

## ARTÍCULOS ORIGINALES

Universidad de La Habana  
Facultad de Biología. Departamento de Microbiología y Virología.

## INACTIVACIÓN DEL AGSHB POR UN EXTRACTO DE *PHYLLANTHUS ORBICULARIS*

Lic. Gloria del Barrio Alonso<sup>1</sup> y Lic. Annele Roque Quintero<sup>2</sup>

### RESUMEN

Algunas especies del género *Phyllanthus* han demostrado actividad frente al virus de la hepatitis B *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo se evalúa la capacidad de inactivación sobre el AgsHB de un extracto acuoso de la especie endémica *Phyllanthus orbicularis*. Se analizaron 4 concentraciones del extracto (100, 50, 25, 12,5 mg/mL) frente a 34 sueros positivos a este marcador. Todas las concentraciones ensayadas mostraron la capacidad de disminuir el valor de densidad óptica en más del 60 % de los sueros tratados, mientras que el por ciento de sueros que se convirtieron a negativos fue de 88,2 %, 97,1 %, 50 % y 8,8 %, respectivamente. La concentración de 12,5 mg/mL no mostró diferencias estadísticas con respecto al grupo control; mientras que las concentraciones de 100 mg/mL y 50 mg/mL, las cuales no se diferencian estadísticamente entre sí, fueron las más efectivas. Estos resultados muestran que el extracto acuoso de *P. orbicularis* presenta uno o varios compuestos capaces de inactivar *in vitro* al AgsHB.

Descriptores DeCS: ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B/ efectos de drogas; EXTRACTOS VEGETALES/farmacología; PLANTAS MEDICINALES.

### SUMMARY

Some species of *Phyllanthus* genre have showed *in vitro* and *in vivo* activity to hepatitis B. In present paper, we assess inactivation capacity on AgsHB from aqueous extract of endemic *Phyllanthus orbicularis* species. Authors analyze 4 concentrations of extract (100, 50, 25, 12,5 mg/mL) as opposed to 34 positive sera to this marker. All concentrations assayed showed ability to decrease value of optic density in more than 60 % of sera studied, while percent of sera becoming negatives, was of 88,2 %, 97,1 %, 50 %, and 8,8 %, respectively. In concentration of 12,5 mg/mL there was not statistically differences with regard to controls; while concentrations of 100 mg/mL and 50 mg/mL, which weren't statistically different each other, were the most effective ones. These results show that aqueous extract of *P. orbicularis* present one or some compounds, able to inactivate *in vitro* AgsHB.

Subject headings: HEPATITIS B SURFACE ANTIGENS/drug effects; PLANT EXTRACTS/pharmacology; PLANTS, MEDICINAL.

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB), constituye uno de los principales problemas de la salud en el ámbito mundial. Este virus es la principal causa de hepatitis crónica y aguda, cirrosis y carcinoma hepatocelular primario.<sup>1</sup> Según estimación de la Organización Mundial de la Salud, existen en el mundo 350 millones de portadores crónicos,<sup>2</sup> muchos de los cuales mueren anualmente por la carencia de una terapia efectiva disponible de esta enfermedad.

Varios investigadores, en la búsqueda de antivirales eficaces contra este virus, han encaminado sus pasos al estudio de plantas con posible actividad frente al VHB, debido a la

existencia de un buen número de especies, que forman parte de la tradición popular, utilizadas para curar afecciones del hígado.<sup>3</sup>

Las plantas del género *Phyllanthus*, familia *Euphorbiaceae*, han sido ampliamente estudiadas con este propósito. De las más de 550 especies pertenecientes al género, se han citado 15 empleadas para el tratamiento de la ictericia o enfermedades del hígado, algunas de las cuales han sido evaluadas frente el VHB *in vitro* e *in vivo*.<sup>4</sup>

En Cuba, hay más de 60 especies reportadas, muchas de ellas endémicas, de las cuales *P. microdictyus*,

*P. chamaecristoides*, *P. formosus*, han sido evaluadas para su capacidad inactivante del AgsHB.<sup>5</sup>

Con el objetivo de continuar el estudio de las especies endémicas de Cuba, en el presente trabajo se evalúa la actividad anti-hepatitis B del extracto acuoso de una colecta de plantas pertenecientes a la especie *Phyllanthus orbicularis*.

## MÉTODOS

**Colecta de las plantas.** Plantas de la especie *P. orbicularis* fueron colectadas en la zona de Cajalbana, Pinar del Río, en el mes de Agosto de 1993, con la ayuda de la Dra. Rosalina Berazaín, especialista del Jardín Botánico Nacional, quien colaboró en la localización e identificación de las plantas.

**Preparación del extracto acuoso de *P. orbicularis*.** Los tallos y hojas de las plantas fueron secados y molidos en un molino (Christy & Norris LTD) de 8 pulgadas. Posteriormente se realizó un extracto acuoso al 10 % realizando la extracción a 100 °C durante 4 h. Después de filtrada la mezcla se liofilizó y resuspendió de PBS (solución buffer fosfato de sodio, pH-7,2) a concentraciones de 100, 50, 25 y 12,5 mg/mL.

**Ensayo de inactivación in vitro.** Se incubaron 100 µL de sueros positivos al AgsHB (suministrados por el Instituto de Gastroenterología y el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de La Habana) con igual volumen del extracto a cada una de las concentraciones empleadas, a una temperatura de 35 ± 1° C durante 48 h. Se emplearon controles de sueros (mezcla de suero y PBS) y controles del extracto para cada una de las concentraciones (mezcla de extracto y PBS).

La evaluación de la inactivación se realizó mediante un ELISA *sandwich* con el estuche diagnóstico comercial "AgsHB (+)" de la Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay".

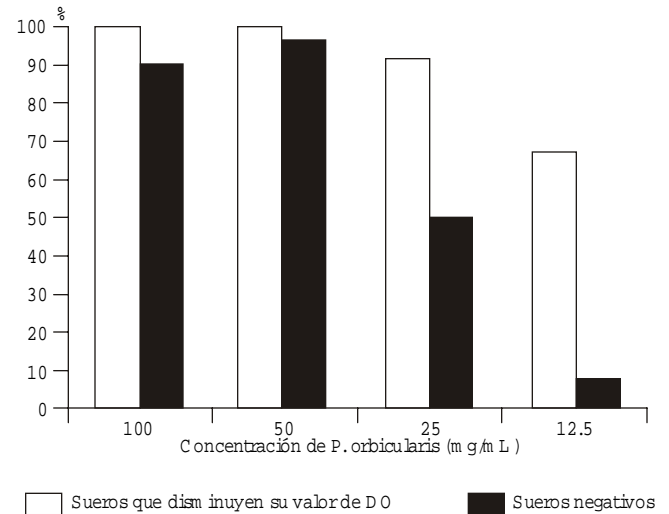
**Estudio estadístico.** Para el procesamiento estadístico de los resultados se utilizó el *test G* para tablas de contingencia.<sup>6</sup>

## RESULTADOS

La presencia del AgsHB fue evaluada en cada uno de los 34 sueros tratados con el extracto y en los controles sin tratar, analizando el número de sueros que disminuía su valor de densidad óptica (DO) y cuántos se convertían en negativos para cada una de las concentraciones del extracto.

Todos los sueros tratados con las concentraciones más altas (100 y 50 mg/mL) disminuyeron sus valores de DO con respecto a los controles correspondientes, lo que difiere de lo ocurrido para las concentraciones de 25 mg/mL y 12,5 mg/mL, en las que se observó disminución de DO para 31 y 20 sueros del total, respectivamente.

El número de sueros tratados que se convirtieron a negativos varió para cada una de las concentraciones. Para las de 100 y 50 mg/mL el por ciento de sueros negativos es 88,2 % y 97,1, respectivamente; con las 2 concentraciones la seroconversión a negativo, no excede el 50 % (fig.). En todos los casos los controles del extracto resultaron negativos.



**Fig.** Inactivación del AgsHB por el extracto de la colecta Agosto/93 de *P. orbicularis*

Para analizar el comportamiento estadístico de los resultados se compararon los controles de sueros sin tratar con las muestras tratadas para cada concentración, observándose que existen diferencias altamente significativas, excepto en el tratamiento con la menor concentración (12,5 mg/mL), que no difiere estadísticamente del grupo control.

**TABLA 1.** Comparación por test G del número de sueros negativos y positivos en cada concentración con respecto a los controles

Comparación	Valor G	Significación
Control vs C1	61,536	***
Control vs C2	76,702	***
Control vs C3	24,161	***
Control vs C4	1,517	ns

C1 - 100 mg/mL      C2 - 50 mg/mL  
C3 - 25 mg/mL      C4 - 12,5 mg/mL

El análisis del conjunto de los tratamientos señaló que existían diferencias altamente significativas en el mismo ( $G = 80,783$ ), por lo que se compararon las 4 concentraciones entre sí para determinar dónde se encontraban dichas diferencias. Esto permitió establecer que existen diferencias significativas entre los pares de concentraciones ana-

lizados, excepto entre las 2 concentraciones más altas, para las que no se halló diferencia estadística (tabla 2).

**TABLA 2.** Comparación por test G de las concentraciones para determinar dónde se encuentran diferencias significativas

Comparación	Valor G	Significación
C1 vs C2	0,886	ns
C1 vs C3	10,388	**
C1 vs C4	45,091	***
C2 vs C3	19,197	***
C2 vs C4	59,195	***
C3 vs C4	12,742	***

C1 - 100 mg/mL      C2 - 50 mg/mL  
C3 - 25 mg/mL      C4 - 12,5 mg/mL

## DISCUSIÓN

El potencial antiviral del género *Phyllanthus* frente a los virus de la familia *Hepadnaviridae* ha sido establecido previamente por varios autores que han evaluado diferentes especies en ensayos *in vitro* e *in vivo* frente al VHB,<sup>7-9</sup> al virus de la hepatitis B de los patos (DHBV)<sup>10</sup> y al virus de la hepatitis de la marmota (WHB),<sup>11</sup> con buenos resultados referidos a la inhibición de la actividad DNA polimerasa y la expresión del antígeno de superficie.

Debido a la ausencia de sistemas experimentales adecuados, se empleó un ensayo *in vitro*, descrito, en 1982, por *Thyagarajan* y cols., para detectar la presencia de AgsHB en sueros positivos tratados con extractos acuosos de *Phyllanthus orbicularis*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el extracto acuoso de *P. orbicularis* tiene la capacidad de inactivar al AgsHB *in vitro*, lo que coincide con lo reportado por *Thyagarajan* y cols., 1982, *Mehrota* y cols., en 1991 y del *Barrio* y cols., en 1995, para otras especies del género.<sup>5,7,12</sup>

Como se pudo observar las 4 concentraciones ensayadas tienen la capacidad de disminuir el valor de D.O. en más del 60 % de los sueros tratados. Si se tiene en cuenta el análisis estadístico realizado para el número de sueros negativos y positivos, se puede plantear que la concentración de 12,5 mg/mL no ofrece una disminución significativa, pues no difiere estadísticamente del grupo de sueros no tratados.

En cuanto a las 3 concentraciones restantes se plantearon que las más efectivas son 100 y 50 mg/mL, pues

todos los sueros disminuyen su valor de D.O., y aunque la cantidad de sueros que se convierten no es la misma en ambos casos (88 % y 97 %), respectivamente) no existen diferencias significativas entre ellas y sí con respecto al resto.

Por lo anteriormente analizado se dice que existe uno o varios compuestos presentes en el extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* capaces de inactivar *in vitro*, siendo este más efectivo cuando se emplean concentraciones de 100 y 50 mg/mL.

La confirmación de este planteamiento y su mejor esclarecimiento requieren de ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan precisar qué compuestos son los responsables de esta actividad, así como la reproducción de los resultados aquí obtenidos con otras colectas de la planta.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moyer L, Mast E. Hepatitis B: virology, epidemiology, diseases and prevention, and an overview of viral hepatitis. *Am J Prev Med* 1994;10:45-55.
2. WHO. The World Health Report 1998. Life in the 21<sup>st</sup> century: a vision for all. 1998.
3. Roig E, Mesa JT. Plantas medicinales aromáticas o venenosas en Cuba. La Habana:Ed. Ciencia y Técnica,1974:85-8.
4. Unander DW, Webster GL, Blumberg BS. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): Clustering of antiviral uses and other effects. *J Ethnopharmacol* 1995;45:1-18.
5. Barrio G del, Caballero O, Chevalier P. Inactivación *in vitro* del AgsHB por extractos de plantas del género *Phyllanthus*. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47:127-30.
6. Sigarroa A. Biometría y diseño experimental 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> parte. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1985.
7. Thyagarajan SP, Thiruneelakantan K, Subramanian S, Sundaravelu T. *In vitro* inactivation of HbsAg by *Eclipta alba* Hassk. and *Phyllanthus niruri* Linn. *Indian J Med Res* 1982;76(Suppl):124-30.
8. Thyagarajan SP, Subramanian S, Thiranasundaru T, Venkateswaran PS, Blumberg BS. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet*. 1988;2:764-6.
9. Yeh SF, Hong CY, Huang YL, Liu TY, Choo KB, Chou CK. Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res* 1993;20:185-9.
10. Shead A, Vickery K, Pajkos A, Medhurst R, Freiman J, Dixon R, et al. Effect of *Phyllanthus* plant extract on duck hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res* 1992;18:127-38.
11. Venkateswaran PS, Millman I, Blumberg BS. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and Woodchuck hepatitis B viruses *in vitro* and *in vivo* studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:274-8.
12. Mehrota R, Rawat S, Kilshrestha DK, Goyal P, Patnaik GK, Dhawan BN. *In vitro* effect of *Phyllanthus amarus* on hepatitis B virus. *Indian J Med Res* 1991;93:71-3.

Recibido: 10 de mayo de 1999. Aprobado: 2 de septiembre de 1999.  
*Gloria del Barrio Alonso*. Universidad de La Habana. Facultad de Biología. Calle 25 e/n J e I. Vedado. Plaza.