

Citotoxicidad de *Plantago major* L.

Gálvez M.¹; López-Lázaro, M.¹; Navarro, E.²; Mederos, S.³; Martín-Cordero, C.¹; Ayuso, M.J.¹

1. LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA. DPTO. FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA. ESPAÑA.

2. DPTO, FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA. ESPAÑA.

3. DPTO, BIOLOGÍA VEGETAL. FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA. ESPAÑA.

Resumen:

Plantago major L. ha sido empleado en medicina popular en el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Este estudio muestra la actividad citotóxica "in vitro" de un extracto metanólico de *P. major* silvestre y se compara con los valores obtenidos con el extracto metanólico de *P. major* cultivado por micropropagación.

Los resultados revelaron que ambos extractos fueron activos, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos.

Palabras clave:

Plantago major, Llantén, Citotoxicidad, Micropropagación.

Introducción:

La búsqueda de nuevos fármacos antitumorales a partir de fuentes de origen natural está siendo exitosa a nivel mundial y algunos de los compuestos activos aislados de especies vegetales forman parte de la terapia oncológica⁽¹⁾.

Plantago major L. (Plantaginaceae), comúnmente conocido como "llantén", es utilizado en medicina popular para el tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas, el cáncer^(2,9).

Estudios químicos de las hojas de *P. major* han mostrado la presencia de flavonoides, ácidos fenóles, fenilpropanoides, iridoides, taninos y mucílagos^(2,6,10).

Esta especie se propaga por semillas, y sigue una polinización cruzada; como resultado, la progenie muestra una variabilidad importante. Una alternativa útil para mejorar la calidad de la misma y satisfacer su demanda, es el cultivo por micropropagación.

El objetivo de este trabajo es, por tanto, determinar la actividad citotóxica de extractos metanólicos de hojas obtenidas a partir de *P. major* silvestre y cultivado por micropropagación.

Material y Métodos:

Material vegetal

-Hojas de *Plantago major* L. (Plantaginaceae) silvestre, recolectado en Galdar, (Gran Canaria), y autenticado por Dr. M. del Arco, del Departamento de Biología Vegetal, de la Universidad de La Laguna.

-Hojas de *P. major* cultivado por micropropagación por Mederos y cols.⁽¹¹⁾

Preparación de los extractos metanólicos

-Las hojas desecadas y pulverizadas (90 g) de *P. major* silvestre y cultivado, fueron sometidas a extracción continua

tipo Soxhlet durante 24 h con cloroformo (Cl₃CH) y 48 h con metanol (MeOH); el disolvente fue eliminado a presión reducida. El rendimiento de los extractos metanólicos correspondientes a los plantagos a ensayar, fue 14,5% y 18,1 % (p/p), respectivamente.

Estudio fitoquímico

-Se realizó mediante reacciones coloreadas (flavonoides, taninos, saponósidos, iridoides, esteroides y triterpenos, cumarinas)^(7,12,14) y métodos cromatográficos (CCF) con diferentes reveladores.

Actividad citotóxica

Unión al ADN y ARNt

-El ensayo fue realizado siguiendo el método descrito por Pezzuto y cols.⁽¹⁵⁾. Se utilizó ADN de timo de carnero y ARNt de levaduras (Sigma Chem.). El equipo HPLC (Waters mod. 510), con detector de absorbancia LC 85B programado a 254 nm. La columna fue C18 RP (Spherisorb ODS-2,5 mm de tamaño de partícula) y la fase móvil utilizada, H₂O:MeOH (80:20). En estas condiciones experimentales, el ADN y ARNt libre eluye con un tR = 1 min. Las muestras, y soluciones de ADN o ARNt (0.1 mg/mL en agua bidestilada) fueron agitadas e incubadas a temperatura ambiente durante 30 min previo a la inyección. Los extractos fueron ensayados a la concentración de 1 mg/mL. El patrón fue vincristina.

Correspondencia:

María Jesús Ayuso
Laboratorio de Farmacognosia. Dpto. Farmacología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Sevilla.
C/ Profesor García González, n°2
41012 Sevilla
e-mail: ayuso@us.es

	(%) Reducción del pico de ADN	(%) Reducción del % pico de ARNt	Inhibición en disco de patata ^a
Extracto MeOH <i>P. major silvestre</i>	99,6 %	7 %	19/13
Extracto MeOH <i>P. major cultivado</i>	100 %	5 %	50/33
Vincristina	75 %	75 %	20/25

^a Actividad significativa es indicada cuando dos o más ensayos independientes muestran valores negativos, mayores o iguales al 20% de inhibición.

Tabla 1

Efectos de los extractos metanólicos de *P. major silvestre* y cultivado en la unión al ADN/ARNt y en la inhibición de la tumorigénesis en discos de patata

Tumorigénesis en discos de patata

La tumorigénesis sobre discos de tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*) fue propuesto como un sistema ideal para investigación de la transformación de procesos celulares y es inducida por cadenas específicas del ADN de la bacteria Gram (-) *Agrobacterium tumefaciens*⁽¹⁶⁾. Este bioensayo fue realizado siguiendo la técnica descrita por Ferrigni y cols.⁽¹⁷⁾ y llevado a cabo por mostrar buena correlación con los ensayos en células tumorales animales⁽¹⁸⁾.

Las muestras fueron preparadas disolviendo 8 mg de cada uno de los extractos metanólicos en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril, y tras filtrado y dilución, se mezclaron con el cultivo bacteriano para la inoculación. Vincristina fue utilizado como control positivo.

Líneas celulares humanas

-La citotoxicidad en las tres líneas tumorales humanas ensayadas, adenocarcinoma renal (TK-10), adenocarcinoma de mama (MCF-7), y melanoma (UACC-62) fue determinada siguiendo los protocolos establecidos por el Instituto Nacional del Cancer, (NCI)⁽¹⁹⁾. Para el mantenimiento de las líneas celulares hay que conseguir el número apropiado de células en fase logarítmica de crecimiento⁽²⁰⁾.

La determinación de la densidad celular se realizó por la técnica de la sulforhodamina B (SRB). Esta técnica colorimétrica estima el número de células de forma indirecta, mediante tinción de las proteínas celulares totales, con el

colorante SRB⁽¹⁹⁾. Se calcularon los parámetros CI50 (concentración que produce un 50% de inhibición del crecimiento celular), CTI (concentración que produce una inhibición total del crecimiento) y CL50 (concentración que causa un 50% de muerte celular), de acuerdo con los protocolos previamente descritos⁽¹⁹⁾. Al menos dos experimentos independientes se realizaron para cada extracto, ensayando cinco concentraciones (0.025, 0.25, 2.5, 25 y 250 mg/mL).

Resultados

En el extracto metanólico de *P. major* obtenido por micropropagación, se detectó la presencia de flavonoides, cumarinas, triterpenos e iridoides, el resto de los ensayos en el estudio fitoquímico fueron negativos.

Los resultados obtenidos en el ensayo de la interacción con el ADN y ARNt, realizado por HPLC, se muestran en la tabla 1, donde se expresa el % de reducción del área del pico correspondiente al ADN y ARNt libre. Ambos extractos metanólicos inducen un marcado descenso en el área del pico de ADN libre, indicándonos que poseen compuestos que han interactuado con el ADN, formando complejos que eluyen a otro tR diferente.

Asimismo, en la tabla 1 se muestran los resultados del % de inhibición de la inducción de tumores en discos de patatas producidos por los extractos en dos experimentos independientes. Se observa que el extracto metanólico

de *P. major cultivado*, es más activo (50/33 %) que el extracto de la planta silvestre (19/13 %).

La actividad citotóxica de los extractos metanólicos en las líneas celulares TK-10, MCF-7 y UACC-62, expresados como media ± SEM (n=2), figuran en la tabla 2. El compuesto antitumoral, etopósido, fue utilizado como control positivo en comparación con los extractos ensayados. Estos extractos mostraron actividad citotóxica en dos de las tres líneas celulares a las dosis recomendadas por el NCI (EEUU), siendo inactivos en la línea TK-10. El crecimiento de la línea UACC-62 fue inhibido totalmente por ambos extractos, silvestre y cultivado, (CTI=112,5 y 223,5 mg/mL, respectivamente); también mostraron total inhibición del crecimiento de la línea MCF-7 (CTI=97 y 159,5 mg/mL, respectivamente). En esta línea celular, ambos extractos producen una muerte celular neta del 50% (CL50) a las dosis de 207 y 193,5 mg/mL, respectivamente.

Los valores obtenidos para cada extracto fueron comparados estadísticamente (prueba t-Student, doble cola) observando que no hay diferencia significativa (p>0.05) entre los resultados obtenidos para los extractos en estudio.

Discusión

El conocimiento etnofarmacológico de las plantas es de gran utilidad para la búsqueda de actividad. Nuestros resultados demuestran el efecto citotóxico de los extractos metanólicos de *P. major* (silvestre y obtenido por micropropagación). Estos resultados preliminares pueden ser justificados por la presen-

cia, en ambos extractos en estudio, de flavonoides e iridoides. Ryu⁽²¹⁾, Le Bail⁽²²⁾ y Post y Varma⁽²³⁾, mostraron que la flavona luteolina, genina del heterósido mayoritario luteolina-7-O-b-glucósido de *Plantago spp.*, poseía actividad citotóxica en diferentes líneas celulares humanas como renal A-549, ovario SK-OV-3, melanoma SK-MEL-2, XF-498, HCT15, gástrica HGC-27, mama MCF-7 y leucémica^(21,23). Similares resultados han sido establecidos por Chowdhury y cols.⁽²⁴⁾ y Gálvez y cols.⁽²⁰⁾, al encontrar respectivamente, que luteolina y luteolina b-glucósido, se comportan como venenos de topoisomerasa I, contribuyendo a este potencial efecto citotóxico.

Lee y cols.⁽²⁵⁾, mostraron que, iridoides como aucubina y su genina, poseían actividad antitumoral al inhibir las enzimas ADN y ARN polimerasas en células Hep G2, e interactuar con el ADN. Todo lo expuesto nos sugiere que esta relación estructura química-actividad farmacológica, pudiera ser aplicada a nuestro estudio.

Por tanto, en nuestras condiciones experimentales, es evidente que el cultivo por micropropagación de *P. major* proporciona una alternativa útil a la propagación por

	Parámetros de inhibición (mg/mL)	TK-10	MCF-7	UACC-62
Exto MeOH <i>P. major</i> silvestre *	CI50	>b	46,5 ± 5,5	46,5 ± 5,5
	CTI	>	97,5 ± 11,5	112,5 ± 12,5
	CL50	>	207 ± 23	247 ± 3
Exto MeOH <i>P. major</i> cultivado	CI50	>	87,5 ± 52,5	61 ± 11
	CTI	>	159,5 ± 90,5	223,5 ± 26,5
	CL50	>	193,5 ± 56,5	>
Etopósido	CI50 ^c	9,95 ± 0,08	0,87 ± 0,21	1,13 ± 0,21
	CTI	52,4 ± 0,4	>	13,3 ± 2,4
	CL50	>	>	>

* Datos publicados en (20).

^a Concentración (mg/mL) necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50% (CI50); para producir inhibición total de crecimiento (CTI) y para inducir 50% de la muerte celular (CL50).

^b > indica que no se ha observado actividad a la dosis máxima ensayada (250 mg/mL en el caso de los extractos y 100 mM para etopósido)

^c Los valores de inhibición de etopósido están expresados en mM.

Tabla 2

Actividad citotóxica de los extractos metanólicos de *P. major* silvestre y cultivado frente a tres líneas tumorales humanas, expresados como media ± SEM (n=2).

semillas, y permite obtener un extracto estandarizado que no pierde la actividad antitumoral de la planta silvestre, y admite la posibilidad de realizar una multiplicación a gran escala.

Agradecimientos

Agradecemos al Instituto Nacional del Cancer (NCI), EEUU, por proporcionar generosamente las líneas tumorales utilizadas en la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Mann J.: Natural Products in Cancer Chemotherapy: Past, Present and Future. *Nature Rev.* 2002; 2:143-148.
- Bézanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torch M, Trotin F. *Plantes Medicinales des Régions Tempérées*. Paris. Maloine., 1990.
- Duke JA. *Handbook of Medicinal Herbs*. Florida. CRC Press, 1986.
- Jaén J. *Manual de Medicina Popular Canaria*. Tenerife. Centro de la Cultura Popular Canaria., 1992.
- Jaén J. *Hierbas Medicinales de Canarias*. Gran Canaria. Caja de Canarias, 1993.
- Montes M, Wilkomirski T. *Medicina Tradicional Chilena*. Concepción. Universidad de La Concepción., 1985.
- Paris RR, Moyses H. *Precis de Matière Medicale*. Paris. Masson, 1971.
- Schmeda-Hirschmann G, Loyola JI, Sierra J, Retamal L, Rodríguez J.: Hypotensive Effect and Enzyme Inhibition Activity of Mapuche Medicinal Plant Extracts. *Phytother.Res.* 1992; 6:184-188.
- Fernández M, Nieto A. *Plantas Medicinales*. Pamplona. Eunsa, 1982.
- Kawashty SA, Gamal ED, Abdalla ME, Saleh NAM.: Flavonoids of *Plantago* Species in Egypt. *Biochem.System.Ecol.* 1994; 22:729-733.
- Mederos-Molina S.: Cultivo in Vitro De Ápices Caulinares De *Plantago Major* L. Llantén. *Proceedings II Jornadas Ibéricas de Plantas Medicinales, Aromáticas y de Aceites Esenciales*. Lisboa. Portugal 1991.
- Bruneton J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*. 2 ed. Acribia S.A. Zaragoza, 2001.
- Cabo-Torres J, Pardo P. *Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia*. Granada. Gráficas del Sur, 1974.
- Domínguez XA. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México. Limusa., 1973.
- Pezzuto JM, Che CT, McPherson DD, Zhu JP, Topcu G, Erdelmeier CA, Cordell GA.: DNA As an Affinity Probe Useful in the Detection and Isolation of Biologically Active Natural Compounds. *J.Nat.Prod.* 1991; 54:1522-1530.
- Anand VK, Heberlein GT.: Crown-Gall Tumorigenesis in Potato Tumor Tissue. *Am.J.Bot.* 1977; 64:153-158.
- Ferrigni NR, Putnam JE, Anderson B, Jacobsen LB, Nichols DE, Moore DS, McLaughlin JL.: Modification and Evaluation of the Potato Disc Assay and Antitumor Screening of Euphorbiaceae Seeds. *J.Nat.Prod.* 1982; 45:679-686.
- Galsky AG, Wilsey JP, Powell RG.: Crow Gall Tumor Bioassay. A Possible Aid in the Detection of Compounds With Antitumoral Activity. *Plant Physiol.* 1980; 65:184-185.
- Monks A, Scudero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M.: Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse of Panel

- of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J.Nat.Cancer Inst.* 1991; 83:757-766.
20. Gálvez M, Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Cortés F, Ayuso MJ.: Cytotoxic Effect of *Plantago* spp. on Cancer Cell Lines. *J Ethnopharmacol.* 2003; 88:125-130.
21. Ryu SY, Choi SU, Lee CO, Lee SH, Ahn JW, Zee OP.: Antitumor Activity of Some Phenolic Components in Plants. *Arch.Pharmacol.Res.* 1994; 17:42-44.
22. Le Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Habrioux G.: Estrogenic and Antiproliferative Activities on MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Flavonoids. *Cancer Lett.* 1998; 130:209-216.
23. Post JFM, Varma RS.: Growth Inhibitory Effects of Bioflavonoids and Related Compounds on Human Leukemic CEM-C1 and CEM-C7 Cells. *Cancer Lett.* 1992; 67:207-213.
24. Chowdhury AR, Sharma S, Madal S, Goswami A, Mukhopadhyay S, Majumder HK.: Luteolin, an Emerging Anti-Cancer Flavonoid, Poisons Eukaryotic DNA Topoisomerase I-. *Biochem J.* 2002; 366:653-661.
25. Lee DH, Cho IG, Park MS, Kim KN, Chang IM, Mar WC.: Studies on the Possible Mechanism of Protective Activity Against α -Amanitina Poisoning by Aucubin. *Archives of Pharmacal Research* 2001; 24(1):55-63.