



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones Científicas  
Cuba

Vernhes, Marioly; González-Pumariega, Maribel; Andrade, Luciana; Martins Menck, Carlos Frederico;  
Sánchez-Lamar, A.

Efecto tóxico de los extractos acuosos de pinus caribaea y halimeda monile en células humanas

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 41, 2010, pp. 1-7

Centro Nacional de Investigaciones Científicas  
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220509067>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

**Efecto tóxico de los extractos acuosos de *pinus caribaea* y *halimeda monile* en células humanas.**

**Cytotoxic effect of *pinus caribaea* and *halimeda monile* aqueous extracts in human cells.**

Marioly Vernhes<sup>1</sup>, Maribel González-Pumariega <sup>2</sup>, Luciana Andrade<sup>3</sup>, Carlos Frederico Martins Menck <sup>3</sup> and Sánchez-Lamar A <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. de Radiobiología, Centro de Desarrollo de la Energía Nuclear (CEADEN), Calle 30, # 502, e/5ta y 7ma, Miramar, Playa 6122, C. Habana, Cuba, tel.537 202 1422.  
[mariolys@ceaden.edu.cu](mailto:mariolys@ceaden.edu.cu)

<sup>2</sup> Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25, # 455, e/ I y J, Vedado, Plaza 10400, C. Habana, Cuba, tel. 537 832 8542.

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, Av. Prof Lineu Prestes, 1374, Sao Paulo, 05508-900, Brazil.

**RESUMEN.** Relacionado con la perspectiva farmacológica y/o nutricional que presentan algunas plantas y algas, el uso de estudios preclínicos que evalúan sus efectos tóxicos mutagénico y/o carcinogénico aumenta. Especies pertenecientes al género *Pinus* y género *Halimeda* han atraído la atención de especialistas por sus propiedades antioxidantes. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la toxicidad de los extractos acuosos de *Pinus caribaea* y *Halimeda monile* en células humanas. Dos líneas celulares transformadas con fragmento de SV40 fueron usadas como modelo experimental. Las células MRC5 y XP4PA fueron expuestas a diferentes concentraciones de ambos extractos durante 48 horas. El efecto citotóxico de los extractos fue evaluado mediante el ensayo de sobrevivencia clonogénica. Para ambas líneas celulares, el extracto acuoso de *P.caribaea* fue más tóxico que el extracto acuoso de *H.monile*. Para *P.caribaea*, dosis iguales y superiores a 10 µg/mL inhibieron la capacidad de formación de colonias en ambos tipos de células. Sin embargo, el efecto tóxico del extracto de *H.monile* se mostró a partir de las dosis 100 µg/mL y 2000 µg/mL para las células MRC5 y XP4PA respectivamente.

**ABSTRACT.** In the perspective of pharmacological and/or nutritional usefulness of plants and seaweeds, some preclinical studies in order to evaluate their toxic, mutagenic and/or carcinogenic effect increases. Species belong to *Pinus* and *Halimeda* genera have attracted the attention of specialists for their antioxidant properties. This investigation was aimed to evaluate the toxicity of *Pinus caribaea* and *Halimeda monile* aqueous extracts against human cells. Two SV40 transformed cell lines were used as experimental models. MRC5-SV and XP4PA cells were exposed at different concentrations of both aqueous extracts during 48 hours. The toxic effects of extracts on cells were evaluated through clonogenic cell survival. The ratio of colonies of cells treated with extracts and those not treated was taken as cell survival ability. For both cell lines, aqueous extract of *P.caribaea* was more cytotoxic than *H.monile* extract. For *P.caribaea* extract, equal and higher doses of 10µg/mL inhibited colony formation capacity in MRC5 and XP4PA cells. Nevertheless, cytotoxic effect of *H.monile* extract was showed from 100 µg/mL and 2 mg/mL concentration in MRC5 and XP4PA cells respectively.

**Palabras claves:** *Pinus caribaea*, *Halimeda monile*, citotoxicidad, sobrevivencia clonogénica

**Keywords:** *Pinus caribaea*, *Halimeda monile*, citotoxicity, clonogenic cell survival

## INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas para fines terapéuticos es una práctica muy antigua y ampliamente difundida.<sup>1</sup> De igual manera, especies de la flora marina, como las algas, han sido extensamente investigadas por su uso la biomedicina y en la cosmética, además de sus potencialidades nutritivas.<sup>2-5</sup>

Especies pertenecientes al género *Pinus*, han sido estudiadas por sus propiedades antioxidantes y antimicrobiana fundamentalmente.<sup>6-8</sup> Extractos de la corteza de especies de este género se emplean por pueblos del mundo como remedios etnobotánicos, como antidiarreico, antiparasitario, en el tratamiento de la gonorrea, la disentería, la diabetes, para el tratamiento de la impotencia y como inmunoestimulantes.<sup>9</sup> Algas del género de *Halimeda* también han sido estudiadas por su capacidad antioxidante,<sup>2, 10, 11</sup> han mostrado tener un marcado efecto protector frente a la muerte inducida por cianuro de potasio y el cloruro de metil mercurio<sup>10, 12</sup> y constituyen excelentes neuroprotectores.<sup>12</sup>

A pesar de estas amplias bondades terapéuticas, especies de plantas y algas, pueden contener sustancias tóxicas que perjudican la salud humana.<sup>1, 13</sup> Ejemplo de ello son compuestos químicos complejos como, alcaloides, glicósidos, saponinas y terpenoides presentes en plantas.<sup>14, 15</sup> De las algas es conocido, un sinnúmero de especies tóxicas, la naturaleza química de las sustancias que le dan esta propiedad y los efectos que causan en la salud humana.<sup>16</sup>

El estudio de las propiedades tóxicas, genotóxicas, mutagénicas y/o carcinogénicas, de compuestos de fuentes naturales que puedan ser de uso frecuente en la población constituye un requisito preclínico imprescindible para que estos compuestos puedan ser registrados y reconocidos como productos farmacéuticos consumibles por el ser humano.<sup>17</sup>

Trabajos experimentales *in vitro* e *in vivo* han sido realizados con el fin de evaluar las propiedades tóxicas de especies de los géneros *Pinus* y *Halimeda*. En particular, sobre los extractos de *Pinus caribaea* y *Halimeda monile* se han realizado evaluaciones tóxicas mediante el empleo de diversos modelos biológicos.<sup>18-21</sup> Sin embargo, es limitada la información que se maneja acerca del efecto tóxico de estos extractos en células humanas. En tal sentido, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto tóxico de los extractos acuosos obtenido de estas especies, en las líneas celulares MRC5 y XP4PA, mediante el ensayo de sobrevivencia clonogénica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Extractos y concentraciones evaluadas

El extracto acuoso de *Pinus caribaeae*, Morelet (EPC) fue obtenida de la corteza de árboles de esta especie de veinte años de edad, ubicados en la localidad de Viñales, Provincia de Pinar del Río. Fue donado para este estudio, por el Dr. Jorge Luis Santana del Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas. La citotoxicidad del extracto fue evaluada en las dosis: 0.001- 1000 µg/ mL.

El extracto acuoso de *H. monile* (EHM) se obtuvo de especies colectadas en la playa de los Bajos de Santa Ana, en el Municipio Punta Brava, provincia La Habana, en Febrero y Junio del 2007. El material fue secado, pulverizado y tamizado. Se homogenizó en agua destilada (1:5 w/v). El homogenizado se centrifugó y el sobrenadante se liofilizó. La citotoxicidad del extracto fue evaluada en las dosis: 0.001- 2000 µg/mL.

### Líneas celulares y condiciones de cultivo

Fueron empleadas dos líneas celulares transformadas con un fragmento de SV40. Las células NER proficientes, provenientes de las biopsias de pulmón de individuos sano (MRC 5-SV), y células NER deficientes obtenidas de biopsias de piel de pacientes con Xeroderma Pigmentosum (XP4PA, grupo de complementación XPC). Las células se mantuvieron creciendo en medio de cultivo (DMEM; invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; Cultilab, Campinas, SP, Brasil), a 37° C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Ensayo de sobrevivencia clonogénica**

Aproximadamente  $1 \times 10^3$  células en crecimiento exponencial fueron plaqueadas. Después de 16h de incubación el medio fue sustituido por medio fresco suplementado con las diferentes concentraciones de los extractos. Se incubaron las células por un período de 48h. Luego este medio fue retirado y se añadió medio sin extracto, nuevamente se incubaron por un período de 4-6 días. Las colonias formadas fueron teñidas con una solución de violeta cristal al 1% y contadas.

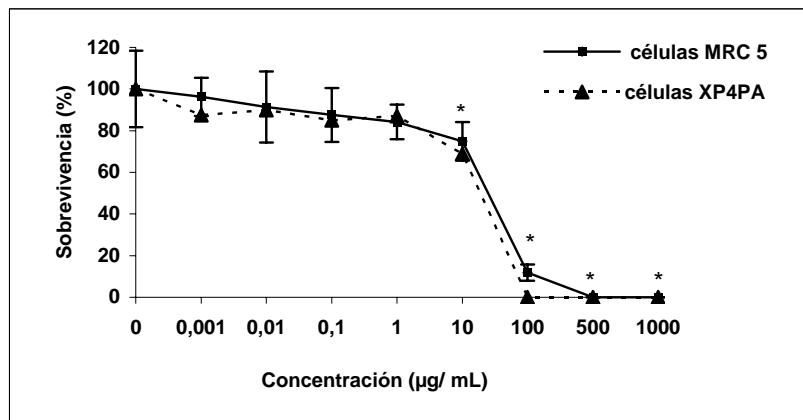
### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados en el programa Statistica 6.1, Copyright Stat Soft, Inc 1984-2001. Se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar de cada tratamiento. Se determinó normalidad, homogeneidad de varianza y se realizó el ANOVA para los datos. Se compararon las medias mediante la prueba de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

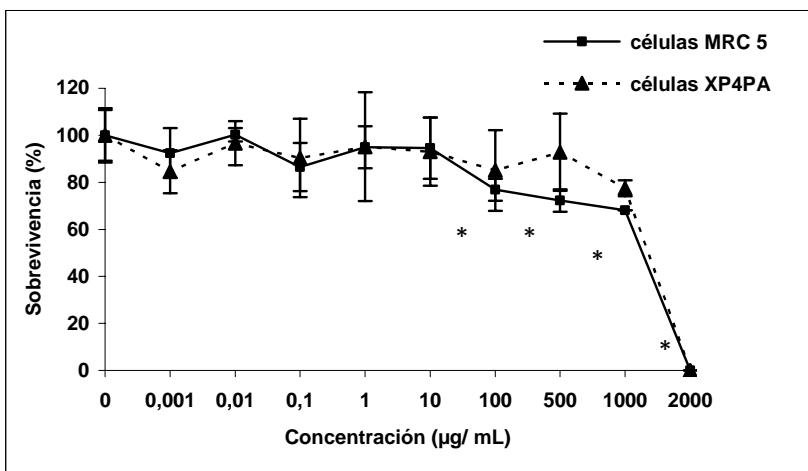
### **Citotoxicidad de los extractos de *P. caribaea* y *H. monile*.**

Ante el tratamiento con EPC ambas líneas celulares presentaron similar comportamiento. La capacidad de formación de colonias de las células disminuye de manera dependiente de las dosis del extracto. El efecto citotóxico de EPC fue significativo a concentraciones iguales y superiores a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El  $\text{DL}_{50}$  de EPC para las células MRC 5 y XP4PA es de 29.19 y 18.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente (Fig. 1).



**Fig. 1.** Efecto del extracto acuoso de *P. caribaea* en la viabilidad de las células MRC 5 y XP4PA. Cada valor representa las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. (\*) significativo para una  $p < 0.05$ , en la prueba Dunnett.

En el caso del EHM, el efecto inhibitorio en la sobrevivencia de las células MRC5 y XP4PA fue significativo a concentraciones  $\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $\geq 2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. El  $\text{DL}_{50}$  de EHM es de 1189.47  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las células MRC 5 y 1615.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las células XP4PA (Fig. 2).



**Fig. 2.** Efecto del extracto acuoso de *H.monile* en la viabilidad de las células MRC 5 y XP4PA. Cada valor representa las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. (\*) significativo para una  $p < 0.05$ , en la prueba Dunnett.

La toxicidad del extracto acuoso de *P.caribaea* se manifestó de manera similar en ambas líneas celulares a pesar de presentar diferentes “background” genéticos,<sup>22</sup> una posible explicación a este resultado es que fitocomponentes presentes en EPC tienen un mismo blanco de acción molecular, desencadenando así procesos que inhiben la división celular o conlleven a la muerte celular.

Extractos obtenidos de diversas especies vegetales que poseen catequinas oligoméricas, compuestos flavónicos, como flavonas e isoflavonas, y taninos son capaces de inhibir la actividad de enzimas, como la elastasa<sup>23</sup> y la topoisomerasa II.<sup>24-26</sup> Recientes investigaciones también indican que fitocomponentes de este mismo extracto son capaces de interactuar e inhibir enzimas de restricción como Bam HI, Eco RI y Pvu II.<sup>20</sup> Los taninos han sido reportados como los principales responsables de la interacción de fitocomponentes de los extractos vegetales con proteínas. Esta propiedad se debe a la gran cantidad de grupos hidroxilo fenólicos presentes en su estructura que posibilita la formación de puentes de hidrógeno entre estos grupos y el oxígeno del grupo carbonilo de los enlaces peptídicos.<sup>27</sup> El estudio fitoquímico de EPC ha demostrado la presencia de compuestos polifenólicos y un alto contenido de taninos,<sup>6</sup> la presencia en el extracto de algunos de los elementos vegetales antes mencionados pueden ser responsables de interacciones entre polifenoles y proteínas importantes en el proceso de viabilidad celular.

Adicionalmente reportes de nuestro grupo de investigación indican que el extracto es capaz de inducir roturas de cadenas en el ADN, siendo esta capacidad clastogénica dependiente de la concentración y el tiempo de exposición.<sup>19</sup> Esta propiedad clastogénica ha sido atribuida principalmente a los taninos, produciendo roturas y recombinación cromosómica en cultivo celulares e inducen eficientemente la formación de micronúcleos como indicador de daño cromosómico en células V79 de Hamster Chino.<sup>28</sup> El efecto genotóxico demostrado para este extracto puede estar relacionado con el efecto tóxico observado para ambas líneas celulares.

La toxicidad de EPC también puede estar relacionada con la presencia de metales como el Cadmio (6). Este metal pesado, es tóxico, y puede acumularse en órganos vitales y producir toxicidad de forma progresiva, algunos autores también indican que tiene efecto neoplásico.<sup>29</sup>

Tomando los resultados descritos para el extracto de *H. monile*, indican que las células MRC5 fueron más sensibles al tratamiento con este extracto que las células XP4PA. Una posible explicación sería que las células XP4PA, al ser células de la piel, podrían tener respuestas de defensa más eficientes frente a agentes dañinos externos.

Para las algas ha sido descrita la presencia de bromofenoles y estos compuestos han mostrado poseer capacidad citotóxica principalmente en líneas celulares tumorales.<sup>30,31</sup> Especies del género *Halimeda*, en particular especies como la evaluada en este trabajo y *H. opuntia* presentan un alto contenido de ácidos fenólicos principalmente ácido salicílico.<sup>11</sup> Este compuesto, ha mostrado propiedades tóxicas en líneas celulares normales y tumorales,<sup>33,34</sup> su presencia en EHM puede ser responsable del efecto tóxico indicado. Otras investigaciones han demostrado la capacidad de estas algas de generar daño en el ADN.<sup>19,35</sup> Dicho efecto genotóxico puede estar relacionado con el efecto inhibitorio de EHM en la viabilidad de las líneas celulares empleadas en esta investigación.

## CONCLUSIONES

Los extractos evaluados resultaron tóxicos para las células MRC5 y XP4PA. Tal efecto se produjo por *P. caribaea* a concentraciones (10 µg/mL) menores que las del extracto de *H. monile* (100 y 2000 µg/mL). Esto podría explicarse por la diferente composición fitoquímica de estas especies como respuesta adaptativa frente a hábitats desiguales.

Los resultados obtenidos empleando células humanas como modelo experimental, constituyen una valiosa aproximación al conocimiento de la toxicidad de estas especies para diversos fines terapéuticos y/o alimenticios.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al financiamiento brindado por CAPES al proyecto de investigación conjunta Capes (Brasil)- MES (Cuba) 027.

A la Dra. Ana María Suárez del Centro de Investigaciones Marinas por autenticar la colecta del algas.

Al Dr. Santana por facilitarnos el extracto de *P. caribaea*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raskin I, Ribnicky DM, Kormamytsky S, Ilie N, Poulev A, Borisjue N et al. Plants and human health in the twenty- first century. Trends in Biotechnology. 2002;20(12):522-31.
2. Huang H, Wu S, Liao H, Jiang C, Huang R, Chen Y et al. Induction of apoptosis by three algae through generation of reactive oxygen species in human leukemia cells lines. J Agric. Food Chem. 2005;53(5):1776-81.
3. Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falcão V, Tonon A, Lopes NP et al .Metabolites from algae with economical impact Comparative Biochemistry and Physiology. 2007; 146:60-78.
4. Kim MS, Kim JY, Hwan W, Sun S. Effects of seaweed supplementation on blood glucose concentration, lipid profile, and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. Nutr Res Pract. 2008;2(2):62-7.
5. Batista AE; Charles MB, Mancini-Filho J, Vidal A. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Rev Cubana Plant Med. 2009;14(2).
6. Santana JL, Sánchez L, Sánchez R. Evaluación de las propiedades antioxidantes de los taninos vegetales extraídos de la biomasa forestal: Actividad superóxido dismutasa e inhibición de la peroxidación lipídica. Contribución a la Educación y Protección Ambiental. Edit. Academia. C. Habana. 1999; p.100-105.
7. Santana JL, Martínez F, Simón R, González A, Codorniú E, Mesa L, et al. Aprovechamiento de residuales forestales con actividad biológica antioxidante. Contribución a la Educación y Protección Ambiental. 2000; 1. p.315.
8. Rubial JL, Dubet M, Luzardo F, Noa E, Vargas LM, Santana JL. Inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana por extractos de *Pinus caribaea* Morelet. Revista Cubana de Farmacia. 2003;37(2).
9. NAPRALERT. Base de datos sobre productos naturales y su empleo como productos de salud, Universidad de Illinois. 2002.

10. Linares AF, Loikkanene JJ, Jorge MF, Soria R, Novoa A. Antioxidant and neuroprotective activity of the extract from the seaweed, *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, against *in vitro* and *in vivo* toxicity induced by methyl-mercury. *Vet. Hum. Toxicol.* 2004;46(1):1-5.
11. Vidal A, Silva de Andrade-Wartha ER, de Oliveira e Silva AM, Pavan R, Lima A, Fallarero A, et al. Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. *ARS Pharmaceutica*. 2009;50(1):24-31.
12. Fallarero A, Loikkanene J, Mansito P, Castañeda O, Vidal A. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*. 2003;10:39-47.
13. Rodríguez, N. La utilidad de las plantas medicinales en Costa Rica. 1 ed. Editorial Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 2001.
14. Pawar VC, Thaker VS. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*. 2006;49(4):316-23.
15. Park IK, Kim JN, Lee YS, Lee SG, Ahn YJ, Shin SC. Toxicity of plant essential oils and their components against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *J Econ Entomol.* 2008;101(1):139-44.
16. Arboleda O. Algas y medicina. *Actualidades Biológicas*, 1974;7 (24).
17. International Organization for Standardization. ISO 10993-11: Biological evaluation of medical devices. Designing Subchronic and Chronic Systemic Toxicity Tests. [Consultada: 12 de mayo de 2010]. <http://marketplace.aami.org/eseries/scriptcontent/docs/Preview%20Files%5C10993110610preview.pdf>.
18. Fuentes JL, Vernhe M, Cuetara E, Sánchez-Lamar A, Santana JL, Llagostera M. Tannins from barks of *Pinus caribaea* protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by γ-rays. *Fitoterapia*. 2006;77:116-20.
19. Vernhes M. *Phyllanthus orbicularis* HBK, *Pinus caribaea* Morelet y *Halimeda monile* (Borgesen) Collins&Hervey: sus potencialidades como protectores del ADN frente al daño producido por radiaciones UV. [Tesis presentada en opción al Título Maestro en Bioquímica], Mención Toxicología. Facultad de Biología. Universidad de la Habana. 2008
20. González R. Evaluación de la capacidad genotóxica del extracto acuoso de *Pinus caribaea*, Morelet mediante ensayos *ex vivo* con DNA plasmídico. Tesis presentada en opción al Título Licenciado en Bioquímica. Facultad de Biología. Universidad de la Habana. 2009.
21. Bada AM, Santana JL, González BO, González Y, González C, Arteaga ME, et al. Toxicidad crónica de polvo de taninos obtenidos de corteza de *P. caribaea* Morelet por vía oral en ratas. *Rev Cubana Plant Med.* 2009;14(1).
22. Lima-Bessa KM, Armelinia M, Chigancas V, Jacsync J, Amarante-Mendesc G, Sarasib A, et al. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair*. 2008;7:303-12.
23. González Y, Peña M, Sánchez R, Santana J. Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. *Revista Cubana de Ciencias Biomédicas*. 2001;20(1):16-20.
24. Kahsiwada Y, Nonaka G, Nishioka I, Lee K, Bori I, Fukushima Y, et al. Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*. *J Natural Products*. 1993;56:487-92.
25. Finlay G, Holdaway K, Baguley M. Comparison of the effects of genistein and amsacrine on leukemia cell proliferation. *Oncol Res.* 1994;6:33-37.
26. Ferguson L. Role of plants polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* 2001;475:89-111.
27. Ramos G, Frutos P, Giráldez FJ, Mantecón AR. *Arch Zootec.* 1998;47:597-620. Estación Agrícola Experimental. CSIC. León. España
28. Ferguson L, van Zijl P, Holloway W, Jones W. Condensed tannins induce micronuclei in cultured V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res.* 1985;158:89-95.
29. Bryce-Smith D. Heavy metals as contaminants of human environ. Peter G. Publ Edu Tech. Subgroup. The Chemical Society London. 1997:21-23.
30. Withfield F, Floding C, Helidoniotis F, Shaw K, Svoronos D. Distribution of bromophenols in species of marine algae from Eastern Australia. *J Agric Food Chem.* 1997;47:2367-73.

31. Ma M, Zhao J, Wang S, Li Sh, Yang Y, Shi J, et al. Bromophenols Coupled with Methyl  $\gamma$ -Ureidobutyrate and Bromophenol Sulfates from the Red Alga *Rhodomela confervoides*. *J Nat Prod.* 2006;69(2):206-210.
32. Shi D, Li J, Guo Sh, Su H, Fan X. The antitumor effect of bromophenol derivatives *in vitro* and *Leathesia nana* extract *in vivo*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology.* 2009;27(2):277-282.
33. Cai Q, Dmitrieva N, Michea L, Rocha G, Ferguson D, Buró M. Toxicity of Acetaminophen, Salicylic acid, and Caffeine for first-passage rat renal inner medullary collecting duct cells. *The journal of Pharmacology and experimental therapeutic.*, 2003;306(1):35-42.
34. Vad NM, Yount G, Moridani MY. Biochemical mechanism of acetylsalicylic acid (Aspirin) selective toxicity toward melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2008;18(6):386-99.
35. González, PM. La actividad protectora del DNA frente al daño inducido por la radiación ultravioleta, de los extractos acuosos de *Cymbopogon citratus* (DC) Staff, *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) M. How y *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux. [Tesis presentada en opción al Título Maestro en Bioquímica], Mención Toxicología. Ciudad de la Habana, Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba; 2008.