primera vez la actividad antiviral del género *Phyllanthus* y su modo de acción *in vitro*, contra miembros de las subfamilias *Alphaherpesvirinae* y *Betaherpesvirinae*; es el primer reporte para esta especie de actividad frente a enterovirus y de inhibición de la replicación del VHB y su modo de acción frente a este virus; así como constituye el primer estudio de caracterización química guiado por bioensayo de los compuestos fenólicos de *P. orbicularis*. Este trabajo, que permitió además establecer una metodología de pesquisa para la evaluación de la actividad antiviral de productos naturales en nuestro país, se encuentra respaldado por 6 publicaciones en revistas nacionales e internacionales y una tesis doctoral. Con esta investigación se avalan las propiedades etnomédicas de esta planta y se evidencia la fuente potencial de compuestos anti-herpesvirus y anti-VHB que representa la especie *Phyllanthus orbicularis* Kunth para la industria farmacológica, especialmente en un escenario en el que se incrementa la aparición de mutantes drogo - resistentes de estos virus.

COMUNICACIÓN CORTA

La alta prevalencia de infecciones por agentes virales, así como su repercusión económica y social, hacen necesario el desarrollo de terapias antivirales efectivas. Dentro de los grupos virales de importancia clínico - epidemiológica, y que a su vez constituyen modelos para la evaluación y búsqueda de nuevos antivirales, dada su diversidad estructural y replicativa, destacan los herpesvirus, enterovirus y el virus de la Hepatitis B. En la actualidad, a pesar de la existencia de algunas drogas para el tratamiento de las enfermedades provocadas por estos virus, se necesitan nuevos fármacos que superen los elevados valores de resistencia, la baja tolerancia y los posibles efectos colaterales que pueden presentarse en algunos casos. Diversas estrategias han sido propuestas para la búsqueda y desarrollo de fármacos con acción antiviral, una de las cuales se enfoca en el estudio de los productos naturales, y en especial las plantas medicinales.

En nuestro país, pocos grupos de investigación se dedican al estudio de agentes antivirales a partir de fuentes naturales que permita avalar las propiedades etnomédicas de las plantas empleadas en el tratamiento de enfermedades asociadas a virus, así como el desarrollo de nuevos compuestos con posibilidad para ser empleados en la terapia de enfermedades virales.

El género *Phyllanthus* tiene una larga historia de uso popular para el tratamiento de numerosas enfermedades, entre las que destacan afecciones hepáticas, diabetes, infecciones intestinales, lesiones en piel y trastornos del aparato genitourinario, algunas de ellas de posible etiología viral. En Cuba existen varias especies de este género, entre las que se encuentra *Phyllanthus orbicularis* Kunth. Esta planta endémica cubana ha mostrado actividad antigenotóxica, antimutagénica y antioxidante (Sánchez-Lamar *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2009b; Gutiérrez *et al.*, 2011), así como la capacidad de inactivar el AgsHB presente en sueros positivos a este marcador y previamente tratados con el extracto de la planta (del Barrio y Roque, 1999).

Con tales antecedentes el presente trabajo estuvo dirigido a estudiar el potencial antiviral de la especie *P. orbicularis*, mediante una metodología que permitió la evaluación de la actividad frente a un panel de virus y la caracterización de dicha actividad a través de la determinación del efecto de diferentes extractos y fracciones químicas sobre la replicación viral y los principales marcadores en cultivos de células de algunos herpesvirus, y el virus hepatitis B (VHB).

Los ensayos de evaluación primaria en cultivos celulares de la actividad antiviral del extracto acuoso de *P. orbicularis*, permitieron establecer que esta especie poseía una fuerte acción antiviral *in vitro* frente a los virus envueltos evaluados

(herpesvirus (VHS-1, VHS-2, HCMV), VHB) y a los enterovirus (PV-1 y CVB5); y en menor medida frente al Adenovirus 7 (del Barrio y Parra, 2000; Álvarez *et al.*, 2009; del Barrio y Parra, 2011; Roque *et al.*, 2011). **Este es el primer informe de actividad antiviral de especies del género *Phyllanthus* frente a miembros de la familia *Herpesviridae* (del Barrio y Parra, 2000). Además, se demuestra por primera vez que la especie *Phyllanthus orbicularis* Kunth posee actividad antiviral.**

Los ensayos secundarios con miembros de la familia *Herpesviridae* mostraron que *P. orbicularis* inhibe la multiplicación *in vitro* de cepas de referencia y aislamientos clínicos de VHS-1 y VHS-2, independientemente de su sensibilidad al aciclovir (fármaco empleado en la actualidad para el tratamiento de enfermedades provocadas por estos virus, y frente al cual se incrementan la aparición de cepas resistentes). Esta acción es dependiente de la concentración y de la multiplicidad de infección empleadas (Álvarez *et al.*, 2009).

De igual forma se evidenció una inhibición dosis-dependiente de la replicación del VHB en cultivos de células, avalada por una reducción de los niveles de antígenos virales (AgeHB y AgsHB), así como del ADN viral, presentes en el medio del cultivo celular. **Con estos resultados se demuestra por primera vez que *P. orbicularis* posee actividad antiviral *in vitro* frente al VHB, dada por la inhibición de la replicación del virus a concentraciones no tóxicas (Roque, 2013).**

Debido a la necesidad de establecer el mecanismo de acción de esta planta frente a los herpesvirus y al VHB, se realizaron ensayos de tiempo de adición y de acción virucida, para los primeros, y dirigidos a la determinación del comportamiento de diferentes marcadores virales, para el segundo. Los ensayos de mecanismo de acción realizados mostraron que ***P. orbicularis* tiene acción virucida frente a herpesvirus e inhibe los eventos tempranos de VHS-1 y VHS-2; así como la síntesis de ADN dentro del ciclo replicativo del VHS-2 (Álvarez *et al.*, 2012).**

Además, se demostró que la actividad antiviral de *P. orbicularis* sobre el VHB está dada por más de un modo de acción, entre los que están la inhibición de la síntesis del AgsHB (como consecuencia de la reducción de los niveles de ARNm asociados a la síntesis del AgsHB), la inhibición de la producción del AgeHB y la inhibición de los procesos que conducen al ensamblaje y/o liberación de los viriones; unido a la acción directa sobre la partícula viral (Roque, 2013). Debido a que la mayoría de los antivirales en uso para la terapia de la hepatitis B crónica tienen su acción sobre la polimerasa viral (Paul y Han, 2011), reviste gran importancia el hallazgo de nuevos agentes con blancos diferentes que permitan una acción más integral y que disminuyan la aparición de mutantes de resistencia.

Posteriormente, se procedió a determinar qué compuestos químicos están involucrados en la acción antiviral, para lo cual se realizó la purificación de metabolitos activos guiada por la actividad antiviral. La evaluación de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *P. orbicularis* (EM) y su posterior caracterización química permitieron establecer que la actividad anti-VHB y anti-VHS se concentró en las fracciones F5-F10, aún cuando esta actividad varió en intensidad y modo de acción entre las diferentes fracciones, dado por la diferencia en su composición química y la concentración de los diferentes componentes activos dentro de las mismas. El análisis fitoquímico de las fracciones activas mostró que las principales familias de compuestos presentes fueron los ácidos fenólicos y flavonoides, tales como flavanonas, flavanoles y flavonoles. **Se relacionó la actividad antiviral de la planta frente VHS-2 y VHB con la presencia de procianidinas diméricas (B1 y B2), triméricas (C1), galatos de catequina y/o epicatequina, así como las procianidinas poliméricas y oligoméricas y sus derivados de tipo galatos.** En el caso de la actividad anti-VHB también se detectó catequina y epicatequina entre las fracciones activas, mientras que el ácido protocatéquico, la rutina, la nicotiflorina y el componente mayoritario, identificado como un derivado de flavanona, eluyeron entre las fracciones que no mostraron actividad anti-VHB ni anti –VHS (Álvarez *et al.*, 2012; Roque, 2013).

Se evidenció que la actividad anti-VHB y anti-VHS de *P. orbicularis* es consecuencia de una acción sinérgica entre varios de sus constituyentes químicos, ya que el efecto antiviral de los compuestos activos por separado es menor que cuando se encuentran unidos, como ocurre en la fracción F8 y en EM. Este comportamiento es común en la actividad biológica de plantas medicinales (Cos *et al.*, 2006). **Este trabajo constituye el primer estudio de fraccionamiento extensivo guiado por actividad y caracterización fitoquímica de los compuestos presentes en esta especie.**

Varios de los trabajos publicados sugieren que la actividad antiviral de los polifenoles provenientes de fuentes naturales se debe a un mecanismo inespecífico de desnaturalización de las proteínas que conduce a una inactivación directa de la partícula viral (actividad virucida), más que a la acción sobre un blanco específico, dada su capacidad para interactuar y formar complejos estables con las proteínas y los polisacáridos (Serrano *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos evidencian que existen mecanismos específicos para la acción antiviral de los compuestos fenólicos presentes en *P. orbicularis*.

Por otra parte, es importante destacar que en este trabajo **se evidenció la actividad anti-hepatitis B de los extractos y fracciones mediante la aplicación de una metodología de ensayos *in vitro* más efectiva que la tradicionalmente empleada en nuestro país para la determinación de la actividad frente a este virus.** Los modelos celulares empleados permitieron valorar la acción de la planta frente al virus y excluir la posibilidad de que la actividad inhibitoria sea consecuencia de un efecto tóxico o de una actividad antiviral inespecífica;

aspectos que no pueden ser descartados con los ensayos de inactivación empleados con anterioridad a este trabajo en los estudios con esta planta.

Este trabajo constituye uno de los estudios más completos de caracterización de la actividad antiviral de una planta en nuestro país, tanto desde el punto de vista de su mecanismo de acción, como de la relación entre sus fitoconstituyentes y la actividad antiviral; y permitió establecer una metodología de pesquisa para la evaluación de la actividad antiviral de productos naturales en nuestro país (del Barrio *et al.*, 2008) que ha sido empleada con posterioridad para la evaluación de otras plantas y productos naturales (González *et al.*, 2006; del Barrio *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2012b).

Otras de las novedades de este trabajo es el empleo de la metodología para la evaluación de antivirales naturales como herramienta en la formación de estudiantes de pregrado. En la actualidad la evaluación de antivirales naturales forma parte del tema de Antivirales dentro de las asignaturas: Virología Básica y Virología, que se imparten a las carreras de Microbiología y Bioquímica y Biología Molecular. Se aplica la experiencia de investigación acumulada en la temática mediante el análisis en seminarios de artículos publicados por nuestro grupo, así como de la realización de clases prácticas en las que se emplea parte de la metodología de evaluación antiviral referida en este trabajo.

Phyllanthus orbicularis Kunth constituye una fuente potencial de compuestos líderes con actividad anti-herpesvirus y anti-VHB para la industria farmacéutica, especialmente hoy en día que se reportan muchos mutantes resistentes a drogas para estos virus. Además, las propiedades virucidas encontradas, sugieren un posible uso tópico para tratar lesiones dermatológicas causadas por VHS que se encuentran ampliamente extendidas en la población mundial. De igual forma, la acción antiviral *in vitro* frente al VHB, mostrada en este trabajo, conjuntamente con las propiedades antioxidantes, antimutagénicas y antiinflamatorias, previamente informadas para esta especie, avalan el uso etnomédico de *P. orbicularis* y sustentan la realización de estudios posteriores dirigidos a la obtención de un posible fitoterapéutico que contribuya al tratamiento de la hepatitis B crónica.

Esta investigación se corresponde con los Lineamientos 131 y 158 de la Política Económica y Social del Partido y la Revolución sobre el desarrollo de resultados en las Ciencias Naturales y en la Medicina Natural y Tradicional, respectivamente.

Como parte de la producción científica derivada de estas investigaciones se desarrollaron 1 Tesis de Doctorado, 2 Tesis de Maestría.

Referencias bibliográficas

Estos resultados forman parte de la **tesis de doctorado**:

Roque A. (2013). Actividad antiviral *in vitro* de *Phyllanthus orbicularis* Kunth frente al virus de la hepatitis B (VHB). Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Estos resultados aparecen en las **publicaciones**:

- (1) Álvarez AL, Dalton KP, Nicieza I, Diñeiro Y, Picinelli A, Melón S, Roque A, Suárez B, Parra F. (2012). Bioactivity-guided Fractionation of *Phyllanthus orbicularis* and Identification of the Principal Anti HSV-2 Compounds. *Phytother. Res.* 26: 1513-1520.
- (2) Álvarez AL, del Barrio G, Kourí V, Álvarez PA, Suárez B, Parra F. (2009) In vitro anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Phytomedicine* 16: 960-966.
- (3) del Barrio G and Parra F. (2011). Antiviral Activities of *Phyllanthus orbicularis*, an Endemic Cuban Species. In: *Phyllanthus Species: Scientific Evaluation and Medicinal Applications* Publisher: Taylor & Francis Inc. Volume 10; CRC Press, p: 219-233.
- (4) del Barrio G, Álvarez AL, Valdés S y Parra F. (2008). Metodología de pesquisa preclínica de actividad anti-herpesvirus a partir de productos naturales. *Rev. Cub. Farm.* 42 (2): 0-0.
- (5) del Barrio G, Parra F. (2000). Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis* *J Ethnopharmacol.* 72: 317-322
- (6) Roque A, Salazar I, Morier L, del Barrio G. (2011). Efecto de *Phyllanthus orbicularis* sobre la viabilidad celular y el antígeno de superficie de la hepatitis B en células PLC/PRF/5. *Rev. Cub. Farm.* 45: 536-544

Otras referencias citadas

- (7) Álvarez AL, Diñeiro Y, del Barrio G, Picinelli A, Suárez B, Valdés S, Acosta M, Roque A, Parra F. (2009b). Bioactivity-guided separation of anti HSV-2 and antioxidant metabolites from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Planta Medica* 75: 990.
- (8) Álvarez AL, Melón S, Dalton KP, Nicieza I, Roque A, Suárez B, Parra F. (2012b). Apple Pomace, a By-Product from the Asturian Cider Industry, Inhibits Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 In Vitro Replication: Study of Its Mechanisms of Action. *J. Med. Food.* 15: 581-587.
- (9) Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharm.* 106: 290-302.
- (10) del Barrio G, Spengler I, García T, Roque A, Alvarez AL, Calderón J, Parra F. (2011). Antiviral activity of *Ageratina havanensis* and major chemical compounds from the most active fraction. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 21: 915-920.
- (11) del Barrio, G y Roque, A. (1999). Inactivación del AgsHB por un extracto de *P. orbicularis*. *Rev Cubana Plant Med.* 4: 95-97.
- (12) González RL, Roque A, Morier L y Rodríguez LA. (2006). Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5. *Rev Cub Med Trop.* 58:

- (13) Gutiérrez YI, Miranda M, Bello A, Martínez M, Figueroa JL, Delgado L, Rastrelli L. (2011). Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of a Methanolic Extract of *Phyllanthus orbicularis* and its Derived Flavonols. J. Essential Oil Res. 23: 50-53.
- (14) Paul N, Han SH. (2011). Combination Therapy for Chronic Hepatitis B: Current Indications. Curr. Hepat. Rep. 10: 98-105.
- (15) Sánchez-Lamar A, Fiore M, Cundari E, Ricordy R, Cozzi R, De Salvia R. (1999). *Phyllanthus orbicularis* Aqueous Extract: Cytotoxic, Genotoxic, and Antimutagenic Effects in the CHO Cell Line. Toxicol. Applied Pharmacol. 161: 231-239.
- (16) Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. Mol. Nutr. Food Res. 53: S310-S329