

Centro de Investigaciones Biomédicas
Centro de Química Farmacéutica

VIMANG: LOS EFECTOS ANTIGENOTÓXICO Y MODULADOR DE LAS ENZIMAS GLUTATIÓN PEROXIDASA Y GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA

Lic. Lourdes Cancino Badías, Lic. Aida Leiva González, Lic. Gabino Garrido, Lic. Mayté Cossío Ayala y Dr. Elio Prieto González

RESUMEN

Se ha demostrado el efecto antimutagénico de los polifenoles presentes en las plantas, lo que se ha relacionado con la actividad antioxidante y su capacidad de inhibir enzimas activadoras de carcinógenos y de inducir enzimas como la glutatión peroxidasa, la catalasa, la glutatión-S-transferasa y la NAD(P)H quinona reductasa. Se evaluó el posible efecto del VIMANG sobre la frecuencia de roturas de la cadena del ADN en leucocitos murinos tratados con bleomicina. Esto dio como resultado que el extracto de *Mangifera indica* L., VIMANG, protegía del daño genotóxico inducido por la bleomicina. Su acción podría estar relacionada con la captación de especies reactivas del oxígeno porque no modula la actividad de la glutatión peroxidasa. Sin embargo, el VIMANG no protege al ADN del efecto clastogénico de la ciclofosfamida, como tampoco modula la actividad de la glutatión-S-transferasa, enzima que participa en la detoxificación de este genotóxico. La presencia de polifenoles como componentes mayoritarios del extracto pueden explicar los efectos antioxidantes del VIMANG.

Descriptores DeCS: ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO; DAÑO DEL ADN; MANGIFERA INDICA/uso terapéutico; ANTIOXIDANTES/uso terapéutico; PLANTAS MEDICINALES/uso terapéutico; MEDICINA HERBARIA; EXTRACTOS VEGETALES/uso terapéutico; RATONES CONSANGUÍNEOS BALB C.

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) generadas por la exposición a xenobióticos, constituyen una fuente que genera daño en el ADN y compromete la viabilidad celular y afectan la salud humana.

Las plantas contienen numerosas sustancias no nutritivas con actividad biológi-

ca, lo que ha sido motivo de especial atención por sus efectos antivirales y antitumorales;¹ la antimutagenicidad de estos compuestos es una de las temáticas que más se aborda en la actualidad.² Entre los mecanismos propuestos como responsables de esta actividad se encuentran su posibilidad de captar radicales libres,³ la

inhibición de la tasa metabólica de los carcinógenos por las enzimas de fase 1, así como la inducción de enzimas antioxidantes y enzimas detoxificadoras.^{4,5}

En Cuba el extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica* L. (VIMANG) rico en polifenoles, se utiliza como suplemento nutricional. Además, VIMANG mejora la calidad de vida en pacientes con cáncer, así como en afecciones relacionadas con trastornos respiratorios, gastrointestinales y dermatológicos.

Por la composición química del VIMANG y los resultados fitoterapéuticos, se piensa que sería interesante el estudio de la actividad antigenotóxica del extracto por el ensayo cometa y el ensayo de micronúcleos en eritrocitos, y su posible relación con la capacidad de modular la glutatión peroxidasa (enzima antioxidante) y las glutatión-S-transferasa (enzima detoxificadora) en el hígado.

MÉTODOS

Tratamiento: VIMANG fue administrado por vía oral a una dosis de 200 mg/kg de peso, durante 6 d en ratones machos de la línea Balb/c (CENPALAB). Posterior a esta administración, 5 ratones fueron inoculados con bleomicina y otros 5 con ciclofosfamida, mientras que 7 de ellos solo recibieron VIMANG. Se incluyeron 2 grupos como controles positivos de bleomicina (20 mg/kg de peso) y ciclofosfamida (60 mg/kg de peso).

Diseño experimental: Los experimentos de genotoxicidad se realizaron antes de los tratamientos (control), posterior al tratamiento con VIMANG y por último 24 y 48 h después del tratamiento con la bleomicina y la ciclofosfamida, respectivamente. Para determinar las actividades enzimáticas (GPx y GST) se sacrificaron

los animales por dislocación cervical 24 h después de la última inoculación de VIMANG y se obtuvieron los hígados para obtener la fracción citosólica.

Ensayos de genotoxicidad: Para el ensayo cometa se siguió la metodología descrita por Tice, 1995.⁶ La muestra de sangre se mezcló con agarosa regular (0,5 %) y posteriormente las células fueron lisadas. Las láminas se colocaron en desenrollamiento y se corrió la electroforesis, en condiciones de pH 13. La muestra se tiñó con bromuro de etidio y se analizaron 100 núcleos por animal, determinando el porcentaje de células dañadas (células con salida de material) y el porcentaje de células en cada nivel de daño (*nivel 0*: no dañadas; *nivel 1*: migración corta; *nivel 2*: migración media; *nivel 3*: migración larga y *nivel 4*: núcleo no definido). El ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón se realizó según GSCTM, 1995.⁷ Se contaron 8 000 eritrocitos policromáticos por tratamiento para determinar el índice de genotoxicidad (IG) y 400 eritrocitos para determinar índice de citotoxicidad (IC).

Ensayos de actividad enzimática: Cada hígado se homogenizó y fue centrifugado a 12 000 rpm y a la fracción libre de células se le determinó la concentración de proteínas según el método de Lowry (1951). La actividad GPx se midió mediante el *kit* comercial Ransel basado en el trabajo de Plagia y Valentine en 1967. Se midió la disminución de la absorbancia a 340 nm, durante 2 min y se expresó la actividad GPx como U/L de muestra. La actividad GST total se determinó según el método de Habig (1974), utilizando el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) como sustrato específico. La actividad se siguió, midiendo la aparición del complejo tioéter glutatión-dinitrobenzoceno a 340 nm, durante 90 s, a 25 °C.

Análisis estadístico: Se utilizó el paquete estadístico MICROSTAT y se realizó la prueba *t de Student* para un nivel de significación de 95 % y así comparar los tratamientos.

RESULTADOS

Ensayo cometa. Los resultados obtenidos muestran que VIMANG no induce rupturas de simple cadena. No se observan diferencias significativas con respecto al control ($p = 0,3271$) para el porcentaje de células no dañadas (niveles 0 y 1) y dañadas (niveles 2, 3 y 4). Sin embargo, el VIMANG tiene efecto protector sobre el daño al ADN inducido por la bleomicina. No se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento VIMANG y bleomicina ($p = 0,0501$) y se produjo una disminución significativa del porcentaje de células dañadas en los animales que fueron pretratados con el extracto ($p = 3,94 \times 10^{-3}$), con respecto al control positivo. La bleomicina incrementó significativamente el porcentaje de células en los niveles 2 y 3, mientras que en el grupo pretratado con VIMANG no difiere significativamente del control.

Ensayo de micronúcleos en sangre periférica. Se conoce que la ciclofosfamida es una de las más potentes drogas genotóxicas. La ciclofosfamida induce principalmente la formación de monoaductos y enlaces cruzados entre cadenas. En este experimento la ciclofosfamida indujo rupturas cromosómicas que difieren significativamente con el control ($p = 5,76 \times 10^{-4}$). En los animales pretratados con VIMANG disminuye no significativamente ($p = 0,0520$), respecto a los animales tratados solo con ciclofosfamida.

Ensayos de actividad enzimática. La GPX participa en la degradación del

peróxido de hidrógeno, impide así la formación del radical hidroxilo. La inducción de enzimas antioxidantes podría prevenir del daño oxidativo inducido por agentes como la bleomicina. Durante la unión de la bleomicina al ADN se libera al medio intracelular el radical anión superóxido que puede interactuar con H_2O_2 y formar el hidroxilo. A pesar de que este extracto es rico en polifenoles, la administración de VIMANG no modula la actividad de la glutatión peroxidasa ($p = 0,2972$). Por otro lado, a pesar de las diferencias interindividuales encontradas para la concentración de proteínas y actividad enzimática en ambos grupos, no existieron diferencias significativas para la actividad específica de GST total hepática ($p = 0,513$).

DISCUSIÓN

VIMANG no induce la formación de roturas de simple cadena. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Garrido y otros en 1998 (Garrido G, Cancino L, Quintero G, Álvarez X, Núñez A. QF-808. Ensayos de Ames y de Micronúcleos en médula ósea de ratón [Tesis]. 1998), cuando demostraron que VIMANG no induce efecto clastogénico o aneugénico. Además, permite comprobar que los terpenoides y esteroides presentes en el extracto no tienen actividad genotóxica.

Este extracto es rico en polifenoles (20-40 %) y se ha demostrado que los polifenoles del té verde y negro reducen significativamente la tumorigenicidad en roedores por el 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona.⁸ También se ha encontrado, que el curcumín disminuye significativamente la formación de 8-hidroxiguanosina en fibroblastos de ratón⁹ y que la galangina protege del daño inducido por la

bleomicina.³ Aunque en el VIMANG no se encuentran estos polifenoles, los resultados demuestran que el extracto protege de la acción genotóxica de la bleomicina, que actúa mediante la generación de especies reactivas del oxígeno, y esta actividad podría explicar la mejoría de la calidad de vida en los pacientes en estadio terminal de cáncer. Entre los agentes identificados en el VIMANG que pudieran proteger contra la formación de aductos en el ADN, y en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos, está la mangiferina y la amentoflavona, pero no existe confirmación al respecto.

En la última década se han vinculado los estudios de antigenotoxicidad con la modulación de enzimas del metabolismo de xenobióticos,^{2,4,8,9} en este sentido, las plantas han mostrado capacidades antimutagénicas por la heterogeneidad de sus constituyentes.¹⁰ Entre ellos tienen un gran potencial antimutagénico los polifenoles del té verde. Se destacan el [-]-epigallocatecina-3-galato, que se comporta como inhibidor de varias enzimas de fase I como los citocromos P450, el CYP1A, 2B1 y 2E1⁸ y el ácido elágico, como inductor de enzimas detoxificadoras (fase II) como las GSTs^{11,12} y la NAD(P)H quinona reductasa. Este polifenol reduce significativamente la incidencia de carcinomas producidos por la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos porque reduce la actividad de la benzo[a] pireno hidroxilasa.¹²

Aunque VIMANG protege del daño oxidativo, no es capaz de proteger del daño inducido por la ciclofosfamida, ya sea porque no impide la formación de monoaductos ni el entrecruzamiento de cadenas, o porque a la dosis ensayada no fue capaz de modular la expresión de las enzimas que participan en el metabolismo de esta droga. Este resultado hace pensar que la acti-

vidad protectora del extracto se relaciona con la captación de radicales libres y por lo tanto con su actividad antioxidante, como ha sido descrito para otros polifenoles.³

Se ha caracterizado la capacidad anticancerígena de los polifenoles en roedores. En este sentido el ácido elágico ha demostrado su capacidad de inhibición del cáncer inducido químicamente en pulmón, piel, esófago e hígado.¹³ Entre los mecanismos responsables de estos efectos protectores se citan la capacidad de los polifenoles para inhibir enzimas de fase I como los citocromos P450,^{2,10,13} así como su poder de inducción de enzimas antioxidantes y de fase II como catalasa, GPx, glutatión reductasa, UGT, NAD(P)H: quinona reductasa, GST.^{1,2,9} El VIMANG no indujo la actividad específica de GST aunque los polifenoles son el componente mayoritario, pero no aparecen reportes en la literatura que avalen la capacidad de la mangiferina o de la amentoflavona para inducir enzimas antioxidantes y de fase II del metabolismo.

Las flavonas y flavanonas incrementan la actividad específica de GST desde las 12 h posteriores a la administración.^{13,14} Sin embargo, para el tangeretín, otro flavonoide, el incremento de GST ocurre a las 24 h. Aunque no se pueden comparar las dosis utilizadas, la no-concordancia de resultados puede deberse a las diferencias entre los flavonoides presentes, así como a que se trabaja con un extracto donde los flavonoides están sujetos a la influencia de otros componentes, que pudieran "enmascarar" los efectos. Es por ello que los resultados expuestos aquí, reflejan la influencia de factores como la concentración del extracto, la dosis, el tiempo de administración y la proporción en que los polifenoles se encuentran en este, que afectan la inducción de enzimas. Por último, no se puede descartar la posibilidad del estudio con este mismo

extracto de otros órganos blancos como pulmón, intestino delgado, piel y duodeno donde también se ha encontrado inducción de enzimas antioxidantes y detoxificadoras de drogas.

Se concluye que el VIMANG protege del daño causado por la bleomicina al ADN, pero no del daño inducido por la

ciclofosfamida. Este efecto parece estar vinculado con su actividad antioxidante, al captar radicales libres y no porque se induzca la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, ni de enzimas detoxificadoras con la glutatión-S-transferasa.

SUMMARY

The antimutagenic effect of polyphenols present in plants has been demonstrated. This has been associated with their anti-oxidant activity and capacity to inhibit carcinogen-activating enzymes and to induce other enzymes such as glutathion peroxidase, catalase, glutathion-S-transferase and NAD(P)H quinone reductase. The possible effect of VIMANG on the frequency of DNA chain breaks in murine leukocytes treated with bleomycin was evaluated. The result was that the *Mangifera indica* L extract, VIMANG, provided protection against the bleomycin-induced genotoxic damage. Its action may be linked to the capture of reactive oxygen species because it does not modulate glutathion peroxidase activity. However, VIMANG neither protects DNA from the clastogenic effect of cyclophosphamide nor modulates the activity of glutathion-S-transferase, an enzyme involved in detoxification of this genotoxic substance. The presence of polyphenols as main components of the extract can explain the antioxidant effects of VIMANG.

Subject headings: REACTIVE OXIGEN SPECIES; DNA DAMAGE; MANGIFERA INDICA/therapeutic use; ANTIOXIDANTS/ therapeutic use; PLANTS MEDICINAL/ therapeutic use; HERBAL, MEDICINE; PLANTS, EXTRACTS/therapeutic use; MICE, INBRED BALB C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muanza DN, Euler KL, Williams L. Screening and antitumor and anti-VIH activities of nine medicinal plants from Zaire. *Int J Pharmacogn* 1995;33(2):98-106.
2. Anh D, Putt D, Kresty L, Stoner GD, Fromm D, Hollenberg PF. The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes. *Carcinogenesis* 1996;17(4):821-8.
3. Young H, Jun S, Ho C, Wan S, Hun D, Au W. Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mut Res* 1994;311:225-9.
4. Wilkinson VJ, Clapper ML. Detoxification enzymes and chemoprevention division of population science, Philadelphia: Fox Chose Cancer Center, 1997.
5. Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE, Gregory T, Ferguson LR. *In vivo* effects of chlorophyllin on antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 1997;70(1):84-9.
6. Tice R. The single cell gel comet assay: a microgel electrophoretic technique for detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Environmental Mutagenesis; Phillips DH, Venitt S (eds), United Kingdom: Oxford, 1995: 315.
7. CSGMT. Guidelines for testing of chemicals: protocol recommended by the CSGMT JEMS.MMS for the short term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis* 1995;10(3):153-9.
8. Shi ST, Wang ZY, Smith TJ, Hong JY, Chen WF, Yang CS. Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Res* 1994;54(17):4641-7.
9. Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1995;15(9):2065-8.
10. Hartman A, Herkommer K, Glück M, Speit G. DNA-Damaging effects of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet Assay). *Environ Mol Mutagen* 1995;25:180-7.

11. Bladeren PJ van. Influence of non-nutrient plant component on biotransformation enzymes. *Biomed Pharmacother* 1997;51(18):324-7.
12. Barch DH, Rundhaugen LM. Ellagic acid induces NAD(P)H quinone reductase through activation of the antioxidant element of rat NAD(P)H: quinone reductase gene. *Carcinogenesis* 1994;15(9):2065-8.
13. Khan SG, Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea. *Cancer Res* 1992;52(14):4050-2.
14. Siess MH, Philippe JM, Canivenc-Lavier CM, Suschelet M. Time of course induction of rat hepatic drug-metabolizing enzyme activities following dietary administration of flavonoids. *J Toxicol Environ Health* 1992;49:481-96.

Recibido: 10 de febrero del 2000. Aprobado: 18 de mayo del 2000.

Lic. *Lourdes Caneiro*. Centro de Investigaciones Biomédicas "Victoria de Girón". Avenida 146, No. 3102, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: lourdesc@vgiron.giron.sld.cu