

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5

Lic. Ruby L. González González,¹ Lic. Annele Roque Quintero,² Lic. Luis Morier Díaz³ y Licel de los Ángeles Rodríguez Lay⁴

Resumen

Se evaluaron las propiedades antivirales de los extractos vegetales derivados a partir de las plantas: *Calendula officinalis* L., *Psidium guajava* L., *Eucalyptus* spp. y *Phyllanthus orbicularis* HBK contra el virus de la hepatitis B. Se llevó a cabo a concentraciones subtóxicas en el sistema *in vitro* PLC/PRF/5 o células Alexander, línea celular que expresa constitutivamente el antígeno de superficie del virus (AgshB). El parámetro de viabilidad celular se midió mediante el cálculo de los valores de *concentración citotóxica media* (CC50): *Eucalyptus* spp. mostró una menor toxicidad en las células, seguido de *Psidium guajava* L., *Phyllanthus orbicularis*, y finalmente *Calendula officinalis* que tuvo una toxicidad mucho mayor que los extractos anteriores. Posteriormente se estudió el comportamiento de la producción de AgshB intracelular y extracelular de las células a diferentes concentraciones de los extractos durante 48 h de tratamiento. Los datos obtenidos mostraron actividad inhibitoria en el caso de *Phyllanthus orbicularis*, así como para el extracto de eucalipto. Con el extracto de guayaba la actividad fue menor que en los 2 casos anteriores, mientras que la caléndula no mostró ninguna inhibición a las concentraciones ensayadas, lo que indica la ausencia de la actividad buscada en este extracto.

Palabras clave: Antivirales, virus de la hepatitis B (VHB), PLC/PRF/5, plantas medicinales

El virus de la hepatitis B (VHB) causa serias enfermedades degenerativas del hígado, lo cual provoca una significativa mortalidad y morbilidad mundialmente.¹ El desarrollo de terapias antivirales para la hepatitis B crónica ha marcado pautas y una vía alternativa en el tratamiento de los portadores crónicos y la prevención de complicaciones hepáticas como de cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). La existencia de efectos colaterales adversos de los antivirales sintéticos son factores que le aportan relevancia al estudio de antivirales de origen natural.²

La comisión de Plantas Medicinales del Ministerio de Salud Pública de Cuba ha avalado a las plantas *Phyllanthus orbicularis* HBK, *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* L., y *Calendula officinalis* L. por sus ricas propiedades medicinales como antiinflamatorias, astringentes, antisépticas, antimicrobianas y dentro de esta última, la actividad antiviral. En otros artículos se demuestra la actividad inhibitoria de estas plantas frente a virus como herpes simple tipo 1 y 2 (VHS);^{3,4} virus de la inmunodeficiencia humana (VIH);⁵ y virus infeccioso de la necrosis pancreática.⁶

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente estudio se investigó la actividad antiviral de los extractos derivados del *Phyllanthus orbicularis* HBK, *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* L., *Calendula officinalis* L., contra el virus de la hepatitis B *in vitro*.

Métodos

Extracto vegetal: las tinturas comerciales de *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* y *Calendula officinalis* fueron adquiridas en la red farmacéutica de medicina natural de Ciudad de La Habana; las que se desecaron a una temperatura menor de 45 °C para determinar su concentración. A partir de este punto se prepararon los extractos vegetales a diferentes concentraciones madres (5 y 10 mg/mL).

El extracto liofilizado de la planta *Phyllanthus orbicularis* HBK procedió de la colecta agosto 1997 (Baró T. Capacidad inactivante del extracto acuoso y de la fracción butanólica de *Phyllanthus orbicularis* frente al AgsHB. Trabajo para optar por el título de Licenciado en Microbiología. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. Ciudad de La Habana, 1999).

Células: los ensayos en cultivo de células se realizaron sobre la línea celular continua de hepatoma humano PLC/PRF/5 (células Alexander, subcultivos 75-81). Estas son células provenientes de un carcinoma primario hepático y expresan la región correspondiente a las proteínas de superficie, sintetizando y secretando constitutivamente el AgsHB que es ensamblado en forma de partículas de 20-25 nm de diámetro. Fueron mantenidas en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC No. CRL 8024).

Esta línea celular que expresa constitutivamente el AgsHB fue crecida en medio de cultivo MEM con aminoácidos no esenciales (MGAane) (Gibco), suplementado con L-glutamina 2 mM y suero fetal bovino inactivo (SFBI) (Gibco) a 10 % y mantenida en condiciones similares, pero con SFBI 2 % bajo valores de temperatura de 37 °C, muy bien controlados.

Ensayo de citotoxicidad (CC50)

La determinación de los efectos citotóxicos de los extractos preparados a partir de las plantas *Calendula officinalis* L., *Psidium guajava* L., *Eucalyptus* spp., y *Phyllanthus orbicularis* HBK en las células PLC/PRF/5 se llevó a cabo en placas de 96 pozos de fondo plano, empleando el método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,-5)- bromido difeniltetrazolio.⁷ Se sembraron 0,15 mL de suspensión celular de concentración de 2×10^5 células/mL en el medio correspondiente a la línea celular. A las 24 h de sembradas bajo condiciones específicas con la monocapa confluyente, se evaluaron por triplicado diferentes concentraciones de cada extracto al añadirse 0,1 mL/pozo de cada dilución y fueron incluidos pozos controles celulares sin extracto vegetal. Finalmente se incubaron bajo las mismas condiciones anteriores.

A las 48 h posteriores a este tratamiento, se procedió a la determinación de la concentración citotóxica media (CC₅₀) por el método colorimétrico MTT, para cada réplica mediante análisis estadístico de regresión lineal, para un coeficiente de determinación mayor que 0,90, empleando el programa Microsoft Excel 2000. Se calculó posteriormente como valor de CC₅₀ final la media de los 3 experimentos con la desviación estándar correspondiente.

Determinación de la concentración efectiva media (CE50)

Los ensayos de evaluación antiviral se realizaron en placas de 96 pozos sembradas a una concentración 2×10^5 células/mL, incubadas 48 h bajo las mismas condiciones descritas. Al cabo de este tiempo, se le adicionaron los extractos de los productos vegetales en ensayo a diferentes concentraciones, y se experimentaron 3 réplicas por cada una.

El sobrenadante de cada pozo se colectó y se realizó la detección del AgsHB extracelular por el método inmunoenzimático UMELISA HBsAg PLUS, que es un método heterogéneo tipo *sandwich*, desarrollado por el Centro de Inmunoensayo (CIE, La Habana, Cuba) para la detección del AgsHB en suero, plasma o sangre fresca sobre papel de filtro.

El porcentaje de AgsHB presente en los cultivos tratados con respecto a los controles de células, se calculó teniendo en cuenta que los valores de absorbancia obtenidos a partir de estos últimos constituyen 100 %. La concentración de los extractos vegetales capaces de inhibir el AgsHB producido en 50 % fue asumida como la concentración efectiva media (CE₅₀), que se calculó por análisis de regresión lineal.

Determinación del índice selectivo (IS)

El (IS) de cada extracto vegetal se determinó mediante la relación entre la CC₅₀ y la CE₅₀. Se consideró que existía actividad específica cuando IS era superior a 10.⁸

$$IS = CC_{50}/CE_{50}$$

Resultados

Ensayo de citotoxicidad

El análisis gráfico describe una relación casi lineal con pendiente negativa entre el porcentaje de viabilidad celular y las diferentes concentraciones ensayadas de los extractos (fig. 1). En sentido general, el ensayo de citotoxicidad mostró un incremento de la toxicidad celular en la medida en que aumenta la concentración de cada extracto. La viabilidad celular se mantiene con valores superiores a 80 %, a concentraciones similares o inferiores que 500 µg/mL del extracto derivado del *P. orbicularis* (fig.1-I). A concentraciones superiores a este valor comienzan a observarse efectos tóxicos en las células, lo cual se manifiesta de forma proporcional al incremento de las concentraciones empleadas.

A diferencia del comportamiento de la viabilidad celular que es observable con el extracto derivado de la planta *Calendula officinalis* L. (fig.1-II), la viabilidad celular se mantiene con valores superiores a 80 %, a concentraciones tan bajas como 125 µg/mL; observándose posteriormente una considerable disminución de la población de células, que decrece hasta menos de 20 %, con concentraciones superiores a los 250 µg/mL del extracto, con respecto al *P. orbicularis*. Los resultados de este parámetro frente a diferentes concentraciones del extracto vegetal de la caléndula muestran una toxicidad notablemente superior.

El extracto vegetal preparado a partir de la planta *Psidium guajava* L. (fig. 1-III) muestra una toxicidad mucho menor sobre la línea celular PLC/PRF/5 con respecto al de la caléndula: concentraciones menores que 1 000 µg/mL presentan una viabilidad celular por encima de 80 %, parámetro que alcanza 50 % entre 2 000-2 500 µg/mL y continúa disminuyendo hasta 21,13 % con 5 000 µg/mL del extracto.

Las células tratadas con el extracto de Eucalipto mantuvieron niveles de viabilidad superiores a 80 % hasta concentraciones inferiores a 2 000 µg/mL, permaneciendo más de 50 % de las células viables con concentraciones de hasta 4 000 µg/mL (fig. 1-IV).

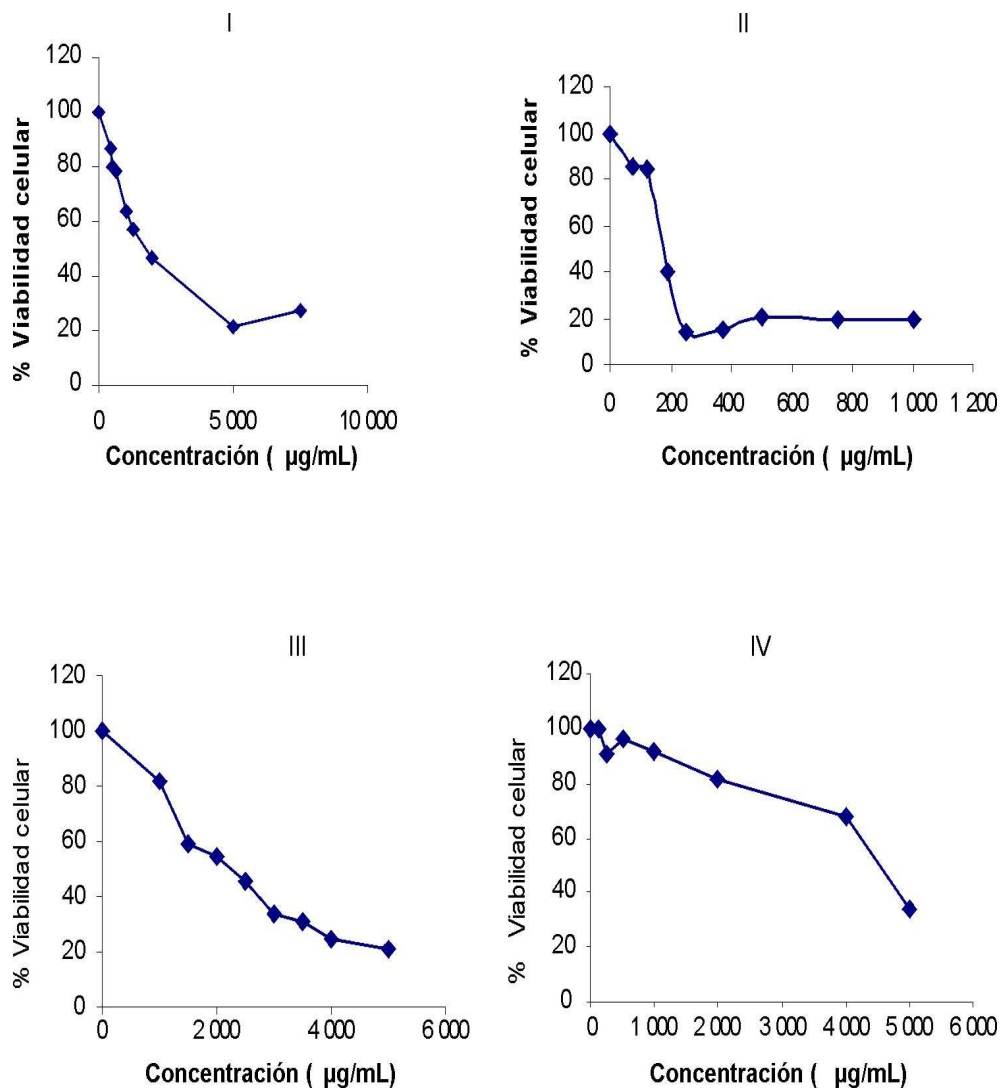


Fig. 1. Porcentajes de viabilidad celular según el método de MTT en células PLC/PRF/5, tratadas con diferentes concentraciones de los extractos *Phyllanthus orbicularis* HBK (I), *Calendula officinalis* L (II), *Psidium guajava* L (III) y *Eucalyptus* ssp. (IV), a las 48 h de incubación. Se representa el resultado de una de las 3 réplicas realizadas para cada extracto.

Con los resultados obtenidos para las 3 réplicas de cada extracto, se calcularon los valores de CC_{50} , a partir de las ecuaciones de regresión correspondientes a las líneas de tendencia con valores de coeficientes de regresión superiores a 0,90 (tabla 1).

Tabla 1 ¡Error! Marcador no definido. Valores de concentración citotóxica media (CC_{50}) de los extractos evaluados

Extracto	$CC_{50} \pm S$ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Calendula officinalis</i> L.	$165,51 \pm 2,08$ $\mu\text{g/mL}$
<i>Psidium guajava</i> L.	$2414,84 \pm 107,85$ $\mu\text{g/mL}$
<i>Eucalyptus</i> ssp,	$4007,565 \pm 44,6$ $\mu\text{g/mL}$
<i>Phyllanthus orbicularis</i> HBK	$2267,64 \pm 113,09$ $\mu\text{g/mL}$

Ensayo antiviral

El ensayo antiviral prosiguió a los de citotoxicidad, por lo que se inició sobre la base del conocimiento de las concentraciones subtóxicas (con una viabilidad superior a 90 %) de cada extracto (fig. 2).

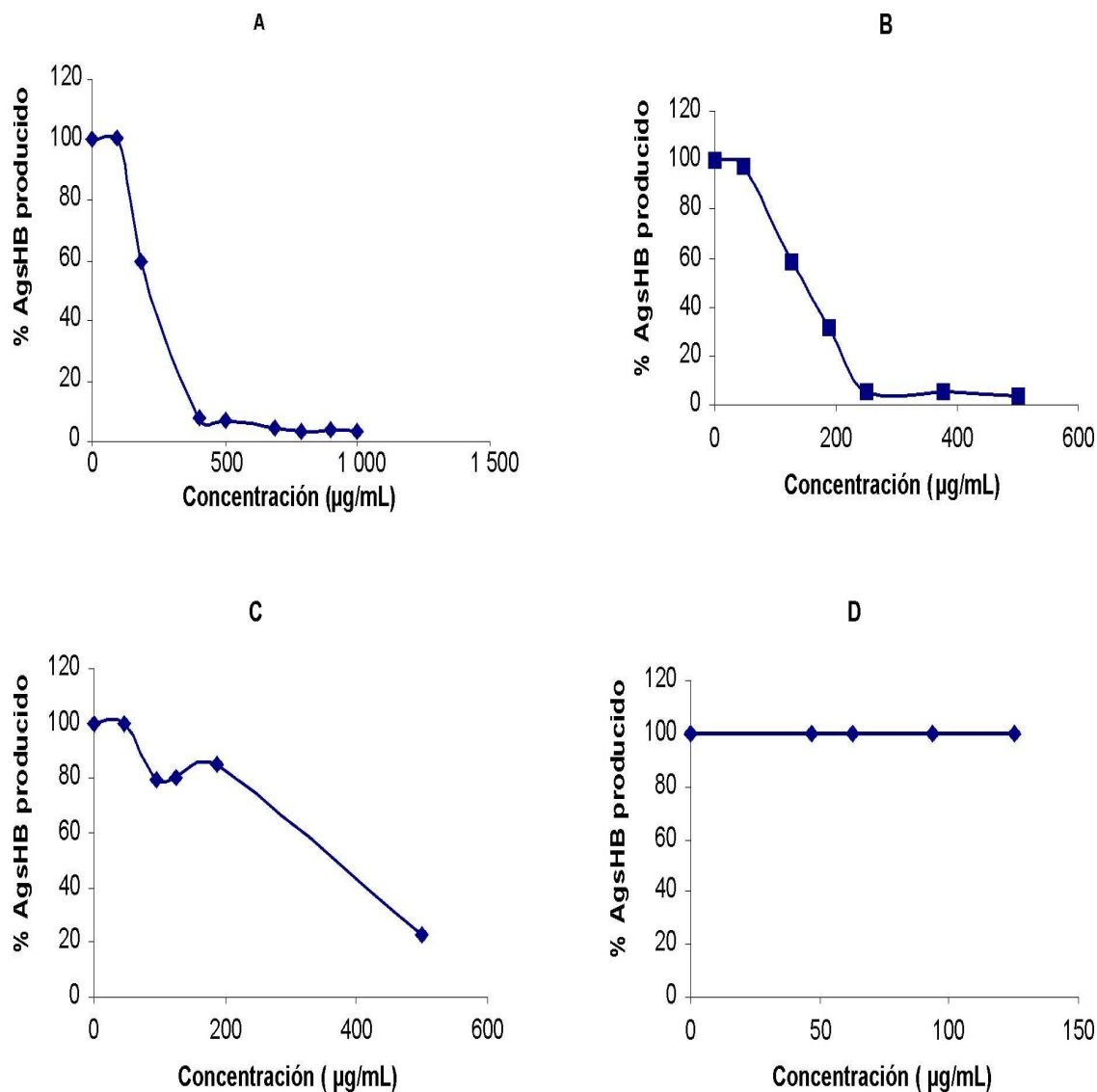


Fig. 2. Efecto de los extractos de *P. orbicularis* (A), *Eucalyptus* spp. (B), *Psidium guajava* (C) y *Calendula officinalis* (D) sobre la producción del AgsHB extracelular en las células PLC/PRF/5 a las 48 h de tratamiento. En cada caso se representa el resultado de una de las 3 réplicas realizadas.

Las células tratadas con el extracto de *Eucalyptus* spp. muestran una inhibición del antígeno producido con concentraciones cercanas a 125 µg/mL y superiores, lográndose más de 90 % de inhibición del AgsHB a partir de los 250 µg/mL (fig. 2-B). Este comportamiento es ligeramente superior al observado con el extracto de *Phyllanthus* (fig. 2-A), donde se evidencia una inhibición con valores de 200 µg/mL o superiores, que alcanza 90 % a partir de 400 µg/mL.

El extracto de guayaba (fig. 2-C) produce una inhibición del AgsHB a mayores concentraciones; detectándose más de 80 % de antígeno a concentraciones cercanas a 187,5

$\mu\text{g/mL}$, con respecto a lo observado anteriormente; a partir de la cual se comienza a observar una disminución de este marcador que llega a ser 80 % con 500 $\mu\text{g/mL}$ del extracto. El extracto de caléndula (fig. 2-D), a diferencia de lo evidenciado con los otros, no mostró ninguna inhibición *in vitro* del AgsHB a las concentraciones ensayadas.

Se determinó la línea de tendencia con valores de coeficiente superiores a 0,90 para cada extracto. El cálculo de las ecuaciones de regresión lineal permitió hallar los valores de CE_{50} que se muestran en la tabla 2 y corroboran el comportamiento gráfico. Dado los resultados encontrados con Caléndula, no fue factible calcular la CE_{50} para esta planta (tabla 2).

Tabla 2. Valores de concentración efectiva media (CE_{50}) de los extractos vegetales evaluados

Extracto	$\text{CE}_{50} \pm \text{S}$ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Phyllanthus orbicularis</i>	185,14 \pm 9,73
<i>Eucalyptus</i> ssp,	158,99 \pm 14,9
<i>Psidium guajava</i> L	360,34 \pm 13,8

El cálculo de la relación entre la CC_{50} y la CE_{50} , índice selectivo (IS), ofreció un criterio más completo del efecto anti-VHB (AgsHB) de estas plantas (tabla 3).

Tabla 3. Valores del índice selectivo (IS) de los extractos vegetales evaluados.

Extracto	IS ($\text{CC}_{50}/\text{CE}_{50}$)
<i>Phyllanthus orbicularis</i>	12,25
<i>Eucalyptus</i> ssp.	25,21
<i>Psidium guajava</i> L	6,70

Discusión

Se estudiaron las propiedades antivirales de los extractos *Phyllanthus orbicularis* HBK, *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* L. y *Calendula officinalis* L., frente al VHB por su capacidad de inhibición de uno de los marcadores de infección viral (AgsHB), en las células Alexander.

El *P. orbicularis* HBK es una planta endémica cubana la cual ha mostrado actividad antiviral *in vitro* frente a los virus herpes simple tipo 1 y 2 y al herpesvirus bovino tipo 1,^{4,9} además su actividad antiviral contra el VHB en la línea celular PLC/PRF/5 ha sido comprobada por otros autores (Salazar I. Actividad del extracto acuoso y la fracción acético acuosa *Phyllanthus*

orbicularis HBK sobre la viabilidad celular y la producción de AgsHB en células PLC/PRF/5. Trabajo para optar por el título de Licenciado en Microbiología. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. Ciudad de La Habana, 2001). Sobre la base de estos datos el *P. orbicularis* se tomó como control para el análisis comparativo del porcentaje de supervivencia celular y la actividad antiviral medida por la cantidad de AgsHB producido por las células, con los restantes extractos vegetales derivados *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* L. y *Calendula officinalis* L., respectivamente.

Los resultados alcanzados con las plantas en el ensayo de citotoxicidad evidenciaron una disminución en la viabilidad celular en la medida en que aumentaba la concentración de cada extracto vegetal. El extracto de *Eucalyptus* spp. mostró una menor toxicidad en las células seguido de *Psidium guajava* L., *P. orbicularis* y finalmente, *Calendula officinalis*, que tuvo una toxicidad mucho mayor que los extractos anteriores, efecto que pudiera atribuírsele a la presencia de flavonoles en este.¹⁰

El extracto de *Eucalyptus* spp. mostró la mayor actividad inhibitoria con un IS de 25,21, el doble, inclusive, que el obtenido para el extracto de *P. orbicularis* que constituía la referencia o el control positivo del efecto antiviral buscado. Estudios fitoquímicos realizados en especies de *Eucalyptus*, muestran la presencia en la planta de compuestos fenólicos como los taninos y flavonoides, que son responsables de la actividad inhibitoria del AgsHB *in vitro* mostrada por el extracto de *P. orbicularis* en otros ensayos antivirales (Del Barrio G. Actividad antiviral *in vitro* de *Phyllanthus orbicularis*. Tesis de Doctorado. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. Ciudad de La Habana, 1999) (Romeu B. Evaluación antiviral, contra el virus del herpes simple tipo 1, de fracciones químicas de *Phyllanthus orbicularis* HBK. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. Ciudad de La Habana, 2000) (Roque A. Actividad *in vitro* del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* HBK frente al VHB. Tesis para optar por el Título Académico de Maestro en Microbiología. Mención Virología. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. Ciudad de La Habana, 2003).

La actividad antiviral del extracto derivado de *Psidium guajava* es baja (IS= 6,7), si se tiene en cuenta el criterio de Wyde,⁸ quien plantea que un extracto natural debe poseer un IS>10 como indicativo de actividad antiviral *in vitro*, aunque existen otros autores que aceptan un IS>2.¹¹ En los datos obtenidos se observa que existe cierta inhibición del antígeno, por lo que los autores de este trabajo creen que se pudieran continuar los estudios con esta planta, más aún si se tiene en cuenta que se ha reportado la presencia en la misma de compuestos como los triterpenos, referidos con actividad antiviral en la literatura especializada, y que se ha observado actividad de esta planta frente a otros virus.⁶

Existen estudios que plantean actividad antiviral *in vitro* de *Caléndula officinalis* frente al VIH, rinovirus, herpes simple e influenza;⁵ aunque no se encontró ningún reporte de evaluación de la actividad antiviral de frente al VHB.

Estos resultados apoyan los alcanzados previamente para la especie *Phyllanthus orbicularis*, a la vez que indican la presencia de marcada actividad antihepatitis en extractos de *Eucalyptus* spp.

Este trabajo constituye el primer reporte acerca de este tipo de estudio en los extractos obtenidos a partir de plantas cubanas de *Eucalyptus* spp., *Psidium guajava* L. y *Calendula officinalis* según las búsquedas y revisiones realizadas. Los resultados alcanzados contribuyen al conocimiento de las propiedades de las plantas medicinales cubanas y abren un camino para futuros estudios de actividad antiviral de estas y el empleo de alguna como candidato

para el tratamiento de la hepatitis B.

Summary

The antiviral properties of plants extracts derived from *Calendula officinalis* L., *Psidium guajava* L., *Eucalyptus* spp. y *Phyllanthus orbicularis* HBK against the hepatitis B virus were evaluated at subtoxic concentrations in the *in vitro* PLC/PRF/5 system or Alexander cells, a cell line expressing constitutively the virus surface antigen (Ag_sHB). The cell viability parameter that was measured by the calculation of the mean cytotoxic concentration values (CC₅₀): *Eucalyptus* spp. showed a lower toxicity in the cells, followed by *Psidium guajava* L., *Phyllanthus orbicularis*, and finally *Calendula officinalis* that had a much higher toxicity than the previous extracts. Later on, it was studied the behaviour of the production of intracellular and extracellular HBsAg of the cells at different concentrations of the extracts during 48 hours of treatment. The data obtained showed an inhibitory activity in the case of *Phyllanthus orbicularis*, as well as for the eucalyptus extract. With the guava extract, the activity was lower than in the 2 previous cases, whereas calendula did not show any inhibition to the assayed concentrations, which proves the absence of the activity searched in this extract.

Key words: Antivirals, hepatitis B virus (HBV), PLC/PRF/5, medicinal plants.

Referencias bibliográficas

1. Wiegand J, Tischendorf J, Nashan B, Klempnauer J, Flemming P, Niemann P, et al. Severe exacerbation of chronic hepatitis B after emergence of lamivudine resistance in a cirrhotic patient: immediate switch to adefovir dipivoxil appears to be indicated. *Z Gastroenterol* 2004;42:15-8.
2. Hanazaki, K. Antiviral therapy for chronic hepatitis B: a review. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3:63-70.
3. Schnitzler P, Schon K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie* 2001; 56:343-7.
4. Del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J Ethnopharmacol* 2000;72:317-22.
5. Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed Pharmacotherapy* 1997;51:176-80.
6. Veira F, Rodríguez D, Gonolves F, Menezes F, Aragã J, Sousa O. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) Upon bacteria isolated from muscle and know to induce diarrhea in children. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2001;36:4665.
7. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;65: 55-63.
8. Wyde R, Ambrose W, Meyerson R, Gilbert E. The antiviral activity of especie - 303, natural polyphenolic polymers against respiratory syncytial and Parainfluenza type 3 viruses in cotton

rats. Antiv Res 1993;20:145-54.

9. Valdés S, Del Barrio G, Gaitén G, Morier L. Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1. Rev Cubana Med Trop 2003;55:169-73.

10. Pérez I, Cruz G, Licea A, Arce E, Fattel S, Villa S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. Toxicol In Vitro 2002;16:253-8.

11. Vander A, Haemers A, Vlietinck J. Antiviral agents from higher plants and example of structure-activity relationship of 3-methoxyflavones. En: Colegate M y Molyneux J eds. Bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination. Boca Ratón: CRC Press;1993. p.405-40.

Recibido: 10 de marzo de 2006. Aprobado: 29 de mayo de 2006.
Lic. *Ruby L. González González*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía, Km 6 ½, AP 601, municipio La Lisa, Ciudad de La Habana. Teléf.: 2020426, Telefax 2046051 Correo electrónico: ruby@ipk.sld.cu

¹ Licenciada en Bioquímica. Reserva Científica.

² Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Profesora Auxiliar.

³ Máster en Virología. Licenciado en Microbiología. Investigador Titular

⁴ Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología.