



Té verde, Fitomedicamento contra la Influenza A: Rol de las Catequinas

[Green tea, phytomedicine against Influenza A: Role of Catechins]

Sandro BUSTAMANTE & Miguel MORALES

*Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Universidad de Chile.
Santiago, Chile.*

Sociedad Chilena de Fitoterapia – SOCHIFITO

Contactos | Contacts: Sandro BUSTAMANTE - E-mail address: sbustama@med.uchile.cl

Abstract

The highly variable Influenza A is constantly changed in new forms, like avian influenza or actual pandemic swine flu, has forced to massive use of antiviral drugs. Neuraminidase inhibitors are those with acceptable risk – efficacy profile. However, high variability of neuraminidase among different Influenza A viruses has resulted in viral resistance. Searching for new therapeutic resources, green tea (*Camelia sinensis*) has been reported to inhibit Influenza A virus replication, due to its catechins that bind to the active pocket endonuclease domain of viral RNA-dependent RNA polymerase. This enzyme is highly conserved among influenza A virus variants. So, a *Camelia sinensis* catechine standardized extract could become an anti endonuclease herbal drug.

Keywords: Phytodrugs, *Camelia sinensis*, Green tea, Influenza A, viral endonuclease.

Resumen

La constante aparición de nuevas variantes de la Influenza A, como la denominada influenza aviar y la más reciente gripe porcina, de características pandémicas, ha obligado al uso masivo de fármacos antivirales. Los únicos con un perfil riesgo – eficacia aceptable son los inhibidores de la neuraminidasa. Sin embargo, la poca conservación entre la neuraminidasa de las diferentes cepas de virus Influenza A, han evidenciado resistencia viral. En la búsqueda de nuevos recursos terapéuticos, se ha reportado que el té verde (*Camelia sinensis*), gracias a su contenido de catequinas, puede inhibir la replicación de virus Influenza A, al unirse específicamente al bolsillo activo del dominio endonucleasa de la polimerasa de ARN dependiente de ARN viral, una enzima que posee un alto grado de conservación entre las diferentes variantes del virus de la Influenza A. Un extracto de *Camelia sinensis* estandarizado en catequinas podría constituirse en un fitofármaco antiendonucleasa.

Palabras Claves: Fitofármacos, *Camelia sinensis*, té verde, catequinas, Influenza A, endonucleasa viral

Recibido | Received: 5 de Enero de 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 6 de Febrero de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Marzo de 2012.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Sandro Bustamante, Miguel Morales. 2012. Té verde, Fitomedicamento contra la Influenza A: Rol de las Catequinas. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 11(2): 106 – 110.

INTRODUCCIÓN

La influenza A es una enfermedad viral que ya asoló a la humanidad a comienzos del siglo XX dejando una secuela de 10 millones de muertes en todo el mundo. El año 2009, una variante de la influenza A, la H1N1, se propagó de modo pandémico. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su informe de actualización N°72 (25 de octubre), indica que a nivel mundial se han confirmado 440.000 casos, de los cuales 5.700 resultaron fatales (WHO, 2009a).

En Chile, el primer caso confirmado ocurrió el 17 de mayo de 2009 en la semana epidemiológica 20, observándose un importante incremento de la circulación viral a expensas de la nueva influenza A H1N1 pandémica, llegando en la semana 27 a representar el 64% de las enfermedades virales; a partir de esta fecha, el número de casos comenzó a disminuir. De acuerdo a los datos de seguimiento epidemiológicos del Ministerio de Salud de Chile (2009), hasta la semana 49 se han registrado un total de 12.287 casos PCR positivo confirmados, de los cuales 150 resultaron en muerte (147 como causa básica y tres como causa secundaria). En México, país donde se inició la pandemia, se confirmaron un total de 72.504 casos PCR positivo, con 1.244 defunciones (Cordoba *et al.*, 2009).

Ante la declaración de pandemia para la influenza A H1N1 hecha por la OMS en junio de 2009 (WHO, 2009b), la *European Medicines Agency* autorizó de modo extremadamente expedito la utilización de tres vacunas (Johansen *et al.*, 2009). Como se requería una gran cantidad de vacunas para su distribución mundial, la OMS sugirió se agregaran coadyuvantes, determinación basada en la experiencia del desarrollo de la vacuna contra la influenza A H5N1, dado que los coadyuvantes reducen la cantidad necesaria de antígeno requerida para proveer una inmunización adecuada y prolonga el tiempo de inmunización (WHO, 2005; Diez-Domingo *et al.*, 2010). Dos de las tres vacunas usaron escualeno como coadyuvante del cual se tenía cierta evidencia que induciría aumento en reacciones adversas neurológicas (Schwarz *et al.*, 2009). De hecho, un estudio de farmacovigilancia de 8 a 10 meses mostró un aumento en el riesgo relativo de patología neurológicas como parálisis de Bell, parestesia y trastornos de la vejiga (Bardage *et al.*, 2011). Otro estudio de farmacovigilancia realizado en Francia con seguimiento de ocho meses post vacunación, reportan parestesia y convulsiones febriles como reacciones adversas (Durrieu *et al.*, 2011). En tanto, el aumento de casos de narcolepsia como reacción adversa a la

vacuna contra la influenza H1N1, aún es controversial (Dauvilliers *et al.*, 2010; Marcus, 2011).

De aquí que la aproximación farmacológica para el tratamiento es relevante. Para el caso de la influenza pandémica se indicó la administración de antivirales inhibidores de la neuraminidasa, la enzima que permite la liberación del virus desde la célula infectada favoreciendo su diseminación. Tanto oseltamivir como zanamivir pertenecen a este grupo de fármacos y, recientes ensayos clínicos (Shun-Shin *et al.*, 2009) han demostrado cierta eficacia contra los virus de Influenza A y B, reduciendo la transmisión intradomiciliaria si éstos son administrados dentro de las primeras 36 horas (zanamivir) a 48 horas (oseltamivir). Se presume que los inhibidores de neuraminidasa son efectivos en la influenza A variedad H1N1.

El uso masivo de inhibidores de neuraminidasa a raíz de la pandemia ha hecho evidente la aparición efectos adversos importantes, pero de mayor preocupación, es el hecho que se ha reportado resistencia al fármaco. Por tanto, se requiere buscar nuevos agentes antivirales.

Farmacoterapia Actual

La neuraminidasa es una glicoproteína inserta en la cápside del virus; esta enzima resulta fundamental para que los viriones puedan liberarse de la membrana plasmática de la célula infectada, pues rompe los enlaces entre ácido siálico y hemaglutinina, permitiendo la infestación de nuevas células (Shun-Shin *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los fármacos inhibidores de la neuraminidasa, como oseltamivir y zanamivir, son eficaces en la prevención y tratamiento de infecciones por virus de Influenza A, incluyendo las recientes “gripe aviar” (influenza A H5N1) e “influenza porcina” (influenza A H1N1).

Son antivirales muy bien tolerados, aunque con la masificación de su uso, se les ha asociado a algunas reacciones adversas neurológicas. En Japón, país responsable del 70% a 80% de la prescripción mundial de oseltamivir para la prevención de la Influenza A Estacional, se han reportado 70 casos fatales y un centenar de alteraciones de la conducta, principalmente en niños y adolescentes (Izumi *et al.*, 2007). No se conoce bien la causa, pero se sospecha que uno de los metabolitos de oseltamivir, el carboxilato de oseltamivir, sería responsable de las alteraciones al sistema nervioso central.

Luego del masivo uso de inhibidores de neuraminidasa, primero con la Influenza A H5N1 y

recientemente con la variedad H1N1, se observó con preocupación la aparición de resistencia a los antivirales. Oseltamivir, zanamivir y peramivir, todos análogos estructurales del ácido siálico, se unen en diferentes regiones del sitio catalítico de la neuraminidasa y la bloquean. Esta diferencia en sus dominios de unión se ha sugerido que podría ser responsable de la resistencia viral diferencial observada. Para el caso de oseltamivir, se ha reportado 2% de resistencia en adultos y 18% en pacientes pediátricos (Reece, 2007).

La falta de conservación en la secuencia de aminoácidos de la neuraminidasa en las diferentes cepas de virus de Influenza A, contribuye a la diferente eficacia que muestran estos antivirales en las distintas variantes (estacional, H5N1, H1N1, etc.). Por ello se hace urgente la búsqueda de nuevos antivirales que sean eficaces ante los virus de Influenza A, con un mecanismo de acción distinto al de los inhibidores de la neuraminidasa.

El genoma de los virus de Influenza A es una hebra de ARN negativo que requiere una enzima polimerasa de ARN dependiente de ARN. A diferencia de la enzima neuraminidasa, esta última si está muy conservada en los virus de Influenza A, por lo cual constituyen un blanco farmacológico de elección.

Esta polimerasa es un complejo heterotrimérico (PA, PB1, PB2) cuyas tres subunidades en conjunto sintetizan el ARN mensajero del virus de Influenza A con la ayuda del ARN premensajero de la célula huésped. La subunidad PA posee actividad endonucleasa, localizada en el extremo amino terminal de la subunidad. Trabajos recientes (Yuan *et al.*, 2009), han demostrado que la subunidad PA posee tanto actividad endonucleasa como peptidasa para ARN y ADN.

Té Verde

El arbusto perenne *Camelia sinensis*, originario del sudeste asiático, se cultiva desde larga data en muchas regiones del mundo por sus hojas, con las cuales se elaboran las más de 300 variedades de té. Las características y diferente composición química de las hojas al momento de la recolección, son factores importantes para producir diferentes tipos de té, como el té verde, blanco, rojo, negro, amarillo y el semifermentado oolong (Wulong) o té azul. Cada uno de ellos se logra mediante un proceso que determina diferentes grados de oxidación de sus componentes, lo que determina el color, olor, las características nutricionales y el efecto medicinal del té (Cabrera *et al.*, 2006). Al sabor contribuyen:

1. Los alcaloides (3% al 5 % del peso seco), son determinantes en el sabor del té. Principalmente corresponden a cafeína y en menor proporción a teofilina y teobromina. Estos alcaloides son del tipo metilxantinas cuyas propiedades se utilizan en farmacología como broncodilatadores y tienen la capacidad de ser excitantes del sistema nervioso central.
2. Los aminoácidos, pese a su mínima proporción (1% a 5% del peso seco), contribuyen al gusto y sabor fresco del té verde.
3. Los fenoles (20% al 25% del peso seco), principalmente catequina, modulan el sabor del té y se les atribuyen efectos terapéuticos.

Las catequinas son un tipo de flavonoide (nombre genérico que identifica a varios metabolitos secundarios de las plantas), muy abundantes en *C. sinensis*; se les ha atribuido gran parte de las acciones biológicas y farmacológicas descritas para el té verde: se ha demostrado que poseen actividad *in vitro* antioxidante, anticancerígenas (Sartippour *et al.*, 2002; Khan y Mukhtar, 2007) y capacidad de unirse al ADN. Las catequinas más abundantes en *C. sinensis* son (-)-epigallocatequin galato (EGCG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequin galato (ECG), (-)-epicatequina (EC), (-)-galocatequin galato (GCG) y (+)-catequina.

Té Verde e Influenza A

Muchos trabajos científicos promueven el uso de té de modo terapéutico en la prevención de enfermedades (para una actualización, se sugiere ver la revisión de Singh *et al.*, (2011)). Hay amplio consenso que la administración de extractos de *C. sinensis* no debieran producir reacciones adversas, ya que se trata de una infusión que se ha bebido por más de 1.000 años, demostrando su seguridad para el consumo humano. Previamente se había sugerido que altas dosis de EGCG pueden inhibir la replicación del virus de la influenza A, por un mecanismo que alteraría las propiedades físicas de la membrana del virus, lo que determinaría como resultado que se inhibiese la síntesis de ARN viral.

Sin embargo, una reciente comunicación rápida de Kuzahara *et al.*, (2009), sugiere un mecanismo novedoso y diferente, en el cual las catequinas presentes naturalmente en el té verde podrían inhibir la replicación de los virus de Influenza A, particularmente el de tipo H1N1 mediante la inhibición de la actividad de la endonucleasa en la polimerasa de ARN viral.

En efecto, estos autores ensayaron dosis crecientes de EGCG en un sistema de incubación *in vitro* que contenía el recombinante con los primeros 220 residuos aminoacídicos del extremo amino terminal del dominio de unión de la subunidad PA de la polimerasa de ARN dependiente de ARN del virus de Influenza A.

Sus resultados fueron muy alentadores, ya que concentraciones tan bajas como 10 μ M (en el rango farmacológico) de EGCG, inhibieron la actividad endonucleasa. Los estudios de estructura – actividad de Kuzahara *et al.*, (2009), con catequinas estructuralmente similares a EGCG sobre la capacidad de inhibición de la actividad endonucleasa de la polimerasa de ARN, revelaron que ECG también tiene capacidad de inhibir la acción de la enzima. Sin embargo, catequinas que carecen del grupo galoil (EGC y EC) o el grupo galoil por sí solo (ácido gálico) poseían una muy pobre o ninguna actividad inhibitoria.

De aquí se desprenden dos conclusiones:

1. Si la catequina posee un grupo funcional galoil en su estructura química, ésta puede inhibir completamente la actividad endonucleasa de la polimerasa de ARN del virus Influenza A.
2. La presencia de grupos hidroxilos en la catequina determina la magnitud de la capacidad inhibitoria.

De modo entonces que la acción inhibitoria de EGCG se produciría al unirse su residuo galoil al bolsillo activo en un dominio de la endonucleasa de la polimerasa de ARN del virus de influenza A.

Para determinar el sitio de unión, Kuzahara *et al.*, (2009), realizaron un análisis de simulación computacional de la interacción entre el grupo galoil de EGCG y el bolsillo activo del dominio de endonucleasa, usando algoritmos computacionales de modelación molecular. Sus resultados muestran un correcto ajuste entre las estructuras terciarias de las dos moléculas, evidenciando en un modelo 3D la importancia del grupo galoil en la catequina para inhibir la actividad de la enzima. Más aún, los cálculos termodinámicos de la energía de unión mostraron valores bajos, lo que está de acuerdo con una unión estable entre residuos hidrofílicos del grupo galoil y el bolsillo activo de la endonucleasa.

Si bien se requieren algunos estudios adicionales que finalmente demuestren clínicamente la capacidad antiviral de las catequinas del té verde sobre los virus de influenza A, los resultados son alentadores, en particular en un escenario pandémico

donde la resistencia viral a la influenza A H1N1 ya ha sido reportada.

El té verde, *Camelia sinensis*, gracias a su alto contenido natural de catequinas, podría ser la respuesta terapéutica a la prevención y tratamiento de la influenza A.

REFERENCIAS

- Bardage C, Persson I, Örtqvist Å, Bergman U, Ludvigsson JF, Granath F. 2011. Neurological and autoimmune disorders after vaccination against pandemic influenza A (H1N1) with a monovalent adjuvanted vaccine: population based cohort study in Stockholm, Sweden. **BMJ** 343: d5956
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. 2006. Beneficial Effects of Green Tea. A Review. **J Am Col Nut** 25: 79 - 99.
- Córdoba JA, Hernández M, Ortiz M, Martínez L, Lezana MA, López-Gatell H, Alpuche C. 2011. **Perfil epidemiológico de la pandemia de la influenza A (H1N1) 2009 en México**. Editorial Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de La Salud, Dirección General de Epidemiología. México DF, México.
- Dauvilliers Y, Montplaisir J, Cochen V, Desautais A, Einen M, Lin L, Kawashima M, Bayard S, Monaca C, Tiberge M, Filipini D, Tripathy A, Nguyen BH, Kotagal S, Mignot E. 2010. Post-H1N1 narcolepsy-cataplexy. **Sleep** 33: 1428 - 1430.
- Diez-Domingo J, Garcés-Sánchez M, Baldó JM, Planelles MV, Ubeda I, JuBert A, Mares J, Moris P, Garcia Corbeira P, Dramé M, Gillard P. 2010. Immunogenicity and safety of H5N1 A/Vietnam/1194/2004 (Clade 1) AS03-adjuvanted prepandemic candidate influenza vaccines in children aged 3 to 9 years: a phase ii, randomized, open, controlled study. **Pediatr Infect Dis J** 29: 35 - 46.
- Durrieu G, Caillet C, Lacroix I, Jacquet A, Faucher A, Ouaret S, Sommet A, Perault-Pochat MC, Kreft-Jaïs C, Castot A, Damase-Michel C, Montastruc JL. 2011. National Campaign of Vaccination against the Flu A (H1N1)v: National Follow-up of Pharmacovigilance. **Therapie** 66: 527 - 540.
- Izumi Y, Tokuda K, O'Dell KA, Zorumski CF, Narahashi T. 2007. Neuroexcitatory actions of Tamiflu and its carboxylate metabolite. **Neurosciences Lett** 426: 54 - 58.

- Johansen K, Nicoll A, Ciancio BC, Kramarz P. 2009. Pandemic influenza A(H1N1) 2009 vaccines in the European Union. **Euro Surveill** 14: 19361.
- Khan N, Mukhtar H. 2007. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sci** 81: 519 - 533.
- Kuzuhara T, Iwai Y, Takahashi, H, Hatakeyama D, Echigo N (2009). Green tea catechins inhibit the endonuclease activity of influenza A virus RNA polymerase. **PLoS Currents Influenza** October 13: rrn1052.
- Marcus C. 2011. Association between narcolepsy and H1N1 exposure. **Sleep** 34: 687.
- Ministerio de Salud de Chile. 2009. Influenza pandémica (H1N1) 2009. Reporte 15 de Diciembre de 2009. <http://www.redsalud.gov.cl/minsaludios/reporte15diciembre.pdf> (Acceso el 31 de enero de 2012).
- Reece PA. 2007. Neuroaminidase inhibitor resistance in Influenza viruses. **J Med Virol** 79: 1577 - 1586.
- Sartippour MR, Heber D, Zhang L, Beatty P, Elashoff D, Elashoff R, Liang Go V, Brooks MN. 2002. Inhibition of fibroblast growth factors by green tea. **Int J Oncol** 21: 487 - 491.
- Schwarz TF, Horacek T, Knuf M, Damman HG, Roman F, Dramé M, Gillard P, Jilq W. 2009. Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults. **Vaccine** 27: 6284 - 6290.
- Shun-Shin M, Thompson M, Heneghan C, Perera R, Harnden A, Mant A. 2009. Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BMJ** 339: b3172.
- Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochem Pharmacol** 82: 1807 - 1821.
- WHO. 2005. Influenza pandemic preparedness and response. **Report by the secretariat**.
- WHO. 2009a. **Pandemic (H1N1) - update 72**. http://www.who.int/csr/don/2009_10_30/en/index.html (Acceso el 31 de enero de 2012).
- WHO. 2009b. New influenza A (H1N1) virus; global epidemiological situation. **Weekly Epidemiol Rec** 84: 249 - 257.
- Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y. 2009. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. **Nature** 458: 909 - 913.