

Efecto de *Phyllanthus orbicularis* sobre la viabilidad celular y el antígeno de superficie de la hepatitis B en células PLC/PRF/5

Effect of *Phyllanthus orbicularis* on the cell viability and the hepatitis B surface antigen in PLC/PRF/5 cells

Annele Roque Quintero,^I Iriam Salazar Gutiérrez,^{II} Luis Morier Díaz,^{III} Gloria del Barrio Alonso^{IV}

^I Máster en Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{II} Licenciado en Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{III} Máster en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

^{IV} Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora Titular. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

La actividad antiviral de *Phyllanthus orbicularis* Kunth, planta endémica de Cuba, frente al virus de la hepatitis B, fue estudiada *in vitro*. Se determinó la capacidad del extracto acuoso y 2 fracciones químicas ricas en taninos y flavonoides (acético-acuosa y butanólica) para inhibir la producción o bloquear la detección del antígeno de superficie de la hepatitis B (AgSHB) en las células PLC/PRF/5, una línea celular de hepatoma humano que expresa este marcador constitutivamente. El extracto acuoso fue efectivo al inhibir el AgSHB producido a las 24 y 48 h con índices selectivos superiores a 10, con una acción inhibitoria dependiente de la concentración. La evaluación de la actividad de las fracciones obtenidas a partir de esta planta mostró que ambas eran efectivas con índices selectivos superiores a 10. Estos resultados sugieren que existe una actividad inhibitoria del antígeno estudiado y que esta planta posee algunos compuestos fenólicos que podrían actuar sobre el AgSHB y reducir su producción en las células, lo que indica una posible actividad *in vivo*. Este trabajo corrobora el potencial de acción antiviral del extracto acuoso de *P orbicularis*, además de avalar el empleo de la línea PLC/PRF/5 para futuras evaluaciones o ensayos encaminados a valorar la actividad antihepatitis B de diferentes productos. De igual

forma abre el camino para la determinación de aquel o aquellos componentes químicos responsables de la actividad de la planta frente al virus de la hepatitis B.

Palabras clave: antiviral, virus de la hepatitis B (VHB), planta medicinal, *Phyllanthus orbicularis*

ABSTRACT

The antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis*, an endemic Cuban plant, against the hepatitis B virus was evaluated *in vitro*. The ability of the aqueous extract and 2 tannin- and flavonoid-rich chemical fractions (aqueous-acetic and buthanolic) to inhibit the hepatitis B surface antigen (HBsAg) production was determined in PLC/PRC/5 cells, a human hepatoma cell line that constitutively expresses this antigen. The aqueous extract was effective in inhibiting the HBsAg at 24 and 48 hours of treatment, being the selective index (SI) above 10, with concentration-dependent inhibitory activity. The evaluation of the inhibitory action of the two fractions from the plant proved that both were effective and their selective indexes were also higher than 10. These results indicated the inhibitory activity against HBsAg of the plant and the presence of phenolic compounds that could reduce the antigen production. This may contribute to an *in vivo* antiviral action. This paper also corroborated the antiviral potential of the aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis* Kunth, in addition to supporting the use of PLC/PRF/5 for future evaluations or trials directed towards assessing the anti-hepatitis B activity of various products. Likewise, it paved the way for the detection of the chemical component(s) responsible for the plant's action against hepatitis B virus.

Key words: antiviral, hepatitis B virus, medicinal plant, *Phyllanthus orbicularis*.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis B constituye una de las principales enfermedades infecciosas que afectan al hombre, y es la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular; con aproximadamente un 5 % de la población mundial como portadores crónicos del virus de la hepatitis B (VHB).^{1,2} Aunque se disponen de vacunas para la prevención de la enfermedad, estas no ofrecen solución al grupo de portadores del VHB a la vez que existe la posibilidad en estos individuos vacunados de la aparición de mutantes que se "escapan" del efecto protector de los antiHBs, las llamadas "mutantes de escape". Por otro lado, la terapia, fundamentalmente a base de interferón α y lamivudina, presenta inconvenientes dados por la presencia de efectos colaterales dosis-dependientes, así como la aparición de mutantes resistentes.³ Por ello el desarrollo de nuevos agentes antivirales para la terapia de la hepatitis B crónica continúa siendo un aspecto de gran importancia, ya sea de forma sintética o a partir de fuentes naturales. El empleo de plantas del género *Phyllanthus* ha sido descrito en la Medicina Tradicional de varios países para el tratamiento de la ictericia, de enfermedades hepáticas o como tónico para el hígado, entre otros usos.⁴ En Cuba existen varias especies de este género, muchas de ellas endémicas, entre las que se encuentra *Phyllanthus orbicularis* Kunth, cuyos extractos han mostrado la

capacidad de inactivar al AgsHB en sueros humanos positivos a este marcador.^{5,6} También ha sido demostrada la actividad de esta planta frente a herpesvirus (Herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2)).⁷⁻⁹ En el presente trabajo se evalúa la actividad del extracto acuoso de *P. orbicularis* sobre el AgsHB en células PLF/PRC/5 de hepatoma humano y de 2 fracciones químicas obtenidas de la planta.

MÉTODOS

Extracto acuoso y fracciones químicas obtenidas de *P. orbicularis*

El extracto acuoso empleado se obtuvo a partir de hojas y tallos de la planta (No. 7-220-HAJB), colectados en agosto en Cajalbana, Pinar del Río y procesados según del *Barrio y Roque* (1999). A partir de la droga cruda se obtuvieron 2 fracciones: una por extracción acético-acuosa (FAA) y la otra por extracción butanólica (FB).¹⁰ Para los ensayos *in vitro* se preparó una solución de trabajo de 3 mg/mL en medio de cultivo MEM (Gibco) suplementado con 1 % L-glutamina (SIGMA), filtradas con membranas de citrato de celulosa, porosidad 0,02 μm (Millipore) y conservadas a 4 °C. Para la solubilización de FAA y FB se adicionó dimetilsulfóxido (DMSO, 0,8 %) (SIGMA).

Células

La línea de células de hepatoma humano PLC/PRF/5 creció en MEM suplementado con 1 % de L-glutamina, 10 % de SBF (SIGMA) y 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, a 37 °C.

Ensayo de citotoxicidad

Las células PLF/PRC/5 se sembraron a densidad de 2×10^5 células/mL y se incubaron a 37 °C en 5 % CO_2 . Después de 24 h de incubación se adicionó medio fresco de mantenimiento (MEM con 1 % glutamina sin SBF) con las correspondientes concentraciones del extracto o fracciones a evaluar, y se incubaron en estas condiciones por 24, 48 o 72 h, según el ensayo. Posteriormente se añadió una solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro (MTT) en PBS a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C en 5 % CO_2 por 3 h. El precipitado se disolvió en 100 μL de DMSO por pocillo y la absorbancia se midió a 540 nm con longitud de onda de referencia a 620 nm en un espectrofotómetro lector de placas multipozos (MRX Revelation, Dynex Technologies). La viabilidad celular se calculó como fue descrito por Mosmann.¹¹

Ensayos de evaluación del AgsHB

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/mL en el medio de crecimiento correspondiente, y se incubaron durante 24 h. Al cabo de este tiempo las células se lavaron con PBS estéril (pH 7,0) y se trataron con diferentes concentraciones del extracto o la fracción correspondiente diluidas en medio de mantenimiento, durante 24, 48 o 72 h, según el caso. Al cabo del tiempo prefijado, se colectó el medio de cada pocillo y se conservó a 4 °C para determinar posteriormente la presencia de AgsHB mediante ELISA (ELISA-AgsHB, Girón).¹²

Procesamiento estadístico de los resultados

La concentración citotóxica media (CC_{50}) y la concentración efectiva media (CE_{50}), se calcularon mediante análisis de regresión lineal para un coeficiente de determinación

mayor que 0,90, usando las curvas dosis-respuesta generadas a partir de los datos experimentales. Todos los resultados se presentan como valores medios y desviaciones estándar de 3 experimentos. En cada caso se calculó el índice selectivo ($IS = CC_{50}/CE_{50}$).

Para la comparación estadística de los datos de CC_{50} , CE_{50} y de absorbancia de los controles de células se empleó un ANOVA de clasificación simple, seguido de una prueba Duncan.

RESULTADOS

Ensayos de citotoxicidad del extracto acuoso y fracciones

El ensayo de citotoxicidad del extracto acuoso de *P. orbicularis* mostró un incremento de la toxicidad celular a medida que aumenta la concentración (datos no mostrados).

Los valores CC_{50} para los 3 tiempos de tratamiento muestran un aumento de la citotoxicidad en correspondencia con el incremento del tiempo de contacto de las células con el extracto (tabla 1). El análisis estadístico evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos evaluados.

Tabla 1. Actividad inhibidora del AgsHB del extracto acuoso de *P. orbicularis* según el tiempo de tratamiento.

Tiempo de tratamiento (horas)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
24	2 082,15 \pm 56,52 a*	28,22 \pm 6,75.a	73,78
48	1 500,49 \pm 37,8 b	116,3 \pm 19,3 b	12,90
72	1 109,66 \pm 23,3 c	226,99 \pm 55,8 c	4,89

CC_{50} : concentración que reduce la viabilidad celular para el 50 %; CE_{50} : concentración que reduce la producción del AgsHB en el 50 %; IS: índice selectivo.

* Los datos representan la media de 3 experimentos independientes incluyendo sus desviaciones estándar.

Letras distintas difieren para el 5 %, según la prueba de Duncan dentro de una misma serie.

La evaluación de la citotoxicidad de las fracciones FAA y FB mostró que la primera posee un comportamiento similar al del extracto acuoso, dado por la disminución de la viabilidad celular con el incremento de la concentración de la fracción; sin embargo, la FB resultó menos tóxica con valores de viabilidad celular que oscilan entre el 80 y el 100 % para las concentraciones ensayadas (hasta 2000 mg/mL), con valores de CC_{50} de 1839,42 \pm 78,21 $\mu\text{g/mL}$ para la fracción acético-acuosa y mayor que 2 000 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de la fracción butanólica.

Ensayos de actividad sobre el AgsHB

La actividad en cultivos de células se evaluó con concentraciones subtóxicas del extracto (con una viabilidad mayor de 90 %) a los 3 tiempos de tratamiento. El

extracto acuoso de *P. orbicularis* fue capaz de disminuir la cantidad de AgsHB producido por las células PLC/PRF/5 en los 3 tiempos de incubación. La presencia de antígeno producido es menor a medida que aumenta la concentración del extracto empleada, y se observa una disminución más brusca en el caso de las 24 h (datos no mostrados), tiempo en el que también se evidencia una cantidad de células viables significativamente menor (DO= 0,473) ($p < 0,05$) con respecto al resto de los tiempos analizados (48 h, DO= 0,903 y 72 h, DO= 0,628) cuando se comparan los promedios de absorbancia obtenidos para los controles de células.

Los valores de CE_{50} para los 3 tiempos evidencian un aumento de este indicador con el incremento del tiempo de incubación. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos evaluados. Los valores de índices selectivos (IS) resultaron mayores que 10 en los ensayos de 24 y 48 h de tratamiento (tabla 1).

Ensayos de actividad sobre el AgsHB de las fracciones de *P. orbicularis*

El ensayo antiviral se realizó de forma similar al del extracto acuoso, pero teniendo en cuenta los resultados con el extracto acuoso, se estudió el tiempo de incubación de 48 horas. Los resultados mostraron la capacidad de ambas fracciones para disminuir la cantidad de antígeno producido por las células PLC/PRF/5. Los valores de IS (tabla 2) indican que en ambas fracciones hay presencia del o de los compuestos responsables de la actividad mostrada; aun cuando para FB el hecho de no poder calcular con exactitud el valor de la CC_{50} impide dar un IS preciso.

Tabla 2. Actividad de las fracciones ácido-acético y butanólica de *P. orbicularis* sobre el AgsHB en la línea PLF/PRC/5

Fracciones	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
Acético-acuosa	135,64 \pm 10,03 a	13,56
Butanólica	164,85 \pm 12,27 a	> 12,13

CE_{50} : concentración que reduce la producción del AgsHB en el 50 %; IS: índice selectivo. Los datos representan la media de tres experimentos independientes incluyendo sus desviaciones estándar. Letras iguales no difieren estadísticamente para el 5 %, según prueba de Duncan.

DISCUSIÓN

En este estudio se reporta la actividad inhibitoria del extracto acuoso y de 2 fracciones químicas obtenidas a partir de la especie *P. orbicularis* Kunth frente al AgsHB producido en la línea celular PLC/PRF/5, la cual proviene de un carcinoma primario de hígado. Dichas células tienen integrada una parte del genoma del VHB y expresan la región correspondiente a las proteínas de superficie, secretando de forma permanente el AgsHB.¹³

El extracto acuoso de *P. orbicularis* mostró la capacidad de inhibir al AgsHB producido por estas células con un $IS > 10$, actividad que se manifiesta de forma dependiente de la concentración de extracto empleada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos

previamente en sueros de individuos positivos a este marcador,⁶ así como corroboran el potencial antiviral de esta planta *in vitro* descrito con anterioridad para los virus HSV-2 y BHV-1⁷ y HSV-1.^{8,9}

El hecho de presentar esta actividad frente al AgsHB (principal proteína de la envoltura del VHB) unido a la posible acción sobre uno de los pasos tempranos del ciclo replicativo de los herpesvirus,⁸ pudiera sugerir la existencia de un mecanismo de interacción con glicoproteínas de superficie, o sea, a nivel de la envoltura viral para los virus anteriormente mencionados. No obstante, es necesario descartar la existencia de otros mecanismos de acción intracelulares que pudieran intervenir en la inhibición de la producción de AgsHB por estas células.

De igual forma estos resultados coinciden con los obtenidos para otras especies del género, como *P. urinaria*¹⁴ y *P. amarus*¹⁵ que también mostraron un decrecimiento marcado en la producción de AgsHB en esta línea celular.

Por otra parte, los ensayos realizados con 2 fracciones químicas obtenidas, una mediante extracción butanólica y la otra a través de extracción acético-acuosa, a partir de la planta, evidenciaron que la actividad manifestada por el extracto acuoso se mantiene en dichas fracciones, ambas ricas en compuestos fenólicos.^{10,16,17} Estos hallazgos permiten plantear que los taninos y flavonoides presentes en las fracciones sean responsables, al menos en parte, de la actividad mostrada por *P. orbicularis* frente al VHB.

Según *Calixto y otros*,¹⁸ los taninos son responsables en la acción de plantas del género *Phyllanthus* frente al VHB. Taninos como la geranina, el ácido eláxico y la hiperina obtenidos de *Geranium carolinianum* mostraron capacidad para inhibir la secreción de los antígenos s y e del VHB *in vitro*.¹⁹ Además se ha informado por distintos autores la actividad antiviral de este grupo de compuestos frente al VIH,^{20,21} al HSV²² y al virus de la hepatitis C.²³

Algunos flavonoides han sido descritos para el tratamiento de hepatitis virales, como la silimarina²⁴ y la catequina.²⁵ Otros como la robustaflavona, biflavonoide aislado de la planta *Rhus succedanea*,²⁶ algunos flavonoides aislados de *Lactuca indica* L.,²⁷ el sikokianin A (biflavona) y la camacromona (flavonoide), ambos obtenidos de las raíces de *Stellera chamaejasme*²⁸ han mostrado potente actividad antiviral frente al VHB en cultivo de células.

Estos resultados, unidos a las propiedades antígenotóxicas, antiproliferativas y como inductor de apoptosis demostradas para el extracto acuoso de esta planta que la hacen factible como un potencial antitumoral,²⁹ permiten vislumbrar las perspectivas de *P. orbicularis* en el tratamiento de la hepatitis B crónica, teniendo en cuenta la necesidad del empleo de una terapia combinada para el tratamiento de esta enfermedad, en la que pudieran incluirse, además de los compuestos sintéticos aprobados, productos de origen natural como el que aquí se evalúa para obtener una respuesta más efectiva.

Este trabajo corrobora el potencial de acción antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* Kunth, además de avalar el empleo de la línea PLC/PRF/5 para futuras evaluaciones o ensayos encaminados a valorar la actividad antihepatitis B de diferentes productos. De igual forma abre el camino para la determinación de aquel o aquellos componentes químicos responsables de la actividad de la planta frente al VHB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ganem, D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004;350: 1118-29.
2. La, CL, Ratziu V, Yuen MF, Poinard T. Viral Hepatitis B. *Lancet.* 2003;362:2089-94.
3. Zoulim F. Therapy of chronic hepatitis B virus infection: inhibition of the viral polymerase and other antiviral strategies. *Antiv Res.* 1999;44: 1-30.
4. Unander DW, Webster GL, Blumberg BS. Usage and bioassay in *Phyllanthus (Euphorbiaceae)*. IV. Clustering of antiviral use and the other effects. *J Ethnopharmacol.* 1995;45: 1-18.
5. del Barrio G, Caballero O, Rivas L, García D. Efecto de extractos de *Phyllanthus orbicularis* sobre el AgsHB del virus de la hepatitis B. *Avances en Biotecnología Moderna.* 1994;2: 236.
6. del Barrio G, Roque A. Inactivación del HBsAg por un extracto de *Phyllanthus orbicularis*. *Rev Cubana Plantas Med.* 1999;3: 95-7.
7. del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J Ethnopharmacol.* 2000;72: 317-22.
8. Fernández JA, del Barrio G, Romeu B, Gutiérrez Y, Valdés S, Parra F. *In vitro* antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. *Phytotherapy Res.* 2003;17: 980-2.
9. Álvarez A, del Barrio G, Kourí V, Álvarez PA, Suárez B, Parra, F. *In vitro* anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Phytomedicine.* 2009;16: 960-6.
10. Gutiérrez Gaitén YI, Miranda Martínez M, Hernández Sánchez T, del Barrio G. Estudio de algunos fitoconstituyentes de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Rev Cubana Farm.* 2000;34: 299-300.
11. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Meth.* 1983;65: 55-63.
12. Gonzalez Griego A. Método de cuantificación del HBsAg. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 1991;10: 156-9.
13. Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW, Lecatsar G. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the livers. *S Afr Med J.* 1976;50: 2124-5.
14. Ji XH, Qin YZ, Wang WY, Zhu JY, Liu XT. Effects of extracts from *Phyllanthus urinaria* L. on HBsAg production in PLC/PRF/5 cell line. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih.* 1993; 18: 496-8.

15. Jayaram S, Thyagarajan SP. Inhibition of the HBsAg secretion from Alexander cell line by *Phyllanthus. amarus*. Indian J Pathol Microbiol. 1996; 39:211-5.
16. Gutiérrez YI, Miranda M, Henríquez AT, y del Barrio G. Análisis de flavonoides en una fracción butanólica obtenida de *Phyllanthus orbicularis* HBK. Rev Cubana Farm. 2010;44(3). Disponible en:
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034 - 75152010000300011&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000300011&lng=es&nrm=iso)
17. Álvarez AL, Diñeiro Y, del Barrio G, Picinelli A, Suárez B, Valdés S, et al. Bioactivity-guided separation of anti HSV-2 and antioxidant metabolites from the plant *Phyllanthus orbicularis*. Planta Medica. 2009; 75:990.
18. Calixto JB, Santos AR, Pihlo UC, Vanes RA. Review of the plant of the genus *Phyllanthus*: Their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. Med Res.Rev. 1998;18:225- 58.
19. Li J, Huang H, Zhou W, Feng M, Zhou P. Anti-hepatitis B Virus Activities of *Geranium carolinianum* L. Extracts and Identification of the Active Components. Biol Pharm Bull. 2008;31(4):743-7.
20. Notka F, Meier G, Wagner R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication *in vitro* and *ex vivo*. Antiviral Res. 2004;64:93-102.
21. Yu D, Morris-Natschke SL, Lee KH. New Developments in Natural Products-Based Anti-AIDS Research. Med Res Rev. 2007;27(1):108-32.
22. Zhang J, Zhang B, Yao X, Gao Y, Shong J. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum*, L. against genital herpesvirus *in vitro*. Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih. 1995;20:556-8.
23. Zuo G, Li Z, Chen L, Xu X. Activity of compounds from Chinese herbal medicine *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim against HCV NS3 serine protease. Antiviral Res. 2007;76:86-92.
24. Vailati A, Aristia L, Sozze E. Randomized open study of the dose-effect relationship of a short course of IdB 1016 in patients with viral or alcoholic hepatitis. Fitoterapia. 1993;64:219-27.
25. Suzuki H, Ohta Y, Takino T. Effects of glycyrrhizin on biochemical tests in patients with chronic hepatitis. Double blind trial. Asian Med J. 1983;26:423-38.
26. Zembower DE, Lin YM, Flavin MT, Chen FC, Korba BE. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. Antiv Res. 1998;39:81-8.
27. Kim KH, Kim YH, Lee KR. Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity *in vitro*. Bioorg Med Chem Lett. 2007;17(24):6739-43.
28. Yang G, Chen D. Biflavonones, flavonoids, and coumarins from the roots of *Stellera chamaejasme* and their antiviral effect on HBV. Chem Biodivers. 2008;5(7):1419-24.

29. Sánchez-Lamar A, Fuentes JL, Fonseca G, Capiro N, Ferrer M, Alonzo A, et al. Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using *in vitro* and *in vivo* assays. Toxicol Lett. 2002; 136(2):87-96.

Recibido: 2 de mayo de 2011.
Aprobado: 18 de junio de 2011.

MSc. *Gloria del Barrio Quintero*. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 e/ J e I, el Vedado, Plaza de la Revolución. La Habana, Cuba. Correo electrónico: gbarrio@infomed.sld.cu