



## Extracto acuoso de *Pinus caribaea* inhibe el daño inducido por radiaciones ultravioletas, en ADN plasmídico

[Aqueous extract of *Pinus caribaea* inhibits the damage induced by ultraviolet radiations, in plasmid DNA]

Marioly Vernhes Tamayo<sup>1</sup>, André Passaglia Schuch<sup>2</sup>, Fabiana Fuentes-León<sup>3</sup>, Carlos F. Martins Menck<sup>2</sup>,  
Ángel Sánchez-Lamar<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Radiobiología, Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). Apartado Postal 6122, Calle 30, #502, e/5<sup>a</sup> y 7<sup>ma</sup>, Miramar, Playa, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Ed. Biomédicas 2, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Apartado Postal 10 400, Calle 25, # 455, e/ 1 y J, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

\*E-mail: [alamar@fbio.uh.cu](mailto:alamar@fbio.uh.cu)

### Abstract

**Context:** The incidence of solar ultraviolet radiation (UV) on Earth has increased due to diminish of the ozone layer. This environmental agent is highly genotoxic causing numerous damage in DNA molecule. Nowadays there is a growing interest in the search of compounds capable to minimize these effects. In particular, phytochemicals have been tested as excellent candidates for their antigenotoxic properties.

**Aims:** To evaluate the protective effect of the aqueous extract of *Pinus caribaea* (EPC) against the damage induced by the UVB and UVC radiation.

**Methods:** The cell-free plasmid DNA assay was employed. The forms of plasmid were separated electrophoretically in agarose gel. For genotoxic and photoprotective evaluation of *P. caribaea*, different concentrations of the extract (0.1 - 2.0 mg/mL) and exposure times were evaluated. The CPD lesions were detected enzymatically. Additionally, the transmittance of the aqueous extract against 254 nm and 312 nm was measured.

**Results:** None of the concentrations were genotoxic in 30 min of treatment, for superior times a clastogenic effect was observed. The EPC despite inhibiting the activity of the enzyme T4 endo V, impedes photolesions formation in DNA at concentrations  $\geq 0.1$  mg/mL.

**Conclusions:** The EPC has photoprotective properties, this effect could be related with its antioxidants and absorptives capacities.

**Keywords:** photolesions; photoprotection; plant extract; UV.

### Resumen

**Contexto:** La incidencia de la radiación ultravioleta (UV) proveniente de la luz solar en la Tierra ha aumentado debido a la disminución de la capa ozono. Este agente ambiental es altamente genotóxico y provoca numerosos daños en la molécula de ADN. Actualmente, existe un creciente interés en la búsqueda de compuestos capaces de minimizar tales efectos. En particular compuestos provenientes de plantas han sido evaluados como excelentes candidatos por sus propiedades anti-genotóxicas.

**Objetivos:** Evaluar el efecto protector del extracto acuoso de *Pinus caribaea* (EPC), ante el daño inducido por las radiaciones UVB y UVC.

**Métodos:** Se empleó el ensayo de ADN plasmídico libre de células. Las formas de las moléculas de plásmido fueron separadas electroforéticamente. El efecto genotóxico y fotoprotector de *P. caribaea* fue evaluado a diferentes concentraciones del extracto (0,1 - 2,0 mg/mL) y tiempos de exposición. Las lesiones CPDs fueron detectadas enzimáticamente. Se midió la transmitancia del extracto a longitudes de onda de 254 nm y 312 nm.

**Resultados:** Ninguna de las concentraciones resultó genotóxica en 30 min de tratamiento, para tiempos superiores se observó un efecto clastogénico. El EPC, a pesar de inhibir la actividad de la enzima T4 endo V, impide la formación de fotolesiones en el ADN a concentraciones  $\geq 0,1$  mg/mL.

**Conclusiones:** El EPC posee propiedades fotoprotectoras. Este efecto puede estar relacionado con sus capacidades absorptivas y antioxidantes.

**Palabras Clave:** extracto vegetal; fotolesiones; fotoprotección; UV.

### ARTICLE INFO

Received | Recibido: February 3, 2017.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: May 22, 2017.

Accepted | Aceptado: May 31, 2017.

Available Online | Publicado en Línea: June 7, 2017.

Declaration of interests | Declaración de Intereses: The authors declare no conflict of interest.

Funding | Financiación: This work was supported by international collaboration CAPES (Brasil) - MES (Cuba) (CAPES/MÊS-Cuba, 027/07), FAPESP (São Paulo, Brazil) y CNPq (Brasília, Brazil).

Academic Editor | Editor Académico: Gabino Garrido.



---

## INTRODUCCIÓN

---

La radiación ultravioleta procedente del sol comprende tres bandas: UVA, UVB y UVC. La UVB representa aproximadamente el 5% del total que incide sobre la superficie terrestre y la UVA el 95% restante. Tanto las radiaciones UVA como UVB juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades relacionadas con el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis. La UVC, no llega a la Tierra, pero es la más energética del espectro ultravioleta y es la de mayor capacidad para inducir daños en los sistemas biológicos (Schuch et al., 2009; Bosch et al., 2015).

Las radiaciones UV puede dañar diversos blancos biológicos como las proteínas, los lípidos y el material genético. El máximo de absorción de las moléculas de ADN es alrededor de los 260 nm en la región de UVC, también absorbe en la región de UVB (290–320 nm) y menormente en la región de UVA (320–400 nm). Las principales lesiones generadas directamente en el ADN son los dímeros de pirimidina cis-syn ciclobutano (CPDs) y el fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP). Estas fotolesiones interfieren en diferentes procesos moleculares como son la transcripción y replicación del ADN. Las lesiones CPDs, están estrechamente relacionados con daños agudos en la piel debido a su abundancia, lenta reparación y mutagenicidad distintiva. Adicionalmente, lesiones de tipo oxidativas también pueden ser originadas en el ADN debido a la acción de especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la radiación ultravioleta (Cadet et al., 2015; Ramasamy et al., 2017).

Debido al continuo deterioro de la capa de ozono, la incidencia de las radiaciones UV en la superficie terrestre se ha incrementado considerablemente. En consecuencia, padecimientos de la piel también han aumentado en la población a nivel mundial. Los protectores solares forman parte de la primera línea de protección de defensa contra la luz UV, sin embargo, presentan sus limitaciones (Skotarczak et al., 2015).

Productos naturales derivados de plantas han ganado especial atención en investigaciones como posibles fuentes de agentes fotoquimiopreventivos. En particular, fitocompuestos con propiedades ab-

sortivas, antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras han sido los más abordados (Bosch et al., 2015; Seebode et al., 2016).

De la flora cubana *Pinus caribaea* Morelet, Pinaceae es una especie cuyo extracto acuoso ha mostrado propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Adicionalmente se ha avalado sus propiedades antigenotóxicas frente a mutágenos físicos como la radiación gamma y ultravioleta en células de *E. coli* (Santana et al., 2001; Santana, 2003; González et al., 2001; Fuentes et al., 2006). Sin embargo, sus potencialidades como posible agente fotoquimiopreventivo a nivel de estructura primaria del ADN no ha sido investigada.

Los ensayos *ex vivo* con ADN plasmídico, han sido empleados en el estudio de los efectos de las radiaciones ultravioletas en el ADN, así como en la evaluación de posibles agentes fotoprotectores (Schuch et al., 2009; Vernhes et al., 2013; González-Pumariega et al., 2016). Evidencias de protección a nivel de estructura primaria del material genético frente a las radiaciones UV constituyen un excelente registro inicial que aporta elementos básicos que justifiquen el empleo de modelos experimentales más complejos.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto protector del extracto acuoso de *P. caribaea* (EPC) ante el daño inducido por las radiaciones UVB y UVC, mediante el ensayo *ex vivo* con ADN plasmídico pBluescript SK II.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Extracto acuoso de *Pinus caribaea* Morelet.

Para la obtención del extracto de *Pinus caribaea* Morelet (EPC) fueron empleadas cortezas de árboles ubicados en la localidad de Viñales, Provincia de Pinar del Río, Cuba (20° 40' N, 83° 45' W) y se siguieron los procedimientos descritos por Santana (2003). Se prepararon soluciones madre a la concentración de 10 mg/mL (w:v) del liofilizado en H<sub>2</sub>O. Estas se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se filtraron en filtro miliporo de 0,2 µm (Corning Incorporated, Germany) y alicuotaron en condiciones estériles, conservándose hasta su utilización a -4°C.

## Irradiación UVB y UVC

Se usaron lámparas de emisiones de ondas de 312 nm (Vilber Loumart T15M15W, Francia) y 254 nm (Philips, TUV 15W/G15T18, Holanda) para la irradiación con UVB y UVC, respectivamente. La tasa de dosis fue monitoreada por radiómetros VLX3W, de sensor monocromático CX-312 y CX-254 (Vilber Lourmat, Torcy, Francia). La dosis de irradiación empleada para el caso de UVB fue 3000 J/m<sup>2</sup> y para UVC fue 100 J/m<sup>2</sup>.

## Modelo experimental y endonucleasa

Se empleó el plásmido pBluescript II SK circular covalentemente cerrado (2961 pb). La obtención y purificación de plásmidos se realizó en el Laboratorio de Reparación de ADN, Departamento de Microbiología, Universidad de Sao Paulo, a partir de células de *E. coli* DH10b transformadas siguiendo la metodología a la descrita por Schuch et al. (2009). Este plásmido contiene: origen de replicación bacteriano, gen de resistencia a ampicilina y sitios de corte para más de 30 enzimas de restricción.

Para todos los procedimientos las muestras de ADN plasmídico fueron disueltas en solución TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) a una concentración inicial de 100 ng/μL. El control negativo (C-) fue 1 μL de ADN, en 1 μL de solución TE y 18 μL de solución NET (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris HCl, pH 8) e incubado en hielo durante 30 minutos. El control positivo (C+) fue 1 μL de ADN irradiado en 18 μL de solución NET, 1 μL de T4 endo V, incubado a 37°C durante 30 minutos. Fueron realizados tres réplicas como mínimo por cada ensayo independiente.

La enzima T4 endonucleasa V (T4 endo V, Trevigen, Gaithersburg, USA) fue empleada en los ensayos de protección. Esta enzima reconoce y corta los sitios CPDs originados por la radiación UV en el ADN.

## Evaluación de la clastogenicidad del EPC sobre el ADN plasmídico

Con el fin de evaluar la capacidad del extracto de producir roturas de simple (SSB, de las siglas en inglés) o doble (DSB, de las siglas en inglés) cadenas en el ADN, a 1 μL de ADN se le adicionó 1 μL de extracto y 18 μL de solución NET. Las muestras se in-

cubaron a 37°C durante 30 minutos. Se evaluaron las concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL.

Para evaluar la incidencia del tiempo de exposición en el efecto genotóxico, fueron tomadas las mayores concentraciones que no indujeron roturas en 30 min (1,0 y 2,0 mg/mL de EPC). Cada una de las muestras se incubó a 37°C durante 30, 60 y 90 minutos. El criterio de genotoxicidad utilizado fue la aparición de las formas relajada (FR) y lineal (FL) del plásmido, después de la electroforesis.

## Evaluación de la capacidad protectora del EPC frente a la irradiación UVB y UVC

Al mismo tiempo de la evaluación de la capacidad fotoprotectora de EPC, se evaluó la posible inhibición de la enzima T4 endo V por la interacción con fitocompuestos de *P. caribaea*. Para ello, a 1 μL de la dilución de trabajo de los extractos se le adicionó 1 μL de T4 endo V y 17 μL de solución NET, se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente se le añadió 1 μL de ADN irradiado a las dosis de UVB y UVC. Las concentraciones de EPC evaluadas fueron de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL. El criterio de inhibición de la actividad enzimática fue la permanencia de la forma circular superenrollada (FS) del plásmido en el gel luego de la electroforesis.

Para evaluar la capacidad protectora del extracto se siguió un esquema de co-tratamiento. Alícuotas de ADN (1 μL) fueron tratadas con las concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL de EPC e inmediatamente las muestras fueron irradiadas. Se les adicionaron 17 μL de solución NET y 1 μL de T4 endo V; y esta mezcla se incubó a 37°C, durante 30 min. El criterio de protección utilizado fue la aparición de la forma circular superenrollada (FS) conjuntamente con la disminución o desaparición de la forma relajada (FR) del plásmido luego de la electroforesis.

## Condiciones electroforéticas

Para la separación de las bandas superenrolladas, relajadas y lineales de los plásmidos, a cada tratamiento se le adicionó 3 μL de solución carga (75 mM EDTA, 50% glicerol, 0,2% bromofenol azul). Las mezclas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% disuelto en TBE 0,5X (44,6 mM Tris base, 44,5 mM ácido bórico, 50 mM EDTA, pH 8) que contenía bromuro de etidio (0,1 ng/μL). La co-

rrida electroforética se desarrolló en solución TBE 0,5X a 80 V y 60 mA durante 60 min.

### Cuantificación de las bandas FS obtenidas en los ensayos de inhibición y protección de EPC

La intensidad de las bandas FS de los resultados de inhibición y protección de EPC fueron cuantificadas según el programa para análisis de imágenes, Image J (ImageJ Basics, versión 1.44, National Institutes of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### Cuantificación de las radiaciones UVB y UVC transmitidas a través del EPC

Se midió la transmitancia a las concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL de EPC a 312 nm (UVB) y 254 nm (UVC), en un espectrofotómetro Génesis TM Serie 10 (Thermo Electron, USA). El control negativo fue H<sub>2</sub>O mili Q estéril.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir del análisis de imágenes fueron tratados estadísticamente a través del programa computacional GraphPad Prism (GraphPad v4 Software, Inc, USA). Los datos son expresados como medias de intensidad de las bandas FS y sus desviaciones estándar. Se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza mediante las pruebas Kolmogorov Smirnov y de Levene, respectivamente. Para la comparación entre pares de datos de inhibición y protección se empleó una prueba de Bonferroni.

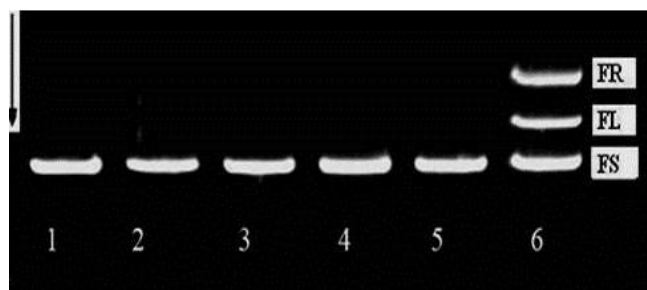
## RESULTADOS

### Clastogenicidad del extracto acuoso de *P. caribaea* sobre el ADN plasmídico

El EPC no fue genotóxico en ninguna de las concentraciones evaluadas durante 30 min de exposición. No hubo aparición de la forma relajada, ni lineal del plásmido en los resultados obtenidos (Fig. 1).

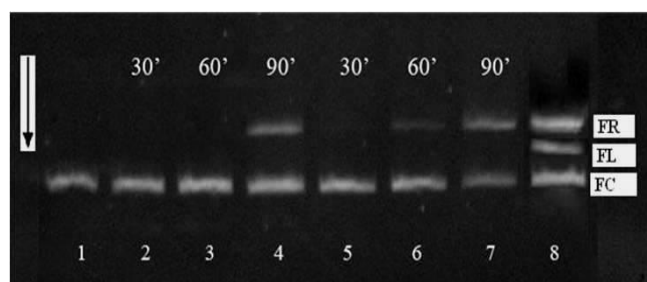
El efecto del incremento en el tiempo de exposición al EPC se muestra en la Fig. 2. Cuando se aplicó 1,0 mg/mL, la aparición de plásmidos con FR se produjo a los 90 min de exposición, mientras que, la concentración de 2,0 mg/mL generó FR tanto a 60 como a 90 min de exposición.

<http://jppres.com/jppres>



**Figura 1.** Efecto de concentraciones de EPC sobre pBluescript SK II durante 30 minutos.

Columna 1: control (-); Columnas 2-5: Tratamientos con 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL, respectivamente; Columna 6: conformaciones relajada (FR), lineal (FL) y superenrollada (FS). ↓: Dirección de la migración electroforética.



**Figura 2.** Efecto de EPC sobre plásmidos pBluescript SK II en diferentes tiempos de tratamientos.

Columna 1: control (-); Columnas 2-4: 1 mg/mL; Columnas 5-7: 2 mg/mL; Columna 8: conformaciones relajada (FR), lineal (FL) y superenrollada (FS). ↓: Dirección de la migración electroforética.

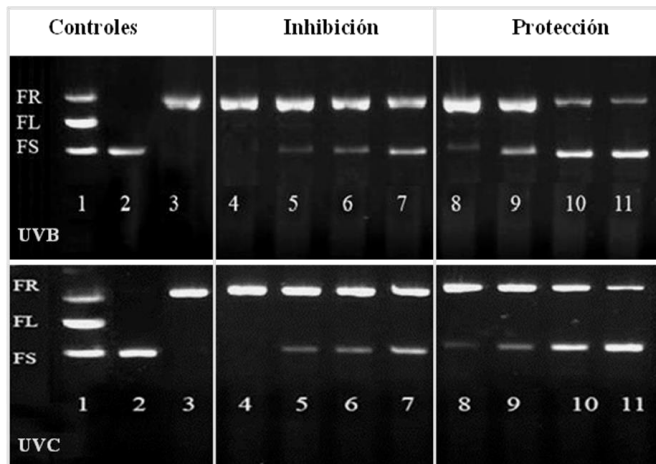
### Capacidad protectora del EPC frente a la irradiación UVB y UVC

Un impedimento para la evaluación de la capacidad protectora del EPC sería una disminución de la actividad de la T<sub>4</sub> endo V debido a la interacción de sus fitocompuestos con la enzima. Por ello fue necesario evaluar la capacidad de inactivar a la T<sub>4</sub> endo V conjuntamente con la evaluación de la actividad protectora del EPC.

En la prueba de inhibición de T<sub>4</sub> endo V por EPC, hubo permanencia de bandas FS cuando la enzima fue tratada con las concentraciones 0,5-2,0 mg/mL del extracto. Ello es indicativo del no corte de cadenas del ADN en los sitios con lesiones CPDs, lo cual significa que el extracto ejerció un efecto inhibitorio sobre su actividad endonucleotídica (Fig. 3, carriles 4-7).

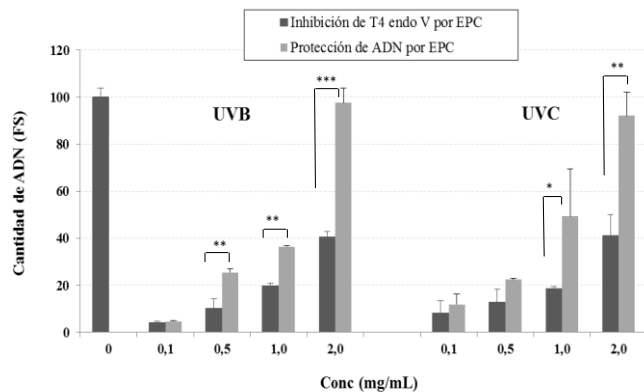
En los experimentos de protección, también hubo permanencia de bandas FS en todos los tratamientos aplicados (Fig. 3, carriles 8-11). Llama la atención el hecho de que a la concentración 0,1

mg/mL, se observó una tenue banda FS, aun cuando no se observó en el experimento de inhibición.



**Figura 3.** Efecto de EPC en plásmidos pBluescript SK II irradiados, con incubación previa de la T4 endo V con EPC (Inhibición) y no (Protección)

Columna 1: conformaciones relajada (FR), lineal (FL) y superenrollada (FS); Columna 2: control (-); Columna 3: control (+); Columna 4-7: ADN irradiado digerido con T4 endo-V preincubada con 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL de EPC respectivamente; Columna 8-11: ADN irradiado en presencia de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL de EPC, respectivamente y digerido con T4 endo V.



**Figura 4.** Cuantificación de ADN superenrollado (FS) obtenida en experimento de inhibición de T4-endo V y protección de ADN por EPC, ante UVB y UVC (cantidad de ADN en relación a control).

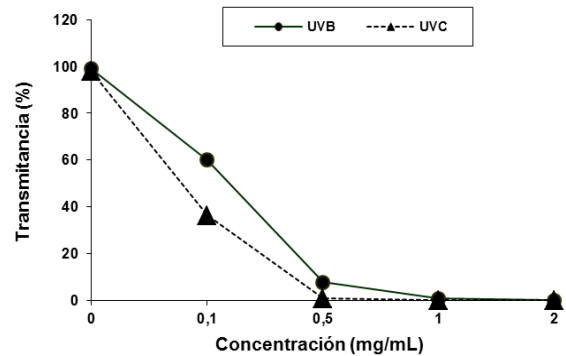
\*, \*\*, \*\*\* significativo para un valor de  $p < 0,05$ ; 0,01; 0,0001 respectivamente; en la prueba de Bonferroni.

Adicionalmente, al comparar las bandas FS presentes en los tratamientos con concentraciones 0,5-2,0 mg/mL de los experimentos de inhibición y de protección, se aprecian intensidades diferentes (Fig. 3, carriles 4, 5, 6, 7 vs. 8, 9, 10, 11). Lo anteriormente

descrito fue ratificado al cuantificar las bandas FS con un programa de análisis de imágenes. La cantidad de ADN FS para los experimentos de protección fue superior a los obtenidos en los de inhibición en ambas radiaciones UV. Esta diferencia refleja el efecto de protección neta producido EPC y fue significativo para concentraciones mayores que 0,1 y 0,5 mg/mL ante la radiación UVB y UVC respectivamente (Fig. 4).

**Cuantificación de la transmitancia del EPC frente a las radiaciones UV**

Al analizar los valores de transmitancia del extracto frente a UVB y UVC, los resultados mostraron que EPC a concentraciones  $\geq 0,5$  mg/mL bloquea totalmente el paso de la radiación UVB y UVC (Fig. 5). Para 0,1 mg/mL, este efecto de absorción fue menor, permitiendo solamente el paso del 60% de UVB y 40% de UVC aproximadamente.



**Figura 5.** Transmitancia del EPC frente a la radiación UVB (312 nm) y UVC (254 nm).

**DISCUSIÓN**

La radiación ultravioleta (UV) es uno de los mutágenos físicos ambientales más dañinos existentes en la actualidad. De estas, las radiaciones de tipo UVB, pueden ocasionar daños directos e indirectos en el ADN. La UVC, a pesar de que no llega a la superficie terrestre, es altamente energética y es la más nociva en el espectro de las radiaciones UV, provocando mayoritariamente daños directos en la molécula de ADN. La existencia de estas lesiones en el material genético, afecta procesos claves a nivel celular que contribuyen a la aparición de enferme-

dades agudas de la piel, como quemaduras solares, fotoenvejecimiento y cáncer de piel (Bosch et al., 2015).

En la actualidad se presta especial atención a fitocompuestos que inhiben o impiden la formación de los daños inducidos por las radiaciones UV. Aquellos capaces de absorber estas radiaciones o con propiedades antioxidantes han sido propuestos como excelentes agentes fotoquimiopreventivos (Ebrahimzadeh et al., 2014; Fernández-García, 2014). En tal empeño, el ensayo con ADN plasmídico libre de células ha sido empleado para el estudio de la genotoxicidad y antigenotoxicidad de extractos de plantas frente a este agente (Vernhes et al., 2013; González-Pumariaga et al., 2016). En el presente trabajo, empleando este ensayo biológico, se aborda por primera vez las potencialidades fotoprotectoras del extracto acuoso de *P. caribaea*.

Previo a los estudios de protección de EPC, se evaluó la capacidad clastogénica del extracto en el plásmido pBluescript SK II. Los resultados demostraron la no genotoxicidad del extracto durante 30 min de exposición, lo cual coincide con estudios previos de toxicidad a nivel de estructura primaria de ADN (Fuentes et al., 2006). Al aumentar el tiempo de exposición, se evidenció la capacidad de EPC de inducir roturas de cadenas en el ADN. Coincidentemente Lagarto (2002) y Estévez (2003) evaluando este mismo extracto, en modelos experimentales celulares, obtuvieron similar efecto en relación al tiempo y la concentración a aquí mostrada. Sin embargo, en células *E. coli* no se observó una incidencia del tiempo de exposición en la capacidad genotóxica de *P. caribaea* (Fuentes et al., 2006).

El empleo de la enzima T4 endonucleasa V en el ensayo *ex vivo* con el modelo plasmídico permite la detección de fotoproductos (CPDs) producidos por la radiación UV al ADN (Schuch et al., 2009). Ello da la posibilidad de evaluar la capacidad del extracto de inhibir la formación de estas lesiones frente al daño inducido por la radiación UV. Sin embargo, una inhibición de la enzima por la interacción con fitocompuestos de EPC, podría evitar la aparición de las formas relajadas o lineales, aun cuando en el plásmido se hayan formado CPDs. Lo que conllevaría a resultados de protección que serían falsos. El extracto de *P. caribaea* mostró un efecto inhibitorio de la actividad endonucleolítica de la T4 endo V dependiente de la concentración. En nuestro grupo,

similar comportamiento fue observado para este mismo extracto empleando las enzimas de restricción *Bam* HI, *Eco* RI y *Pvu* II (González-González, 2009). La inhibición enzimática por extractos obtenidos de especies vegetales como: *Cupressus sepervirens*, *Alchemilla vulgaris* y *Ribes nigrum*, que poseen alta cantidad de taninos como catequinas oligoméricas y compuestos flavónicos, también ha sido demostrada (González et al., 2001).

El EPC es una mezcla de polifenoles rica en taninos. Los taninos de la especie *Pinus caribaea* Morelet, son del tipo condensados, proantocianidinas de origen floroglucínicos, que se caracterizan por una unión a proteínas (Santana, 2003). Estos compuestos poseen gran cantidad de grupos hidroxilo fenólicos que les hace muy reactivos y facilita la formación de puentes de hidrógeno, por el que pueden asociarse con otras moléculas, demostrando mayor afinidad por las proteínas (Asquith y Buler, 1986). La presencia de estos compuestos en el extracto de EPC pudiera justificar la disminución de la actividad enzimática obtenida en este trabajo.

La fotoprotección de EPC, interpretada como la protección neta referida en estos resultados, fue evidente para todas las concentraciones evaluadas. Este efecto protector del extracto fue mayor para la radiación de tipo UVB que UVC.

Las lesiones provocadas en el ADN por las radiaciones UVB pueden ser de origen directo, lesiones de tipo CPDs y 6-4PPs, o indirecto debido a la formación de especies reactivas de oxígeno. En correspondencia con esto, las roturas de cadena en el ADN plasmídico se generan a partir de dos eventos, la acción de la digestión con la enzima T4 endo-V y por la acción oxidante de los EROs para la UVB. Mientras que para la radiación UVC las roturas son solo producto de la digestión enzimática (Ramasamy et al., 2017).

El efecto protector de EPC frente a la radiación UVB y UVC está estrechamente relacionado con la capacidad de inhibir la formación de lesiones de origen oxidativo o de lesiones CPDs. En la cuantificación de la transmitancia de EPC a partir de 0,5 mg/mL, existió una absorción total de la radiación ultravioleta a 254 nm y 312 nm. En 0,1 mg/mL esta propiedad del extracto fue menor, aun así, se evidenció protección al ADN frente a ambos tipos de radiaciones. Como se describió con anterioridad el

extracto de *P. caribaea* es una mezcla de compuestos rica en taninos. Los taninos condensados o proantocianidinas que incluyen polímeros de catequinas y epicatequinas (Hipolito, 2007) son compuestos para los que se han descrito propiedades de absorción de la radiación ultravioleta (Vergara et al., 2009). La presencia de compuestos con estas propiedades físicas en EPC puede estar relacionada con el efecto de impedir formación de las lesiones de tipo CPDs inducido por las radiaciones UVB y UVC mostrados en este trabajo.

El carácter antioxidante de la mezcla incrementa el efecto protector obtenido ante las radiaciones UVB. Propiedades desmutagénicas de EPC, mediante el secuestro de EROs frente a radiaciones gamma en células de *E. coli* ha sido propuesto por Fuentes et al. (2006). Para fitocompuestos como las proantocianidinas se ha demostrado un efecto antioxidante ante la peroxidación lipídica inducida por radiación ultravioleta (Katiyar, 2008). Estos compuestos obtenidos de *Vitis vinifera*, en líneas celulares humanas, también han evidenciado un efecto protector ante el daño oxidativo inducido por la UVB (Matito et al., 2011; Perde-Schepler et al., 2013). Catequinas del té verde, también poseen aval como antioxidantes, el tratamiento con estos compuestos en ratones disminuye el estrés oxidativo generado por las radiaciones UV mediante el secuestro de EROs (Katiyar et al., 2001, Huang et al., 2005). La presencia de proantocianidinas en el extracto de EPC, donde se incluyen las catequinas, pudiera estar comprometida en la protección demostrada para EPC frente a la fotooxidación inducida por UVB.

## CONCLUSIONES

La presente investigación muestra la capacidad del extracto acuoso de *Pinus caribaea* de proteger al ADN frente al daño inducido por las radiaciones UVB y UVC. Mediante las propiedades físicas y antioxidantes del extracto, se impide la formación de daños en el material genético. Se amplía así el potencial fotoquimiopreventivo de la especie *P. caribaea* y se sugiere explotar y profundizar en el estudio de esta especie como candidato adecuado en la prevención de enfermedades de la piel.

## CONFLICTO DE INTERÉS

The authors declare no conflict of interest.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto de colaboración internacional CAPES (Brasil)- MES (Cuba) (CAPES/MÊS-Cuba, 027/07), FAPESP (São Paulo, Brazil) y CNPq (Brasília, Brazil). Los autores agradecen al Dr Jorge L Santana Romero del Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas (Instec), Cuba por aportar el material vegetal utilizado en la presente investigación.

## REFERENCIAS

- Asquith T, Butler L (1986) Interaction of condensed tannin with selected proteins. *Phytochemistry* 25: 1591-1593.
- Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez JA, Juarranz A, Devmurari A, Chalensouk-Khaosaat J, González S (2015) Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants* 4: 248-268.
- Cadet J, Grand A, Douki T (2015) Solar UV radiation-induced DNA bipyrimidine photoproducts: formation and mechanistic insights. *Top Curr Chem* 356: 249-276.
- Ebrahimzadeh E, Enayatifard R, Khalili M, Ghaffarloo M, Saeedi M, Yazdani J (2014) Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Iran J Pharm Res* 13(3): 1041-1047.
- Estévez A (2003) Informe técnico sobre la mutagenicidad de taninos de *Pinus caribaea* Morelet. Unidad de Control Biológico, CIDEM, La Habana, Cuba.
- Fernández-García E (2014) Skin protection against UV light by dietary antioxidants. *Food Funct* 5(9): 1994-2003.
- Fuentes JL, Vernhe M, Cuetara E, Sánchez-Lamar A, Santana JL, Llagostera M (2006) Tannins from barks of *Pinus caribaea* protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by  $\gamma$ -rays. *Fitoterapia* 77: 116-120.
- González-González R (2009) Evaluación de la capacidad genotóxica del extracto acuoso de *Pinus caribaea*, Morelet mediante ensayos *ex vivo* con DNA plasmídico. Trabajo de Diploma. Tesis de Grado. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba. 40.
- González Y, Peña M, Sánchez R, Santana J (2001) Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. *Rev Cuba Investig Biomed* 20(1): 16-20.
- González-Pumariiega M, Vernhes M, Fuentes-León F, Schuch A Menck CFM, Sánchez-Lamar A (2016) *Cymbopogon citratus* aqueous extract protects plasmid DNA from UVC-induced damage. *Ars Pharm* 57(4): 1-7.
- Hipolito JM (2007) Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica XIII* (33): 13-18.
- Huang C, Fang J, Wu H, Chiang Y, Wei J, Hunf CF (2005) Protective effects of (-)-epicatechin-3-gallate on UVA

- induced damage in HaCaT keratinocytes. Arch Dermatol Res 296: 473-481.
- Katiyar K, Afaq F, Perez A, Mukhtar H (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. Carcinogenesis 22: 287-294.
- Katiyar S (2008) Grape seed proanthocyanidins and skin cancer prevention: inhibition of oxidative stress and protection of immune system. Mol Nutr Food Res 52: 71-76.
- Lagarto A (2002) Informe técnico sobre la toxicidad aguda de taninos de *Pinus caribaea* Morelet. Unidad de Control Biológico, CIDEM, La Habana, Cuba.
- Matito C, Agell N, Sanchez-Tena S, Torres J, Cascante M (2011) Protective effect of structurally diverse grape procyanidin fractions against UV-Induced cell damage and death. J Agric Food Chem 59: 4489-4495.
- Perde-Schrepler M, Chereches G, Brie I, Tatomir C, Postescu I, Soran L, Filip A (2013) Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. J Photochem Photobiol B: Biology 18: 16-21.
- Ramasamy K, Shanmugam M, Balupillai A, Govindhasamy K, Gunaseelan S, Muthusamy G, Robert M, Prasad R (2017) Ultraviolet radiation-induced carcinogenesis: mechanisms and experimental models. J Radiat Cancer Res 8: 4-19.
- Santana J, Pena M, Martínez F, Gomez A, Codormiú E, García O, Gastón G, Vargas LM, García G, Vargas LM, García M, García JC (2001) Evaluación de la actividad microbiana, fotoprotectora, antielastasa y antioxidante de polifenoles de origen natural, empleados en formulaciones cosméticas. En memoria del XV Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos. Asociación Argentina de Químicos Cosméticos. Buenos Aires - Argentina 332-343.
- Santana J (2003) Estudio de las propiedades químicas de los taninos condensados, extraídos de la corteza residual de especies forestales. Tesis en opción a Doctor en Ciencias. ISCTN, Dpto de Radioquímica. Universidad de La Habana. Cuba. 100 p.
- Schuch AP, Galhardo R, Lima-Bessa, K, Schuch NJ, Menck CFM (2009) Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. Photochem Photobiol Sci 8: 111-120.
- Seebode C, Lehmann J, Emmert S (2016) Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies. Anticancer Res 36: 1371-1378.
- Skotarczak K, Mankowska A, lodyga M, Polanska A, Mazur M, Adamski Z (2015) Photoprotection: facts and controversies. Eur Rev Med Pharmacol Sci 19: 98-112.
- Vergara C, Von Baer D, Hermosín I, Ruiz A, Hirschfeld MA, Castillo N (2009) Anthocyanins that confer characteristic color to red copihue flowers (*Lapageria rosea*). J Chil Chem Soc 54: 194-197.
- Vernhes M, González-Pumariega M, Passaglia Schuch A, Martins CF, Sánchez-Lamar A (2013) El extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* K protege al ADN plasmídico del daño inducido por las radiaciones ultravioletas. Ars Pharm 54: 16-23.

**Author contribution:**

Contribution	Vernhes Tamayo M	Passaglia Schuch A	Fuentes-León F	Martins-Menck CF	Sánchez-Lamar A
Concepts or ideas	X			X	X
Design	X				
Definition of intellectual content				X	X
Literature search	X				
Experimental studies	X	X			
Data acquisition	X	X			
Data analysis	X	X		X	X
Statistical analysis	X		X		
Manuscript preparation	X		X		X
Manuscript editing	X		X		X
Manuscript review	X	X	X	X	X

**Citation Format:** Vernhes Tamayo M, Passaglia Schuch A, Fuentes-León F, Martins-Menck CF Sánchez-Lamar A (2017) Extracto acuoso de *Pinus caribaea* inhibe el daño inducido por radiaciones ultravioletas, en ADN plasmídico. [Aqueous extract of *Pinus caribaea* inhibits the damage induced by ultraviolet radiations, in plasmid DNA]. J Pharm Pharmacogn Res 5(4): 262-269.