

FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE LA HABANA

## Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1

Dra. Suria Valdés García,<sup>1</sup> Dra. Gloria del Barrio Alonso,<sup>2</sup> Dra. Yamilet Gutiérrez Gaitén<sup>3</sup> y Lic. Luis Morier Díaz<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*; un miembro de la familia Euphorbiaceae, frente al virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1), tanto en cultivo celular, específicamente en fibroblastos de prepucio humano, como un modelo animal en ratones Balb-c. El efecto extracelular del extracto sobre VHS-1, resultó ser efectivo, obteniéndose un índice selectivo de 44, lo que apunta hacia una posible acción virucida sobre la partícula. En el ensayo *in vivo*, la administración del extracto acuoso (12 mg/kg), de manera tópica, redujo de forma significativa el desarrollo de lesiones en ratones infectados por vía subcutánea con VHS-1 (1 x 10<sup>6</sup> UFP). Estos resultados sugieren la consideración de *Phyllanthus orbicularis*, como un posible candidato anti VHS-1.

DeCS: PLANTAS MEDICINALES; ENSAYOS CLINICOS/métodos; HERPES VIRUS HUMANO; AGENTES ANTIVIRALES.

La medicina tradicional emplea productos naturales para la cura de diversas enfermedades, entre las que se encuentran las de etiología viral.<sup>1</sup> Recientemente, al nivel mundial, se ha realizado un número importante de ensayos clínicos con esta finalidad, empleando extractos de plantas pertenecientes al género *Phyllanthus*, familia Euphorbiaceae.

En este sentido, algunos reportes demuestran la actividad inhibitoria de especies de este género frente a la ADN polimerasa de hepadnavirus,<sup>2</sup> supresión de la producción de antígenos de superficie contra el virus de la hepatitis B (AgsHB) en cultivos de células de hepatoma de la línea HepA,<sup>3</sup> así como un efecto inhibitorio sobre la reverso transcriptasa del VIH tipo 1.<sup>4</sup>

En Cuba se han reportado más de 60 especies endémicas de *Phyllanthus* y específicamente la

especie *Phyllanthus orbicularis* ha mostrado propiedades antivirales frente a herpes bovino tipo 1 (VHB-1),<sup>5</sup> herpes simple tipo 2 (VHS-2)<sup>6</sup> y hepatitis B (VHB).<sup>7</sup>

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se investigó la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* de un extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*, contra el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1).

### MÉTODOS

#### PREPARACIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL ACUOSO

Las plantas pertenecientes a la especie *Phyllanthus orbicularis* fueron colectadas en la zona de Cajálbana, provincia de Pinar del Río (Cuba) y un ejemplar se depositó en el Jardín

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Agregada. Facultad de Biología. Universidad de La Habana (UH).

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora Titular. Facultad de Biología. UH.

<sup>3</sup> Máster en Ciencias en Tecnología y Control de Medicamentos. Instituto de Farmacia y Alimento. UH.

<sup>4</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf".

Botánico Nacional de Cuba (No. 7-220-HAJB), cuya identificación fue realizada por la doctora Rosalina Berazaín, investigadora de esta institución. Los tallos y hojas de las plantas fueron procesados siguiendo el protocolo de *del Barrio* y otros 2000.<sup>8</sup>

#### CÉLULAS Y VIRUS

Células VERO (ATCC Número: CCL-81) y la línea diploide de fibroblasto de prepucio humano (HPF) (pase 17-20) (donados por el Hospital Central de Asturias, España), crecieron como monocapas, la primera en medio 199 y la segunda en medio mínimo esencial de *eagle* (EMEM) (Seromed), ambos suplementados con 10 % de suero bovino fetal inactivado, 1 % L-glutamina a partir de una solución madre a 200 mM, 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. En el medio de mantenimiento se redujo la concentración de suero 2 %.

Una cepa de VHS-1 sensible al aciclovir (cepa 8WT) fue utilizada en los ensayos antivirales *in vitro* y en ratones (donada por el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, Mahadahonda, España).

Esta cepa se propagó en el cultivo de células diploides de fibroblastos de prepucio humano y su título infectivo viral (TCID<sub>50</sub>) se determinó al 5to. día de la infección en placas de 96 pocillos, según *Reed y Muench* (1938).<sup>9</sup> Con la línea VERO se realizó la cuantificación viral mediante el método de formación de placas (PFU/mL) en medio con 0,7 % de metilcelulosa. Esta lectura se realizó al 3er. día de la infección en placas de 24 pocillos.<sup>10</sup>

El virus obtenido para la realización de los diferentes ensayos se conservó en alícuotas, a -80 °C hasta su uso.

#### ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad del extracto acuoso de *P. orbicularis* se evaluó mediante el método cuantitativo del MTT, basado en el cambio de color que ocurre al reducirse este producto (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5 diphenyltetrazolium bromide) por la acción de enzimas mitocondriales.<sup>11,12</sup>

El ensayo de citotoxicidad fue realizado en placas de 96 pocillos, añadiendo concentraciones crecientes del extracto (80-800 g/mL) a las monocapas del cultivo de células diploides (FPH), en cuadruplicado. Los cultivos fueron incubados a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 72 h se añadió MTT y los cultivos se incubaron por 3 h más bajo las mismas condiciones señaladas. Al cabo de este tiempo se eliminó el medio de los pocillos y el precipitado se solubilizó en 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (BDH). La lectura se realizó a 540 nm mediante un lector SUMA PR-521. La concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) se determinó por análisis de regresión lineal teniendo en cuenta un coeficiente de determinación mayor que 0,9. El experimento se realizó por triplicado.

#### ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL

La evaluación de la actividad antiviral se realizó en monocapas de FPH, mediante determinación de viabilidad celular por el método del rojo neutro,<sup>13,14</sup> utilizando placas de 96 pocillos. En este ensayo se añadieron 100 mL de medio de cultivo que contenían diferentes concentraciones del extracto a razón de 6 pocillos por concentración. Después de 90 min de incubación a 37 °C, se añadieron 10 mL/pocillos de la suspensión viral (100 TCID<sub>50</sub>), excepto en los controles del extracto y células. Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 5 d, momento en que se determinó la concentración capaz de proteger 50 % de las réplicas, para lo cual se utilizó el procedimiento descrito por *Hitoshi* y otros, 1991.<sup>15</sup>

El cálculo de la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) se realizó mediante un gráfico de porcentaje de supervivencia contra las diferentes concentraciones del extracto, para realizar un análisis de regresión lineal, cuyo valor del coeficiente de determinación sea mayor que 0,9. El experimento se realizó por triplicado.

#### ENSAYO VIRUCIDA EXTRACELULAR

Para determinar la capacidad del extracto acuoso de inactivar directamente las partículas de VHS-1, se procedió a mezclar volúmenes iguales de 200 TCID<sub>50</sub> y concentraciones dobles del extracto, incubándose durante 30 min a 37 °C. Al

cabo de este tiempo, cada mezcla fue añadida a los cultivos en monocapa de FPH (50 mL/pocillo), en placas de 96 pocillos (Nunc), empleando 4 réplicas por cada concentración. A los 5 d de incubación a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, se procedió a determinar la actividad antiviral por el método del rojo neutro. Posteriormente, se procedió a determinar la CE<sub>50</sub>, de la misma forma que en el acápite anterior. El experimento se realizó por triplicado.

El índice de selectividad (IS), se calcula como el cociente entre los valores de CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub>, obtenidos en los ensayos anteriores.

#### ENSAYO DE EFICACIA TERAPÉUTICA EN UN MODELO *IN VIVO* DE RATONES INFECTADOS CON VHS-1

Se procedió según la técnica descrita por Kumano, 1987.<sup>16</sup>

Se emplearon 30 ratones adultos Balb-c, machos, provenientes de CENPALAB, los cuales fueron adaptados a condiciones de laboratorio con agua y comida *ad libitum*.

En todos los casos se preparó el flanco derecho de cada ratón para la inoculación viral, mediante el empleo de un depilador. Al día siguiente, la piel desnuda se escarificó, con el empleo de agujas 27, a continuación se procedió a la aplicación en esta área de una suspensión de 1 x 10<sup>6</sup> UFP de una cepa del virus herpes simple tipo 1 sensible a aciclovir y foscarnet (8AWT).

Los 30 ratones se dividieron de la manera siguiente: 10 animales para el grupo control (infectados sin tratar), 10 para el grupo placebo (infectados y tratados tópicamente con el placebo, el cual posee la misma composición química del ungüento, pero carece de principio activo) y 10 para el grupo que recibió el ungüento de *Phyllanthus orbicularis* a una concentración de 0,072 mg de principio activo/ gramo de crema (infectados y tratados tópicamente).

#### ESQUEMA DE TRATAMIENTO

El tratamiento comenzó 8 h después de la inoculación de la cepa viral, mediante aplicaciones tópicas de placebo y ungüento (12 mg/kg), a los grupos correspondientes, 2 veces diarias durante 3 d consecutivos para un total de 6 aplicaciones.

El grado de severidad de la lesión se cuantificó una vez terminado el tratamiento, mediante el empleo de la escala siguiente:

- 0: no lesión o vesículas.
- 1: lesión o vesículas sin inflamación.
- 2: lesión o vesículas con inflamación.

#### PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO

Los valores de CC<sub>50</sub> se calcularon mediante el análisis de regresión lineal de los valores de porcentaje de supervivencia, a las diferentes concentraciones del extracto. A los valores obtenidos en las 3 réplicas se les calculó la media y desviación estándar (DE).

Para el procesamiento estadístico de las muestras del ensayo *in vivo* se empleó la prueba G para tablas de contingencia rxc, perteneciente al paquete de programas Tonystat.<sup>17</sup>

## RESULTADOS

#### ENSAYOS *IN VITRO*

Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad indicaron que las concentraciones de extracto 150 mg/mL no dañaron la viabilidad celular, con respecto a los correspondientes cultivos no tratados (p< 0,05). En todos los casos los efectos tóxicos observados a las mayores concentraciones consistieron en la presencia de gránulos y vacuolas que aumentan en número y tamaño en la medida en que se incrementa la concentración de extracto (datos no mostrados). La concentración citotóxica 50 % fue 234,97 mg/mL (tabla 1). Ese resultado difiere del obtenido previamente por este grupo de trabajo para este cultivo de células diploides, el cual fue de 669 mg/mL (*del Barrio y Parra*).

Esta diferencia pudiera deberse a la variante en concentración de componentes tóxicos presentes en el extracto crudo, proveniente de otra colecta.

**TABLA 1.** Citotoxicidad y actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*

Actividad	CC <sub>50</sub> (g/mL)	CE <sub>50</sub> (g/mL)	IS (CC <sub>50</sub> /DE <sub>50</sub> )
Antiviral	234,97	72,659	3,22
Virucida	234,97	5,35 ± 0,8	44

Los resultados de la actividad antiviral y virucida se muestran en la tabla 1. Se evidencia una acción virucida extracelular, dada por el hecho de que a bajas concentraciones del producto ( $5,35 \pm 0,8$  mg/mL) se inhibe la replicación del virus, lo que permite obtener un valor de índice de selectividad de 44. Este valor es mucho mayor que el obtenido para el ensayo de actividad antiviral (pesquisaje), el cual fue de 3,22 (tabla 1).

#### ENSAYOS *IN VIVO*

Después de 3 d de tratamiento se evidencia el comportamiento de cada grupo, atendiendo al grado de lesión (tabla 2), donde uno se puede percatar que en el grupo tratado de manera tópica con el ungüento de *Phyllanthus*, se produce una inhibición significativa de la incidencia de lesiones, respecto al grupo control, para un valor de  $G= 11,53^{**}$ . En este sentido 60 % de los animales resultaron no lesionados (*score* 0), y del 40 % restante, solo la mitad manifestó un agravamiento de las lesiones (*score* 2).

En el caso del grupo tratado con placebo, no mostró diferencias significativas, respecto al grupo control, a pesar de que 40 % de los animales no resultaron lesionados.

**TABLA 2.** Grado de lesión presente después de aplicar el tratamiento

Grupo	Escala 0	Escala 1	Escala 2
Control	1	0	9
Placebo	4	1	5
Ungüento	6	2	2**

G 11,55 \*\*. Prueba G para tabla de contingencia rxc. \*\*  $p < 0,01$ .

#### DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra la actividad antiviral tanto *in vitro* como *in vivo* de un extracto acuoso de *P. orbicularis*, una especie endémica cubana, contra el VHS-1.

Uno de los criterios más usados para considerar la efectividad de un antiviral, es la obtención de un valor de índice de selectividad, por encima de 10.<sup>18</sup>

El hecho de que el IS sea mucho mayor en el experimento virucida con respecto al ensayo de pesquisaje de acción antiviral, cuando se incuban las células desde 1 h previo a la infección, demuestra la potente acción virucida de *P. orbicularis*. Estos

resultados coinciden con los obtenidos por *del Barrio*, donde una concentración tan baja como 5 mg/mL de *Phyllanthus orbicularis* fue capaz de reducir el título infectivo en 2 logaritmos. Por otro lado, no se descarta que otros posibles mecanismos de inhibición estén presentes, junto al hecho de la cantidad de compuestos activos en el extracto crudo de la planta en ensayo.

La actividad virucida extracelular contra el VHS-1 se ha reportado en extractos de diferentes plantas como es el caso de las antraquinonas presentes en el *Aloe vera*<sup>19</sup> o el extracto acuoso preparado a partir de la *Huithynia cordata*.<sup>20</sup> En el caso de *A. vera*, diferentes fórmulas se aplican para el tratamiento en humanos del herpes labial con muy buenos resultados.

Entre las manifestaciones clínicas que tienen lugar como resultado de la infección producida por el VHS-1, se encuentra la presencia de vesículas, las cuales evolucionan en ocasiones hacia úlceras en la mucosa o zona dañada de la piel, y puede presentarse inflamación o no.<sup>21</sup>

En este estudio se emplea el modelo animal en ratones Balb-c, sistema capaz de reproducir la patogénesis que desarrolla el VHS-1, por lo que ha sido un modelo muy empleado para la evaluación de agentes antivirales.<sup>22</sup>

El hecho de que a los 3 d de tratamiento, el grupo al que se le suministró el ungüento de *Phyllanthus orbicularis*, de manera tópica, haya mostrado tanto una inhibición de los síntomas característicos de este virus, como una reducción significativa de las lesiones herpéticas con respecto al grupo control, sugiere la presencia de un efecto protector, ante la infección provocada; lo cual apoya la actividad antiviral obtenida en los ensayos previos realizados *in vitro*. En este sentido, también se encontró concordancia con otros trabajos realizados por *del Barrio y Parra*, con VHS-2.

Los resultados obtenidos coinciden con *Kurokawa* y otros,<sup>23</sup> *Nawawi* y otros,<sup>24</sup> quienes demuestran la eficacia terapéutica de extractos acuosos de plantas, sobre la infección cutánea en ratones de experimentación, provocada por el virus del herpes simple tipo 1.

Futuros estudios se necesitan para demostrar la acción antiviral de *Phyllanthus orbicularis*, administrado por otras vías, así como para dilucidar su posible mecanismo de acción.

## SUMMARY

The antiviral activity of the aqueous extract of *Phyllanthus orbicularis*, a member of the Euphorbiaceae family, against the simple herpes virus type 1 was evaluated in cellular culture, specifically in fibroblasts of human prepuce, and in an animal model, Balb-c mice. The extracellular effect of the extract on HIV-1 proved to be effective. A selective index of 44 was obtained, which shows a possible virucidal action on the particle. In the trial *in vivo*, the topical administration of the aqueous extract (12 mg/kg) reduced significantly the development of lesions in mice subcutaneously infected with HIV-1 (1 x 10<sup>6</sup> UFP). These results suggest the consideration of *Phyllanthus orbicularis* as a possible anti-HIV-1 candidate

**Subject headings:** PLANTS, MEDICINAL; CLINICAL TRIALS; HERPES VIRUS, HUMAN; ANTIVIRAL AGENTS:

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yao XJ, Wainberg MA, Parniak MA. Mechanism of inhibition of HIV-1 infection *in vitro* by purified extract of *Prunella vulgaris*. *Virology* 1992;187:56-62.
2. Shead A, Vickery K, Pajkos A, Medhurst R, Freiman J. Effects of *Phyllanthus* plant extract on duck hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res* 1992;18(2):127-38.
3. Yeh SF, Hong CY, Huang YL, Liu TY. Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression human hepatoma cells. *Antiviral Research* 1993;20(3):185-92.
4. Chang CW, Lin MT, Lee SS, Liu KC, Hsu FL, Lin J. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase- $\alpha$  activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus mirtifolius*, Moon, and tannins from *Lonicera japonica*. *Thum and Castanopsis hystrix*. *Antiviral Res* 1995;27(4):367-74.
5. Del Barrio G, Parra F. Inhibición de la infectividad del VHB Tipo 1 por un extracto acuoso de *Phyllanthus*. Simposio Internacional de Plantas Medicinales. Ciencia y Homeopatía. Cuba, 1996.
6. 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.
7. Del Barrio G, Caballero O, Rivas L, García L. Efecto de extractos de *Phyllanthus orbicularis* sobre el AgsHB del virus de la Hepatitis B. *Avances Biotecnol Modern* 1994;2:236.
8. Del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000;72:317-22.
9. Reed y Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. *AMJ Hyg* 1938; 27:493-7.
10. Kurokawa M, Ochiai H, Nagasaka K, Neki M, Xu H. Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus and measles virus *in vitro* and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res* 1993;22:175-88.
11. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
12. Takeuchi H, Baba M, Shigeta S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *Viol Methods* 1991;33: 61-71.
13. Wyde PR, Ambrose MW, Meyerson LR, Gilbert BE. The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolic polymers against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats. *Antiv Res* 1993;20:145-54.
14. Swierkosz E, Biron K. Antiviral susceptibility testing. En: David A. Lennette, Edwin H, editors. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and clamydial infections. 7ed. Chapter 7. *Am Public Heal Ass* 1995;139-54.
15. Takeuchi H, Baba M, Shigeta S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-Herpes Simplex Virus compounds. *J Virol Methods* 1991;33:61-71.
16. Kumano Y, Yamamoto M, Mori R. Protection again herpes simplex virus infection in mice by recombinant murine interferon- in combination with antibody. *Antiviral Res* 1987;7:289-301.
17. Sigarroa A. Biometría y Diseño Experimental I y II. La Habana:Editorial Pueblo y Educación;1985.
18. Wyde PR, Ambrose MW, Mayer H, Zolinski CL, Gilbert BE. Evaluation of the toxicit and antiviral activity of carbocyclic 3-deazaadenosine against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in tissue culture and in cotton rats. *Antiviral Res* 1990; 14:215-26
19. Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2463-66.
20. Hayashi T, Hayashi K, Maeda A, Kojima I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J Nat Prod* 1996; 59:83-7.
21. Fields DN. Herpes Simplex Virus. In: Knipe DM, Hanley PM ed. *Fundamental Virology*. 3ed. Philadelphia:Lippincott-Raven; 1996; p.2297-30.
22. Simmons A, Nash AA. Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of recrudescence and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. *J Virol* 1984;52: 816-21.
23. Kurokawa M, Ochiai H, Nagasaka K, Neki M, Xu H. Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus and measles virus *in vitro* and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res* 1993;22:175-88.
24. Nawawi A, Nakamura N, Messelhy MR, Hattori M. *In vivo* antiviral activity of *Stephania cepharantha* against herpes simplex virus tipe-1. *Phytother Res* 2001;15(6):497-500.

Recibido: 30 de enero de 2003. Aprobado: 15 de mayo de 2003.  
 Dra. *Suria Valdés García*. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 e/ J e I, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.