

Originales

- » Colorimetric method for simultaneous estimation of amlodipine besylate from plasma.
Doijad RC, Sankpal PS, More HN, Pishwikar SA, Pathan AB, Suryawanshi GB.
- » Optimization of Lovastatin Self-Nanoemulsifying Solid Dosage Form
Patel MJ, Patel SS.
- » El extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* K protege al ADN plasmídico del daño inducido por las radiaciones ultravioletas
Vernhes M, González-Pumariega M, Passaglia A, Martins FC, Sánchez-Lamar A.
- » Las funciones desempeñadas por los farmacéuticos titulares en la provincia de Valencia en 1954
Parrilla Valero F.
- » Preparation and characterization of rufinamide HP- β -cyclodextrin complexes prepared by the kneading method for solubility enhancement.
Patel Ravish J, Dave Dhara A.

Artículo Especial

- » The manufacture of gelatine capsules in the XIX century based on Aleksander Karwacki's publication dating from 1859
Rutkowska E.

El extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* K protege al ADN plasmídico del daño inducido por las radiaciones ultravioletas.

Vernhes M,¹ González-Pumariega M,² Passaglia A,³ Martins FC³, Sánchez-Lamar A²

1. Departamento de Radiobiología, (CEADEN) (Habana, Cuba.)

2. Laboratorio de Genética Toxicológica, Departamento de Biología Vegetal, Universidad de la Habana, (Habana, Cuba)

3. Departamento de Microbiología, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, (São Paulo, SP, Brazil)

Original Paper Artículo Original

Correspondence/Correspondencia:

Laboratorio de Genética Toxicológica,
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, C.
Habana, Cuba.
Fax: 537 8321321.
Email: alamar@fbio.uh.cu

Competing interest / Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés.

Fundings / Financiación:

Este trabajo fue realizado por el proyecto de colaboración internacional CAPES (Brasil)-MES (Cuba). El financiamiento y soporte fue brindado por CAPES (São Paulo, Brazil), FAPESP (São Paulo, Brazil) y CNPq (Brasilia, Brazil)

Received: 12.09.2012

Accepted: 06.03.2013

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto protector del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis*, K ante el daño inducido por las radiaciones UVB y UVC.

Material y métodos: Se empleó el ensayo con ADN plasmídico (pBluescript SK II) libre de célula. Se evaluó la capacidad del extracto acuoso de *P. orbicularis* de inducir roturas de cadenas en el plásmido, a las concentraciones 0,0001-2,0 mg/ml. Se realizaron estudios de protección del extracto frente a las radiaciones UVB y UVC a las concentraciones de 0,1-2,0 mg/ml. Se cuantificó la transmitancia del extracto frente a ambos tipos de radiaciones.

Resultados: Ninguna de las concentraciones evaluadas resultó genotóxica en 30 min de exposición. Las concentraciones ≥ 1 mg/ml de *P. Orbicularis* sí indujeron roturas de cadenas a tiempos mayores de evaluación. El extracto de *P. Orbicularis* protegió al ADN frente a las radiaciones UVB y UVC a concentraciones $\geq 0,1$ mg/ml y 0,5 mg/ml respectivamente.

Conclusiones: En nuestras condiciones experimentales, el extracto acuoso de *P. Orbicularis* protege al ADN frente al daño inducido por las radiaciones UV.

PALABRAS CLAVES: *Phyllanthus Orbicularis*, UV, dímero de pirimidina, extracto vegetal, fotoprotección.

ABSTRACT

Aim: The aim of this work was to evaluate the protective effect of aqueous extract of *Phyllanthus Orbicularis*, K from the damage induced by UV radiation.

Material and methods: The plasmid-based non cellular system was used. The extract capacity to induce DNA strand breaks was evaluated at 0.0001- 2.0 mg/ml concentrations. The protective effect of extract against UVB and UVC radiation was evaluated at 0.1- 2.0 mg/ml concentrations. The transmittance of extract was measured for both UV radiations.

Results: The *P. orbicularis* aqueous extract was not genotoxic even after 30 min of exposure. Concentrations ≥ 1 mg/ml of extract induced strand breaks at major times of exposition. *P. Orbicularis* extract protected DNA against UVB and UVC radiation at concentrations ≥ 0.1 mg/ml and 0.5 mg/ml respectively.

Conclusions: In our experimental conditions, *P. Orbicularis* aqueous extract protects DNA from damage induced by UV radiation.

KEY WORDS: *Phyllanthus Orbicularis*, UV, pyrimidine dimers, vegetal extract, photoprotection.

INTRODUCCIÓN

Diversos agentes genotóxicos, endógenos y exógenos amenazan constantemente la integridad del material genético en los organismos vivos causando lesiones en el ADN. La radiación ultravioleta (UV) es uno de los mutágenos físicos ambientales más dañinos existentes en la actualidad. Según su longitud de onda esta se divide en UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (200-280 nm). Las radiaciones UV de tipo B y C causan daños directos en el ADN. Las principales lesiones inducidas por este agente son los dímeros de pirimidina *cis-syn* ciclobutano (CPD) y el pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP)^{1,2}. La no reparación o la incorrecta reparación de estos daños conllevan a mutaciones en células epidérmicas que pueden estar relacionadas con los procesos de inducción de muerte celular, fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis^{3,4}. La UVB además, puede incrementar los niveles de radicales libres de oxígeno (RLO) en la célula desencadenando un progresivo deterioro estructural y funcional de elementos celulares como las proteínas y el ADN⁵.

Debido a la continua degradación de la capa de ozono estratosférica se está produciendo un incremento de las radiaciones UV en la superficie terrestre y con ello sus efectos dañinos sobre la salud humana. Entre ellos, el cáncer de piel es uno de los efectos más severos³. Como consecuencia en la actualidad existe un creciente interés en la búsqueda de nuevos compuestos capaces de minimizar tales efectos.

Los extractos vegetales son mezclas complejas ricas en metabolitos secundarios que pueden ser estudiados como fuente natural de agentes antígenotóxicos y así su uso en la quimiopreención del cáncer y otras enfermedades crónicas degenerativas. En particular, productos naturales como los retinoides, las proantocianidinas, flavonoides y polifenoles del té verde han sido identificados como potentes agentes quimiopreventivo frente al cáncer de piel. Para algunos polifenoles se ha demostrado que esta capacidad quimiopreventiva está estrechamente relacionada con las propiedades absorbivas y/o antioxidantes que pueden poseer estos compuestos⁶⁻⁸.

En la flora cubana la especie *Phyllanthus orbicularis* K poseen un sólido aval como protector del material genético. Propiedades antioxidantes y antígenotóxicas frente a mutágenos químicos y físicos han sido demostradas para el extracto acuoso de esta especie⁹⁻¹³.

En las investigaciones de antigenotoxicidad, la aplicación de métodos que permitan evaluar los daños directo en la estructura primaria del ADN ha recibido gran atención. Los ensayos con ADN plasmídico han sido frecuentemente

empleados, ofreciendo evidencias de protección a este nivel genético que justifican el empleo de modelos experimentales más complejos¹⁴⁻¹⁶.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la presente investigación tiene como objetivo estudiar la potencialidad del extracto acuoso de *P. orbicularis*, como protector del ADN ante el daño inducido por radiaciones UVB y UVC, en ADN plasmídico libre de célula .

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* K. (EPO)

El extracto de *Phyllanthus orbicularis* K se obtuvo a partir de plantas colectadas en Cajalbana, Pinar del Rio, en el mes de octubre de 2006. El extracto fue liofilizado según el método descrito¹⁷. A partir de una solución madre de EPO, a la concentración 10 mg/ml (w:v) se prepararon diluciones de trabajo cuyas concentraciones fueron 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 1; 2 y 4 mg/ml.

Modelo experimental y endonucleasa.

Se empleó el plásmido pBluescript II SK circular covalentemente cerrado (2961 pb). Este plásmido contiene: origen de replicación bacteriano, gen de resistencia a ampicilina y sitios de corte para más de treintena enzimas de restricción¹⁸. La enzima endonucleasa V del fago T4 (T4-endoV), fue la empleada para el reconocimiento y corte de las lesiones CPDs en el ADN inducidos por la radiaciones UV².

Irradiación UVB y UVC.

Para la irradiación con UVB y UVC fueron usadas lámparas de emisiones de ondas de 312 y 254 nm, respectivamente. La tasa de dosis fue monitoreada por radiómetros VLX3W, de sensor monocromático CX-312 y CX-254, respectivamente. Las dosis de irradiación fueron 3000 y 100 J/m² para UVB y UVC respectivamente.

Soluciones de trabajo

Solución solvente del ADN: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 (Solución TE).

Solución tampón para la reacción de digestión con la enzima endonucleasa V del fago T4: 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris HCl, pH 8 (Solución NET).

Solución tampón de la electroforesis en gel de agarosa: 44,6 mM Tris base, 44,5 mM Ácido bórico, 50 mM EDTA, pH 8 (Solución TBE 0,5x).

Solución de carga: 75 mM EDTA, 50% Glicerol, 0,2% Bromofenol azul.

Procedimientos.

Para todos los procedimientos las muestras de ADN plasmídico fueron disueltas en solución (sln) TE a una concentración inicial de 100 ng/ μ l. El control negativo fue 1 μ l de ADN, en 19 μ l de solución NET e incubado en hielo durante 30 minutos. El control positivo fue 1 μ l de ADN irradiado en 18 μ l de sln NET, 1 μ l de T4-endoV, incubado a 37°C durante 30 minutos.

Evaluación de la genotoxicidad de EPO sobre el ADN plasmídico.

Para evaluar si el extracto produce roturas de simple (SSB, de las siglas en inglés) o doble (DSB, de las siglas en inglés) cadenas en el ADN, a 1 μ l de ADN se le adicionó 1 μ l de EPO. Se incubaron las muestras a 37°C durante 30 minutos. Para evaluar la incidencia del tiempo de exposición en el efecto genotóxico, solo fueron tomadas las mayores concentraciones que no indujeron roturas en 30 min de exposición. Se incubaron las muestras 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 en el gel.

Evaluación de la inhibición de la T4-endo V por su exposición a EPO.

Para evaluar si el extracto es capaz de inhibir la acción de la enzima T4-endo V, a 1 μ l de extracto, se le adicionó 17 μ l de sln NET y 1 μ l de T4-endo V y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se le añadió 1 μ l de ADN irradiado con UVC.

El criterio de inhibición de la actividad enzimática utilizado fue la permanencia de la forma circular súperenrollada (**FS**) del plásmido en el gel.

Evaluación de la capacidad protectora de EPO frente a la irradiación UVB y UVC.

Para evaluar la capacidad protectora del EPO se siguió un esquema de cotratamiento, donde el plásmido es irradiado en presencia del extracto, para ello alícuotas de 1 μ l de ADN fueron tratadas con EPO e inmediatamente fueron irradiadas con UVB y UVC. Inmediatamente se le adicionó 17 μ l de sln NET y 1 μ l de T4-endo-V. Esta mezcla se incubó a 37°C, durante 30 minutos.

El criterio de protección utilizado fue la aparición de la forma circular súperenrollada (**FS**) conjuntamente con la disminución o desaparición de la forma relajada (**FR**) del plásmido.

Electroforesis y visualización

Con la finalidad de separar las **FS**, **FR**, **FL** de los plásmidos se desarrolló la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% disuelto en TBE (0,5X) que contenía Bromuro de etidio (0.1

ng/ μ l). La electroforesis se realizó en sln TBE (0,5X) a 80V y 60 mA durante 60 minutos.

Cuantificación de la transmitancia de EPO frente a las radiaciones UV.

Se midió la transmitancia de las concentraciones de 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2 mg/ml de EPO a 312 nm (UVB) y 254 nm (UVC). Fue empleado un espectrofotómetro Génesis TM Serie 10 de la Corporación Thermo Electron. El control negativo fue agua miliQ estéril.

RESULTADOS.

Producción de roturas de cadenas en el ADN plasmídico por EPO.

En la figura 1 se muestran los resultados del efecto de EPO sobre el ADN plasmídico en 30 min de exposición. Ninguna de las concentraciones evaluadas produjo roturas en las cadenas de las moléculas plasmídicas. Sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición a 60 y 90 min las concentraciones evaluadas (1,0 y 2,0 mg/ml) tuvieron un efecto clastogénico. Se produjeron SSB en el ADN, generándose así la FR del plásmido. Para la mayor de las concentraciones evaluadas (2,0 mg/ml) menor es el tiempo necesario para mostrar este efecto dañino sobre el ADN (Figura 2).

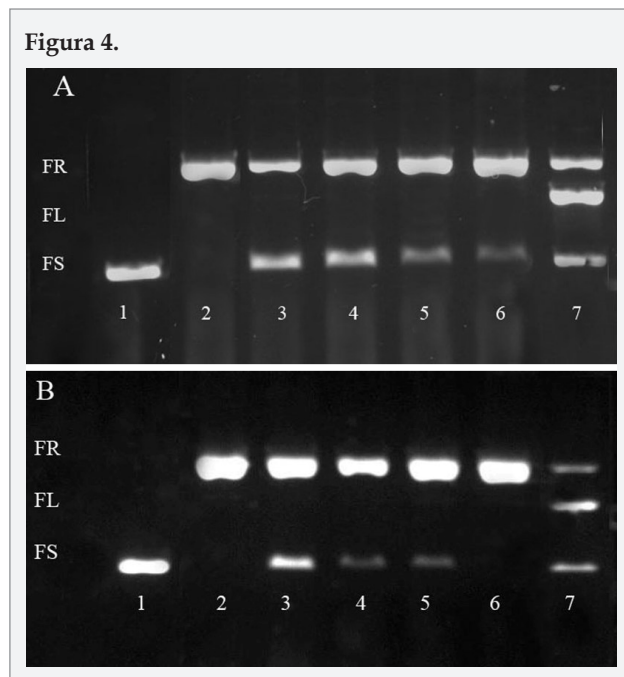
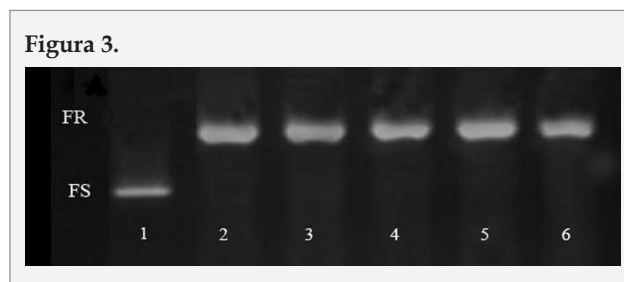
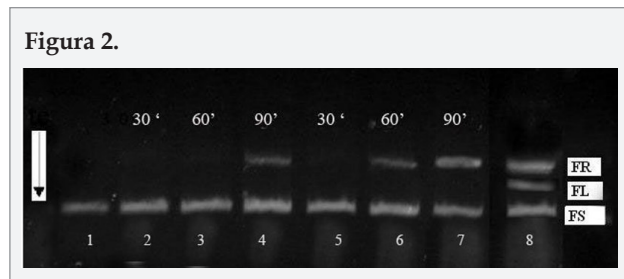
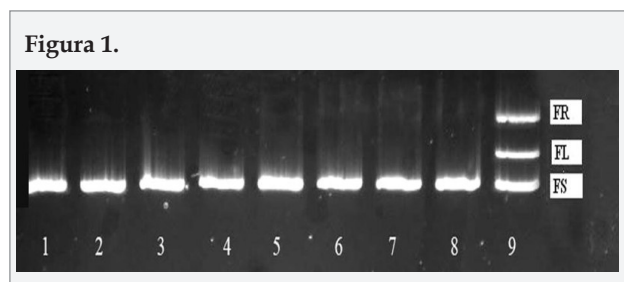
No inhibición de la T4-endo V por su exposición a EPO

Un impedimento para la evaluación de la capacidad protectora de EPO sería una disminución de la actividad de la T4 endonucleasa V debido a la interacción de sus fitocompuestos con la enzima. Los resultados mostraron que EPO no inhibió la acción de la enzima, en ninguna de las concentraciones evaluadas. La enzima realizó cortes en las moléculas de ADN en presencia de las lesiones CPD, generándose así las FR de los plásmidos (Figura 3).

Capacidad protectora de EPO frente a la irradiación UVB y UVC.

Las concentraciones de EPO para la evaluación del efecto protector frente a UVB y UVC fueron 2,0; 1,0; 0,5 y 0,1 mg/ml las cuales no produjeron roturas en las cadenas del ADN, ni inhibieron la actividad de la T4 endonucleasa V.

Los resultados mostraron un efecto protector de EPO en el ADN plasmídico ante el daño inducido por las radiaciones UVB (Figura 4A) y UVC (Figura 4B) a partir de la concentración de 0,5 mg/ml. Al aumentar la concentración del extracto, aumenta la intensidad de las bandas FS del plásmido, lo que muestra un aumento de la capacidad protectora de EPO. Para la menor de las concentraciones



evaluadas (0,1 mg/ml) este efecto antígenotóxico del extracto fue solo evidente para el plásmido irradiado con UVB.

Transmitancia de EPO frente a las radiaciones UV.

Al analizar los valores de transmitancia de EPO, frente a UVB y UVC (Figura 5), se observó un comportamiento similar para ambos tipos de irradiación. A medida que

aumenta la concentración EPO menor es la capacidad del extracto de permitir el paso de la radiación UV. Más del 50% de las radiaciones UV son absorbidas por EPO a la concentración de 0,1 mg/ml, concentraciones superiores a esta, bloquean totalmente el paso de las mismas.

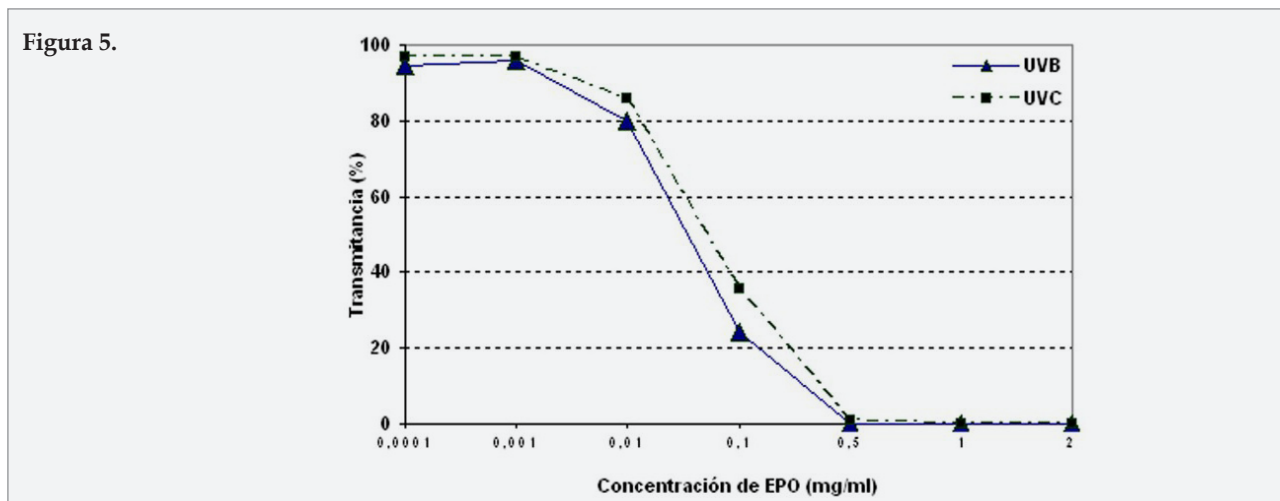
DISCUSIÓN

La radiación UV es un potente mutágeno físico que pueden ocasionar severos trastornos en la salud humana como consecuencia de sus efectos en el ADN. Las lesiones producidas en el material genético son consideradas como los primeros pasos para la aparición de enfermedades cutáneas como las quemaduras, el fotoenvejecimiento, y la fotocarcinogénesis. Una adecuada quimioprevención mediante el empleo de extractos vegetales, constituye una nueva estrategia esencial para el control de los efectos perjudiciales de una sobreexposición a la luz solar¹⁹.

En la flora cubana la especie *Phyllanthus orbicularis* K poseen un sólido aval como protector del ADN. El extracto acuoso de esta planta ha mostrado propiedades antioxidantes y antígenotóxicas frente a mutágenos químicos y físicos como, rayos X, peróxido de hidrógeno, aminas aromáticas policíclicas, mitomicina C y radiaciones gamma^{9-11,13}. Sin embargo, la capacidad fotoprotectora de EPO en el modelo experimental con ADN plasmídico libre de célula no había sido abordada.

Estudios precedentes de genotoxicidad a nivel de estructura primaria han avalado este extracto de no genotóxico²⁰. En nuestro trabajo una exposición del plásmido a EPO durante 30 minutos muestra similar efecto. Un factor importante en la acción genotóxica de un compuesto es el tiempo que el mismo pueda requerir para realizar el daño. En esta investigación, fue demostrado el efecto dañino de EPO al aumentar el tiempo de exposición del plásmido al extracto. Este efecto dañino del extracto dependiente del tiempo se demuestra por primer vez a nivel de estructura primaria en ADN plasmídico. Estudios precedentes a nivel de estructura cromosómica en células CHO también han demostrado la incidencia del tiempo en la genotoxicidad de EPO⁹.

La mediación del tiempo de exposición en la expresión del daño en este modelo pudiera deberse a las interacciones químicas entre componentes del extracto y el ADN. El extracto de *P.orbicularis*, es una mezcla compleja de compuestos fenólicos. Estudios fitoquímicos de EPO han mostrado la presencia flavonoides, taninos, antocianidinas y coumarinas²¹. También compuestos como flavanoles, quercetinas glicosidas, taninos condensados, derivados



del ácido galico, rutina, procianidinas, catequinas y epicatequinas han sido identificados²². Algunos de los fitocompuestos presentes en EPO pudieran ser los responsables del efecto genotóxico demostrado. Por ejemplo los flavonoides, las coumarinas y los alcaloides constituyen compuestos informados por la literatura internacional como agentes genotóxicos. De manera particular algunas coumarinas y alcaloides muestran genotoxicidad dependiente de la concentración y el tiempo²³⁻²⁵.

En estudios de fotoprotección ha sido empleada la enzima T4 endonucleasa V en este ensayo para la detección de lesiones de tipo (CPD) producidos por la radiación UV²⁶⁻²⁸. Al evaluar el efecto protector de EPO, se podrían generar falsos positivos dada la eventual interacción del extracto con la enzima. En este sentido, los resultados obtenidos demostraron que no existe un efecto inhibitorio de la actividad de la T4 endo V por el extracto.

El presente trabajo demostró la capacidad protectora del extracto acuoso de *P. orbicularis* frente a la radiación UV en ADN plasmídico. El EPO protegió al ADN en concentraciones donde la transmittancia era baja o nula. Sugiere esto, que el efecto fotoprotector del extracto se debe a la capacidad absorbente del mismo frente a las radiaciones UV. De las plantas numerosos compuestos aromáticos han sido propuestos como inhibidores de la formación de dímeros, pues absorben las radiaciones UV. Como ejemplo encontramos a los alfa tocoferoles de los aceites de plantas y las vitaminas C y E^{29,30}. Las antocianinas y los flavonoides, también han sido compuestos muy estudiados por su habilidad de absorber las radiaciones UV^{6,7,31}. La presencia de estos compuestos en EPO pudieran ser los responsables del efecto fotoprotector del extracto demostrado en la presente investigación.

Las lesiones provocadas en el ADN por las radiaciones UVB además de ser origen directo (CPD y 6-4PP) pueden

ser indirectas debido a la formación de RLO, formándose roturas de simple y doble cadenas^{32,33}. En correspondencia con esto, en nuestras condiciones experimentales, 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 la acción oxidante de los RLO. Una tendencia actual en el estudio de la capacidad de fotoprotección de las plantas es la evaluación de compuestos vegetales con avalada propiedad antioxidante. En este sentido variados son los componentes de plantas que han sido estudiados como posibles protectores frente a UV; la vitamina C y E, el Ginsenoside Panoxatriol (medicina tradicional china), polifenoles como flavonoides isoflavonas; el 1-(4-hydroxy-3-methoxyfeil)-5-hidroxi-3-decanona, rindiendo resultados positivos en todos los casos^{15,33,34}. Trabajos precedentes han avalado la propiedad antioxidante de EPO^{9,11}. Compuestos polifenólicos aislados del mismo, como el 2,4-di-*tert*butilfenol y el 2,6-di-*sec*butilfenol, son capaces de secuestrar radicales hidroxilos, aún en muy bajas concentraciones¹². Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, para el caso de UVB, el efecto fotoprotector de EPO podría deberse además de por su capacidad absorbente, también por la propiedades antioxidantes del extracto.

Los resultados de nuestra investigación muestran la capacidad de EPO de absorber las radiaciones UV y con ello impedir la formación de daños en el ADN. Esta capacidad de protección dado un principio de acción de carácter físico lleva a pensar de que este extracto pueda proteger al ADN de las radiaciones UV presentes en la luz solar. Adicionalmente dado el carácter antioxidante del extracto en estudio, otro modo de acción fotoprotectora pudiera potenciar la capacidad fotoquimiopreventiva de *P. orbicularis* K. Investigaciones futuras en biomodelos bacterianos y/o células eucariontes serían de gran utilidad para profundizar en el estudio de tal propuesta.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dr. Rosalina Berazain por la autenticación de las especies *Phyllanthus orbicularis* K colectadas.

BIBLIOGRAFÍA.

- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*. 2010; 32.
- Besaratinia, Yoon J, Schroeder Ch, Bradforth SE, Cockburn M, Pfeifer GP. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB J*. 2011; 25: 1-13.
- Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion.** *Cancers*. 2010; 2: 436-82.
- Nishyori C, Hattori Y, Toyokuni S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Sig*. 2004; 6: 561-70.
- Pattinson D, Davies M. Actions of ultraviolet light on cellular structure. *Exs*. 2004; 96: 131-57.
- Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*. 2010; 302 (2): 1-19.
- Afaq F. Natural agents cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 508(2): 144-51.
- Katiyar S. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 508: 152-8.
- Sánchez-Lamar A, Cozzi R, Cundari E, Fiore M, Ricordy R, De Salvia R. *Phyllanthus orbicularis* aqueous extract: cytotoxic, genotoxic and antimutagenic effects in the CHO cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999; 161: 231-9.
- Ferrer M, Sánchez-Lamar A, Fuentes JL, Barbé J, Llagostera M. Studies on antimutagenesis of *Phyllanthus orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. *Mutat Res*. 2001; 498: 99-105.
- Ferrer M, Sánchez-Lamar A, Fuentes JL, Barbé J, Llagostera M. Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using *Salmonella* assay. *Mutat Res*. 2002; 4004(52): 1-4.
- Ferrer D. Modelación in silico de las reacciones de captura del radical hidroxilo a partir de los compuestos 2,4 diterbutilfenol y 2,6 disec butilfenol [Tabajo de Diploma]. Ciudad de la Habana. Universidad de La Habana; 2008.
- Alonso A, Fuentes JL, Sánchez-Lamar A, Llagostera M. Antimutagenic effect of *Phyllanthus orbicularis* against γ -radiation. *Lat Am J Pharm*. 2010; 29(1): 1-5
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mut Res*. 2003; 531: 5-23.
- Russo A, Cardile V, Lombardo L, Vanilla L, Acquaviva R. Genistin inhibits UV light induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *J Nutr Biochem*. 2006; 17: 103-8.
- Geng J, Yu SB, Wang X, Shen P, Zhou P, Chen XD. Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based non cellular system. *J Biochem Biophys Meth*. 2008; 70: 1151-5.
- Del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J ethnopharmacol*. 2000; 72: 317-22.
- Alting-Mees MA, Short JM. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17(22): 9494.
- Wang SQ, Balagula Y, Osterwalder U. Photoprotection: current and future technologies. *Dermatol ther*. 2010; 23: 31-47.
- Alonso A, Fuentes JL, Prieto E, Sánchez-Lamar A, Ferrer M, Llagostera M. Antigenotoxic effect of the aqueous extract of *Phyllanthus orbicularis* HBK in γ irradiated *Escherichia coli* cells. *Recent Progress in medicinal plants. Phytotherapeutic*. 2005; 10: 15-23.
- Gutiérrez Y, Miranda M, del Barrio G, Varona N, Mayoral JL. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica preliminar de *Phyllanthus orbicularis*. *Rev Cuba Farm*. 2000; 34: 56-62.
- Álvarez AL, del Barrio G, Kouri V, Martínez PA, Suárez B, Parra F. *In vitro* anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Phytomedicine*. 2009; 16: 960-6.
- Ferguson L. Inhibitors of topoisomerase II enzymes : a unique group of environmental mutagens and carcinogens. *Mut Res*. 1998; 400: 271-8.
- Traore F, Gasquet M, Laget M, Guirad H, DiGiorgio C, Azas N, et al. Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis* and *Nauclea latifolia*. *Phytotherapy Research*. 2000; 14(8): 608-11.
- Sanyal R, Darroudi F, Parzefall W, Nagao M, Knasmüller S. Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis*. 1997; 122: 97-303.
- Marrot L, Belaidi J, Chaubo C, Meunier J, Pérez P, Agapakis-Causse C. An in vitro strategy to evaluate the

- phototoxicity of solar UV at the molecular and cellular level: application to photoprotection assessment. *Eur J Dermatol.* 1998; 8(6): 403-12.
27. McVean M, Liebler DC. Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. *Mol Carcinog.* 1999; 24: 169-76.
28. Kejnovsky E, Nejedly K, Kypr J. Factors influence resistance of UV-irradiated DNA to the restriction endonuclease cleavage. *Int J Biol Macromol.* 2004; 34: 213-22.
29. Lin JY, Selim MA, Shea CR, Grichnik JM, Omar MM, Monteiro-Riviere NA, et al. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 48(6): 866-74.
30. Placzek M, Gaube S, Kerkmann U, Gilbertz KP, Herzinger T, Haen E, et al. Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and d-a-tocopherol. *J Invest Dermatol.* 2005; 124 (2): 304-7.
31. Hada H, Hidema J, Maekawa M, Kumagai T. Higher amounts of anthocyanins and UV-absorbing compounds effectively lowered CPD photorepair in purple rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ.* 2003; 26: 1691-701.
32. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-Hydroxy-20-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health.* 2009; 27:120-39.
33. Guang J, Yang L, Shun Zi J, Liu XL, Su-Zheng, L. UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. *Radiat Environ Biophys.* 2007; 46: 61-8.
34. Maia P, D Gianeti M, Kanashiro A, Lucisano Y, Gaspar L. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. *Photochem Photobiol.* 2006; 82: 683-8.