

# Activación de macrófagos y linfocitos in vitro por extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*

Reyes S. Tamez G.\* , Cristina Rodríguez P.\* , Patricia Tamez G.\* , Richard J. Weber\*\* , Ricardo Gómez F.\* , César L. Calderón\*\*\*

Las plantas han contribuido en forma significativa al desarrollo de la humanidad. Su utilización como fuente de alimentos, como materia prima para la elaboración de herramientas, o como fuente para la obtención de energía, han contribuido de manera importante a la supervivencia y florecimiento de muchas culturas. De igual manera, las civilizaciones a través de las generaciones, han empleado una gran variedad de plantas en forma empírica, para combatir sus problemas de salud. Para que una planta sea considerada como medicinal, es necesario que por lo menos una de sus partes presente un efecto terapéutico. En México, existen aproximadamente 30,000 especies de plantas, de las cuales 3,000 se han reportado que poseen propiedades medicinales. Hasta ahora, menos de 5,000 especies de plantas medicinales han sido investigadas fitoquímicamente, y una fracción aún menor ha sido sometida a estudios biológicos o farmacológicos. En las últimas tres décadas ha renacido el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria agrícola, alimentaria y farmacéutica; ésta última, en su búsqueda de medicamentos nuevos y más eficientes. Aproximadamente el 30% de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o se han modelado a partir de productos vegetales. El ejemplo más conocido y ampliamente utilizado de un medicamento de origen vegetal es la aspirina (ácido acetilsalicílico), la cual fue diseñada en 1897, a partir de la salicilina, sustancia aislada de la corteza del árbol *Salix alba*. Otros ejemplos de fármacos de origen vegetal incluyen: la quinina (antimalárico), la quinidina (antiarrítmico), la vinblastina (antineoplásico), y la vincristina (antileucémico).



Fig. 1. *Plantago major*.

Los objetivos del presente estudio se enfocaron hacia el desarrollo y aplicación de bioensayos, para la búsqueda de actividad inmunorreguladora en extractos de plantas de México, en particular de la hierba *Plantago major* (figura 1), conocida popularmente como llantén. *Plantago major* es una hierba común que se desarrolla en climas templados y cálidos del mundo y que generalmente crece junto con el zacate. A esta planta se le han atribuido propiedades astringentes, analgésicas, antiinflamatorias, antiulcerantes, antihistamínicas, antiparasíticas, antivirales, antibacterianas, expectorantes, y antitumorales.<sup>1,2,3</sup> Sin embargo, no se han realizado estudios de inmunomodulación mediada por *Plantago*

\* Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

\*\* Department of Biomedical and Therapeutic Sciences, University of Illinois College of Medicine at Peoria, IL, USA.

\*\*\* Department of Pharmacology, University of Illinois College of Medicine at Peoria, USA.

*major*, y por lo tanto no se conoce el (los) mecanismo (s) de acción de los productos activos de esta planta que pudieran estar asociados a sus efectos antitumorales y antiinfecciosos.

Por otro lado, los macrófagos juegan un papel central en la modulación de la inmunidad humoral y celular en contra de enfermedades infecciosas y del cáncer. Las funciones inmunomoduladoras del macrófago dependen de su activación por señales de sensibilización, provistas principalmente por citocinas, tales como el interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y por señales de activación como el lipopolisacárido (LPS).<sup>4</sup> Los macrófagos activados producen mediadores de citotoxicidad, tales como el óxido nítrico y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), los cuales protegen al organismo en contra del desarrollo de infecciones y tumores.<sup>5-7</sup> Por su parte, los linfocitos T responden al reto antigénico, mediante la proliferación y expansión de las clonas de linfocitos específicos de antígeno, para amplificar las respuestas inmunes. Se puede estudiar la actividad funcional de las células T mediante el uso de mitógenos policlonales como la concanavalina A (Con A) y de la fitohemaglutinina (PHA), los cuales se unen a ciertos residuos de azúcares presentes en las glucoproteínas de superficie en estas células, incluyendo el receptor de antígenos de las células T y la proteína CD3, estimulando la respuesta proliferativa de los linfocitos T.

El presente estudio se diseñó para evaluar los efectos *in vitro* de extractos metanólicos de hojas de *Plantago major* en las funciones de los macrófagos peritoneales y linfocitos de timo de rata. Se encontró que los extractos de hojas de *P. major* activaron la producción de óxido nítrico y TNF- $\alpha$  por los macrófagos, y potenciaron la proliferación de linfocitos T mediada por Con A.

## Material y métodos

### Reactivos, medios de cultivo y línea celular

Los medios RPMI 1640 y AIM-V se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* serotipo O128:B12, el dimetilsulfóxido, el metanol, el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la concanavalina A (Con A), y el colorante de Giemsa se compraron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La actinomicina D se obtuvo de ICN Pharma-

ceuticals (Aurora, OH). La línea celular del fibrosarcoma murino L929 se compró de la American Type Culture Collection (clona CCL 1, Rickville, MD).

### Preparación del extracto

Las hojas de *Plantago major* (figura 2) se obtuvieron en forma de un polvo fino de la Compañía M.E. Cody Products, Inc. (Westwood, NJ). Este material (400 g) se trató por 16 h con 500 ml de metanol a temperatura ambiente. Después, el extracto se filtró, y se combinó con acetona hasta observar un precipitado blanquecino. Este precipitado se secó bajo vacío en un concentrador speed vac (Savant Instruments Inc., Hicksville, N.Y.), se disolvió en 15 ml de agua de-ionizada, y la suspensión se centrifugó a 2000 r.p.m. por 10 minutos. Posteriormente, se concentró la fracción acuosa hasta sequedad utilizando un concentrador speed vac. Los sólidos resultantes se pesaron (3.0 g) y se denominaron PM<sub>1</sub>.



Fig. 2. Hojas de *Plantago major*.

### Purificación de la fracción PM<sub>1</sub> y PM<sub>2</sub>

Se condicionó una columna Si(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub> (United Chemical Technologies, Inc.) con 2 g de capacidad, mediante elución con 5 ml de metanol, seguido por elución con 5 ml de agua de-ionizada. PM<sub>1</sub> (200 mg) se disolvieron en 10 ml de agua de-ionizada, luego se añadieron a la columna ya condicionada, y se eluyó, como se explicó anteriormente. La fracción de elución se concentró a sequedad en un concentrador speed vac (se recuperaron 70 mg de la fracción PM<sub>1</sub>). El material adherido a la columna se eluyó con 15 ml de metanol. Esta fracción también se concentró, como se explicó anteriormente (se recuperaron 28 mg), y se denominó PM<sub>2</sub>. Estas fracciones se disolvieron en PBS, y se

filtraron antes de usarse. Las preparaciones PM<sub>1</sub> y PM<sub>2</sub> estaban libres de endotoxina a un límite de detección de 0.5 ng/ml, en la prueba de los amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA).

### *Animales*

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (200-220g) (Harlan Sprague-Dawley Inc., Indianapolis, IN). Estas se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y estrés a 24°C, bajo un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad, y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

### *Preparación de cultivos de macrófagos*

Los macrófagos peritoneales se colectaron mediante lavado de la cavidad peritoneal con medio RPMI 1640 frío inmediatamente después de matar al animal, como se ha descrito previamente.<sup>8,9</sup> La suspensión celular se lavó una vez con este medio, y se resuspendió y ajustó a una concentración de  $1.7 \times 10^6$  células/ml en medio AIM-V, (debido a que se ha reportado que el suero por sí solo puede activar al macrófago,<sup>10</sup> el medio de cultivo (RPMI 1640) se cambió en esta etapa por el medio AIM-V, el cual no contiene suero, pero facilita el cultivo celular.<sup>11</sup> Cien microlitros de esta suspensión se incubaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) por 2 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las células no adherentes se removieron, y las células adherentes (aproximadamente 70% de las células, o  $1 \times 10^6$  células/ml) se incubaron por 16 h en 100 µl de medio AIM-V, en presencia o ausencia de varias concentraciones de las fracciones de PM. Al terminar la incubación, las monocapas de células se lavaron dos veces con AIM-V. Mediante la tinción de Giemsa, comprobamos que estas monocapas celulares contienen al menos 95% de macrófagos.

### *Determinación de la producción de óxido nítrico*

Se utilizó la acumulación de nitritos en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos, como un indicador de la producción de óxido nítrico por células residentes o activadas. Los macrófagos sin tratar o tratados con fracciones de PM, se incubaron durante tres días en triplicados, a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en

un volumen final de 200 µl por pozo. Al terminar el período de incubación, se obtuvieron los sobrenadantes y se determinaron los niveles de nitritos mediante el uso del reactivo de Griess, como se ha reportado previamente,<sup>8</sup> utilizando NaNO<sub>2</sub> como estándar. Las densidades ópticas se determinaron a 540 nm, en un lector de microplacas (Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA).

### *Determinación de la producción de TNF-α*

Se determinó la producción de TNF-α por macrófagos mediante un bioensayo, utilizando el método de lisis de las células L929. Para este estudio, monocapas de macrófagos sin tratar o tratadas con fracciones de PM<sub>1</sub> y PM<sub>2</sub>, se incubaron en triplicados a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, en un volumen final de 200 µl en medio AIM-V por 4 h, después de lo cual se obtuvieron los sobrenadantes y se mantuvieron a -80°C hasta su uso. Se determinaron los niveles de TNF-α en dichos sobrenadantes mediante el bioensayo con células L929, como se ha descrito anteriormente.<sup>8</sup> Este bioensayo se realizó en medio RPMI 1640 completo, conteniendo 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, y 0.5% de solución de antibióticos, en presencia de 1 µg/ml de actinomicina D, y utilizando diluciones seriadas de 1:3 de estos sobrenadantes. Se utilizó TNF-α recombinante murino (NCI Biological Resources Branch, Rockville, MD, lote 88/532) como estándar. Después de 24 h de incubación, se determinó la viabilidad de las células L929, mediante una técnica colorimétrica, utilizando la sal de tetrazolio MTT a la concentración final de 0.5 mg/ml, e incubando por 1.5 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar el período de incubación, los sobrenadantes se removieron, y los cristales de formazán se disolvieron en dimetilsulfóxido. Las densidades ópticas se determinaron en un lector de microplacas (Molecular Devices Corporation) a 540 nm. Los niveles de TNF-α (U/ml) representan el inverso de la dilución del sobrenadante que induce el 50% de citotoxicidad.

### *Efecto del LPS en la activación de los macrófagos*

Se utilizó LPS como control positivo de activación de macrófagos. Se prepararon cultivos de macrófagos residentes peritoneales, como se describió anteriormente, y se incubaron por 16 h con LPS (1 a 1000

ng/ml), después de lo cual las monocapas de macrófagos se lavaron dos veces, y se incubaron por un período adicional de tres días. Al terminar el período de incubación, se obtuvieron los sobrenadantes y se determinaron los niveles de nitritos, como se explicó anteriormente.

#### *Preparación de cultivos de linfocitos T y prueba de proliferación*

El timo se removió inmediatamente después de matar al animal. Se prepararon suspensiones unicelulares, mediante la maceración de este órgano en RPMI 1640. La suspensión resultante se lavó tres veces en este medio, y se resuspendió en medio AIM-V a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml. La proliferación de células T se determinó mediante la incorporación de timidina tritiada, como se ha reportado previamente.<sup>12</sup> Las suspensiones tímicas (100  $\mu$ l) se colocaron en triplicados en microplacas de cultivo de fondo redondo (Becton Dickinson) conteniendo 100  $\mu$ l de medio AIM-V (control sin estimular) o 100  $\mu$ l de Con A, a dosis submáximas y máximas de 0.625, 1.25, y 2.5  $\mu$ g/ml. Después de incubar por 44 h a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> se añadió metiltimidina tritiada (6.7 Ci/mmol, ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA) (1  $\mu$ Ci/10 ml/pozo), y los cultivos se incubaron por 4 h adicionales. Estos entonces se colectaron con un colector celular semiautomático (Tomtec, Orange, CT), y se midió la radioactividad incorporada en las células por medio de espectrofotometría de centelleo líquido, utilizando un contador de centelleo líquido Microbeta Plus (modelo 1450, Wallac Oy, Turku, Finland), con una eficiencia para el tritio del 35%. Se utilizaron las respuestas proliferativas de los linfocitos tímicos, a dosis submáximas y máximas de Con A, para los análisis estadísticos.

#### *Análisis estadísticos*

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de determinaciones por triplicado, a partir de un experimento representativo. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba *t* de Student y el análisis de varianza.

## Resultados

### *Efecto del LPS en la activación de los macrófagos*

Como se muestra en la figura 3, se observó un incremento significativo ( $P < 0.001$ ), dependiente de la dosis, en la producción de óxido nítrico por los macrófagos tratados con LPS. El LPS se utilizó como control positivo para la activación de los macrófagos.

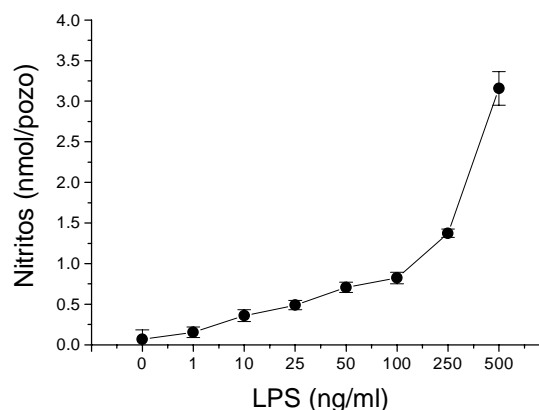


Fig. 3. Efecto del LPS en la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales. Los macrófagos peritoneales de rata se trataron con LPS (1 a 500 ng/ml) por 16 h, se lavaron, y se incubaron por tres días adicionales. La producción de óxido nítrico se determinó como se explicó en Material y métodos. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar de los niveles de nitritos de determinaciones por triplicado.

### *Inducción de óxido nítrico y TNF- $\alpha$ por fracciones del *Plantago major**

La precipitación con acetona de un extracto metanólico de *P. major* produjo una fracción hidrosoluble llamada PM<sub>1</sub> (0.7% de recuperación). Esta fracción activó a los macrófagos para producir óxido nítrico (figura 4a) y TNF- $\alpha$  (figura 4b), lo cual resultó depender de la dosis de la fracción PM<sub>1</sub>. La fracción PM<sub>1</sub>, a las concentraciones de 50, 100, 250, y 500  $\mu$ g/ml, indujo incrementos significativos ( $P < 0.001$ ) de  $4.4 \pm 1$ ,  $6 \pm 1$ ,  $12 \pm 0.4$ , y  $18 \pm 0.4$  veces, respectivamente, en la producción de óxido nítrico por los macrófagos, al compararse con el control sin tratar (figura 4a). Esta fracción, también estimuló en forma significativa ( $P < 0.001$ ) la producción de TNF- $\alpha$  ( $621 \pm 31$ ,  $721 \pm 36$ ,  $727 \pm 36$ , y  $1056$

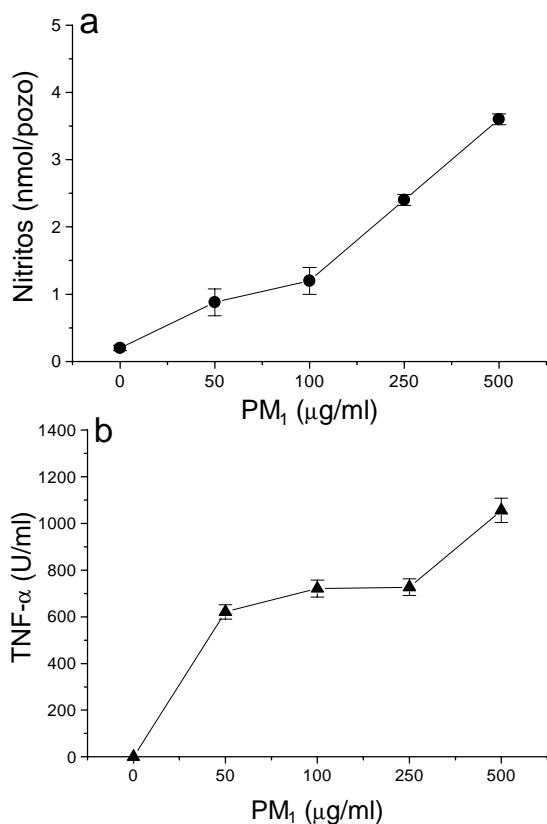


Fig. 4 Efecto de la fracción PM<sub>1</sub> en la producción de óxido nítrico y TNF-a por macrófagos. Los macrófagos peritoneales de rata se trataron con PM<sub>1</sub> (50-500 mg/ml) durante 16 h, se lavaron, y se incubaron por 4 h y 3 días adicionales para la determinación de los niveles de TNF-a y óxido nítrico, respectivamente. La acumulación de nitritos (a) y la producción de TNF-a (b) se determinaron como se explicó en Material y métodos. Los datos representan la media ± la desviación estándar de los niveles de nitritos y TNF-a de determinaciones por triplicado.

± 52 U/ml, respectivamente, a las concentraciones de PM<sub>1</sub> de 50, 100, 250, y 500 µg/ml, respectivamente) por los macrófagos (figura 4b). No se observó producción de TNF-α por macrófagos sin tratar.

La fracción PM<sub>1</sub> se purificó posteriormente mediante el método de extracción de fases (United Chemical Technologies, Inc.). Al finalizar la etapa de elución por percolación, el material adherido a la columna se eluyó con metanol. Este material se denominó PM<sub>2</sub>, y resultó ser más potente que la fracción PM<sub>1</sub> para activar macrófagos. Esta fracción, a las concentraciones de 50, 100, 250, y 500 µg/ml, indujo incrementos significativos ( $P < 0.001$ ) de  $11 \pm 0.66$ ,  $14 \pm 0.84$ ,  $36 \pm 2.16$ , y  $46 \pm 2.76$ , respectivamente, en la producción de óxido nítrico por

los macrófagos, al compararse con el control sin tratar (figura 5a). La fracción PM<sub>2</sub> también se asoció a incrementos significativos ( $P < 0.001$ ) en la producción de TNF-α ( $1000 \pm 60$ ,  $1150 \pm 69$ ,  $1200 \pm 72$ , y  $1550 \pm 93$  U/ml, a las concentraciones de PM<sub>2</sub> de 50, 100, 250, y 500 µg/ml, respectivamente) por los macrófagos (figura 5b). No se observó producción de TNF-α por macrófagos sin tratar.

*Linfoproliferación mediada por PM<sub>2</sub>*

La fracción PM<sub>2</sub> indujo incrementos significativos ( $P < 0.001$ ) de 1.8 a 2 veces en la proliferación de

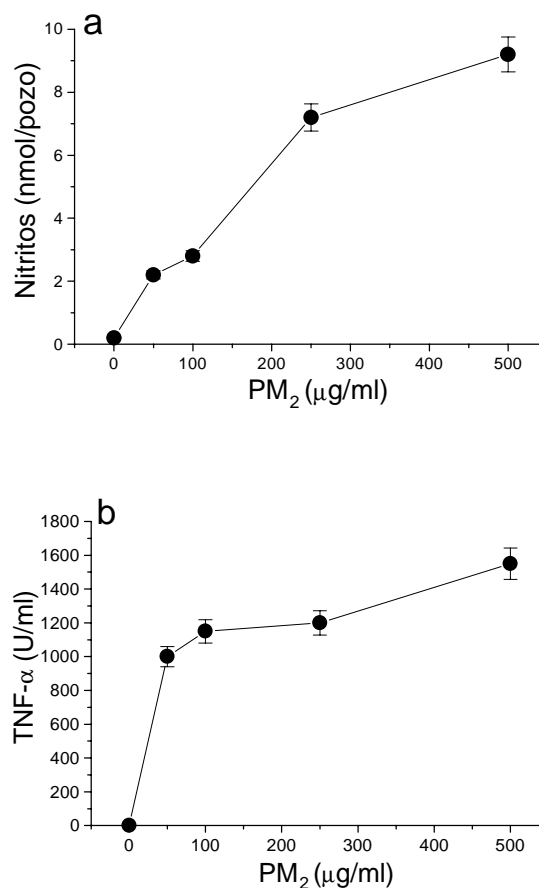


Fig. 5. Efecto de la fracción PM<sub>2</sub> en la producción de óxido nítrico y TNF-a por macrófagos. Los macrófagos peritoneales de rata se trataron con PM<sub>1</sub> (50-500 mg/ml) durante 16 h, se lavaron, y se incubaron por 4 h y tres días adicionales para la determinación de los niveles de TNF-a y óxido nítrico, respectivamente. La acumulación de nitritos (a) y la producción de TNF-a (b) se determinaron como se explicó en Material y métodos. Los datos representan la media ± la desviación estándar de los niveles de nitritos y TNF-α, de determinaciones por triplicado.

linfocitos de timo, al compararse con el control sin tratar (figura 6a), y significativamente ( $P < 0.001$ ) incrementó de tres a doce veces la proliferación de linfocitos de timo, mediada por Con A, al compararse con el efecto individual de la Con A (figura 6b).

## Discusión

En el presente estudio, se encontró que extractos

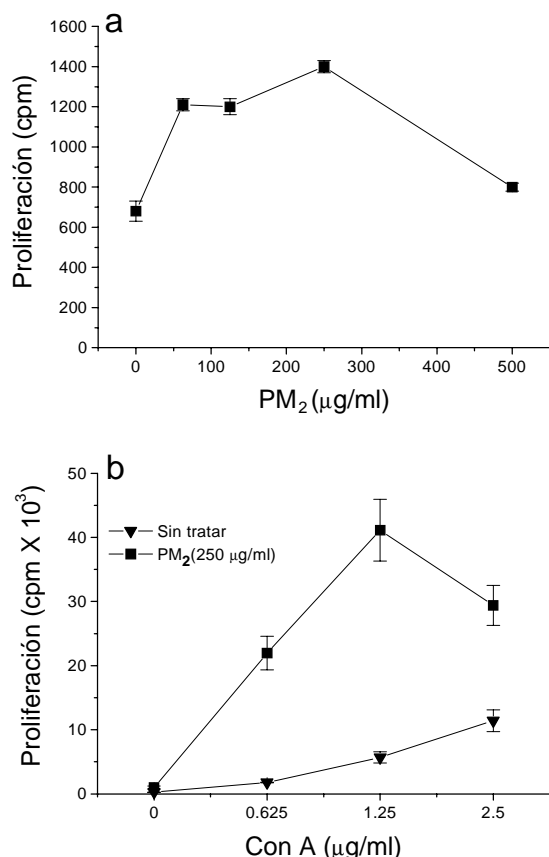


Fig. 6. Efecto de la fracción PM<sub>2</sub> en la proliferación de linfocitos T. Los linfocitos de timo se trataron con la fracción PM<sub>2</sub> (100-500 mg/ml) (a), y con la fracción PM<sub>2</sub> (250 mg/ml) + Con A (0.625 a 2.5 mg/ml) (b) por 48 h. Al terminar este período de incubación, se determinó la incorporación de timidina tritiada como se explicó en Material y métodos. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar de determinaciones por triplicado.

metanólicos de *P. major* activaron la producción de óxido nítrico y TNF- $\alpha$  por los macrófagos, y potenciaron la proliferación de linfocitos de timo mediada por Con A. Esto podría indicar que dichos extractos actúan como una señal de activación de macrófagos, como la provista por el LPS. Las bio-

moléculas activas de los extractos de *Plantago major* podrían entonces tener la capacidad de actuar *in vivo* en forma directa sobre los macrófagos e inducir su activación, o bien, podrían interactuar con señales de preactivación de macrófagos, como la del interferón-gamma, para incrementar su potencial inmunoterapéutico en contra de enfermedades infecciosas y del cáncer.<sup>5-7</sup> La activación de los macrófagos induce la producción de mediadores de citotoxicidad en contra de parásitos intracelulares,<sup>5,13</sup> y células tumorales;<sup>6,7</sup> estos factores citotóxicos incluyen a los intermediarios reactivos del oxígeno, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, y los intermediarios reactivos del nitrógeno, tales como el óxido nítrico. Los primeros se han asociado con función antimicrobiana del macrófago en contra de la infección por *Toxoplasma*, *Tripanosoma*, *Leishmania*, *Candida* y *Micobacterias*.<sup>14,15</sup> Los intermediarios reactivos del oxígeno provocan la peroxidación de las cadenas de ácidos grasos insaturados, lo cual altera su funcionamiento e inactiva proteínas.<sup>16</sup> Por otro lado, el óxido nítrico juega un papel relevante en contra de infecciones intramacrófagicas causadas por especies de *Cryptococcus*, *Schistosoma*, *Leishmania*, *Francisella*, *Listeria*, y *Micobacterias*.<sup>17-22</sup> El óxido nítrico inhibe la producción de trifosfato de adenosina<sup>23</sup> y la síntesis del ácido deoxirribonucleico (ADN).<sup>24</sup>

Por otro lado, se demostró que la concanavalina A potenció la proliferación de linfocitos de timo estimulados con extractos de *P. major*. Esto podría sugerir que este mitógeno estimula la expresión de receptores de superficie, para alguna biomolécula activa de dichos extractos, lo cual facilitaría la mitosis de los linfocitos. La estimulación de la proliferación de linfocitos por los extractos de *P. major* puede a su vez, inducir la producción de citocinas por estas células, entre las cuales se encuentra el interferón-gamma, que como se mencionó anteriormente, es un activador de macrófagos. De esta forma, los extractos de *P. major* pueden generar un circuito de activación de las funciones de los macrófagos y linfocitos en contra de patógenos microbianos y células tumorales.

*Plantago major* se ha utilizado ampliamente para tratar diversas condiciones médicas, que incluyen enfermedades de la piel, la digestión y la reproducción, la circulación, el cáncer, el dolor, y las enfermedades infecciosas.<sup>1-3,25-27</sup> Algunas de las moléculas activas de *P. major* incluyen a un glicósido de la

clase de los monoterpenos (iridoide) llamado aucubina, el alantión, la apigenina, la baicaleína, el ácido linoleico, el ácido oleanólico y el sorbitol. Debido a sus cualidades antitóxicas, antiinflamatorias y expectorantes, esta planta ha sido de mucha utilidad en enfermedades pulmonares, en particular las causadas por el tabaquismo. Además, las hojas de *P. major* son ricas en beta-caroteno (vitamina A) y calcio, pero también contienen ácido ascórbico (vitamina C).

Las hojas frescas de esta planta (figura 2) se maceran y se aplican en heridas para prevenir o curar infecciones. A este respecto, se ha reportado que un polisacárido del tipo pectina, aislado de dichas hojas, previene la infección por *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B en ratones singénicos, con inmunodeficiencia combinada severa (SCID).<sup>26</sup> Dicho polisacárido también promueve la cicatrización, al parecer, debido a su capacidad de activar al complemento.<sup>27</sup> Además, se demostró que inyecciones subcutáneas, del fluido intracelular de esta planta, poseen actividad profiláctica en contra del desarrollo de tumores mamarios en ratones de la variedad C3H. La frecuencia de formación de tumores fue del 93.3% en los controles y del 18.2% en los ratones tratados.<sup>13</sup>

Sin embargo, no se ha elucidado su(s) mecanismo (s) de acción. La presencia de agentes inmunopotenciadores en esta planta podría explicar su acción profiláctica en contra del desarrollo de tumores mamarios en ratones.<sup>3</sup> Además, muchos patógenos pueden ser eliminados (antes de que causen el malestar asociado con la enfermedad) mediante la estimulación de respuestas inmunes no específicas. Se conoce que los extractos de plantas retardan el desarrollo de enfermedades o pueden curarlas. Algunos de estos extractos estimulan la inmunidad humoral<sup>28,29</sup> y celular<sup>30,32</sup> en contra de virus,<sup>33,34</sup> bacterias,<sup>35,36</sup> hongos<sup>37,38</sup> y protozoarios,<sup>39,40</sup> y cáncer.<sup>41,42</sup>

La potenciación de parámetros inmunológicos, inducida por extractos de plantas, podría ser relevante en la clínica como adyuvantes en la terapia de enfermedades como las infecciones virales crónicas, la tuberculosis y el SIDA, y el cáncer.

## Resumen

*Plantago major*, también conocida como llantén, es una hierba de jardín que se encuentra principalmente

en zonas templadas y cálidas de todo el mundo. Las hojas de esta planta se utilizan en forma tradicional como medicina astringente, diurética, expectorante, analgésica, antiinflamatoria, antireumática, anticáncer, y para el tratamiento de infecciones virales y parasitarias. Sin embargo, no se ha elucidado su mecanismo (s) de acción. Nosotros encontramos que extractos metanólicos, libres de endotoxina, de hojas de *Plantago major*, a concentraciones de 50, 100, 250, y 500 µg/ml, se asociaron con incrementos de  $4.4 \pm 1$ ,  $6 \pm 1$ ,  $12 \pm 0.4$ , y  $18 \pm 0.4$  veces en la producción de óxido nítrico (NO), e incrementos en la producción de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) ( $621 \pm 31$ ,  $721 \pm 36$ ,  $727 \pm 36$ , y  $1056 \pm 52$  U/ml, con respecto a las concentraciones antes mencionadas) por macrófagos peritoneales de rata, en ausencia de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) o lipopolisacárido (LPS). No se detectó producción de NO y TNF- $\alpha$  por macrófagos sin tratar. Además, los extractos de *Plantago major* potenciaron la proliferación de linfocitos de timo de rata estimulados con concanavalina A (Con A) (incrementos de 3 a 12 veces) en una forma dependiente de la concentración de *Plantago major*, al compararse con el efecto individual de Con A. La potenciación de parámetros inmunológicos inducida por metabolitos secundarios de extractos de plantas, podría ser relevante en la clínica como adyuvantes en la terapia de enfermedades como las infecciones virales crónicas, la tuberculosis y el SIDA, y el cáncer.

**Palabras clave:** *Plantago major*, inmunopotenciación, linfocitos, macrófagos.

## Abstract

*Plantago major*, also known as llantén, is a weed found in temperate zones worldwide. *Plantago major's* leaves have been associated with various biological properties ranging from antiinflammatory, antimicrobial and antitumor to wound healing. However, its mechanism (s) of action remains to be elucidated. We found that endotoxin-free methanolic extracts from *Plantago major* leaves, at doses of 50, 100, 250, and 500 mg/ml, were associated with  $4.4 \pm 1$ ,  $6 \pm 1$ ,  $12 \pm 0.4$ , and  $18 \pm 0.4$ -fold increases of nitric oxide (NO) production, and increased tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) production ( $621 \pm 31$ ,  $721 \pm 36$ ,  $727 \pm 36$ , and  $1056 \pm 52$  U/ml, respectively) by rat peritoneal macro-

phages, in the absence of interferon-gamma or lipopolysaccharide. NO and TNF- $\alpha$  production by untreated macrophages was negligible. In addition, *Plantago major* extracts potentiated concanavalin A (Con A)-induced lymphoproliferation (3- to 12-fold increases) in a dose-dependent fashion, compared with the effect of Con A alone. The regulation of immune parameters induced by plant extracts may be clinically relevant in numerous diseases including chronic viral infections, tuberculosis, AIDS, and cancer.

**Keywords:** *Plantago major*, immunopotential, lymphocytes, macrophages.

## Bibliografía

- Kadans, J.M. (1970) Encyclopedia of Medicinal Herbs. Arco Publishing Company Inc, New York, p. 165.
- Franca, F., Lago, E.L., and Marsden, P.D. (1996) Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania* (Viannia) braziliensis in an endemic area of Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Rio de Janeiro) 29, 229-232.
- Lithander, A. (1992) Intracellular fluid of waybread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. *Tumour Biology* 13, 138-141.
- Meltzer, M.S., Occhionero, M., and Ruco, L.P. (1982) Macrophage activation for tumor cytotoxicity: regulatory mechanisms for induction and control of cytotoxic activity. *Federation Proceedings* 41, 2198-2205.
- Nathan, C.F., and Hibbs J.B. Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology* 3, 665-70.
- Hibbs, J.B. Jr., Taintor, R.R. Vavrin, Z., and Rachlin, E.M. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical Biophysical Research Communications* 157, 87-94.
- Flescher, E.; P. Gonen & Y. Keisari. (1984). Oxidative burst-dependent tumoricidal and tumorostatic activities of paraffin oil-elicited mouse macrophages. *Journal of the National Cancer Institute* 72, 1341-47.
- Gómez-Flores, R., Rodríguez-Padilla, C., Mehta, R.T., Galan-Wong, L., Mendoza-Gamboa, E., and Tamez-Guerra, R. (1997) Nitric oxide and TNF- $\alpha$  production by murine peritoneal macrophages activated with a novel 20-kDa protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* parasporal bodies. *Journal of Immunology* 158, 3796-3799.
- Gómez-Flores, R., Tamez-Guerra, R., Tucker, S.D., and Mehta, R.T. (1997) Bidirectional effects of IFN- $\gamma$  on growth of *Mycobacterium avium* complex in murine peritoneal macrophages. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 17, 331-336.
- Chen, T., Scott, E., and Morrison, D.C. (1994) Differential effects of serum on lipopolysaccharide receptor-directed macrophage activation for nitric oxide production. *Immunology Letters* 40, 179-187.
- Kaldjian, E.P., Chen, G.H., and Cease, K.B. (1992) Enhancement of lymphocyte proliferation assays by use of serum-free medium. *Journal of Immunological Methods* 147, 189-195.
- Gómez-Flores, R., and Weber, R.J. (1999) Inhibition of IL-2 production and downregulation of IL-2 and transferrin receptors on rat splenic lymphocytes following PAG morphine administration: a role in NK and T cell suppression. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 19, 627-632.
- Nathan, C. F. (1983). Macrophage microbicidal mechanisms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 620-30.
- Gangadharam, P. R. J. & C.K. Edwards III. (1984). Release of superoxide anion from resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*, *American Reviews on Respiratory Diseases* 130, 834-38.
- Gangadharam, P. R. J. & P.F. Pratt. (1984). Susceptibility of *Mycobacterium intracellulare* to hydrogen peroxide, *American Reviews on Respiratory Diseases* 130, 309-11.
- Vladimirov, Y. A.; V.I. Olenev; T.B. Suslova & Z.P. Cheremisina. (1980). Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Advances in Lipids Research* 17, 173-249.
- Fortier, A. H.; T. Polsinelli; S.J. Green & C.A. Nancy. (1992). Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: identification of cytokines, effector cells, and effector



- moleculas. *Infection and Immunity* 60, 817-25.
18. Becjerman, K. P.; H.W. Rogers; J.A. Corbett; R.D. Schreiber, M.L. McDaniel & E.R. Unanue. (1993). Release of nitric oxide during T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunology* 150, 888-95.
  19. Denis, M. (1991). Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates, *Cellular Immunology* 132, 150-7.
  20. Denis, M. (1991). Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates, *Journal of Leukocyte Biology* 49, 380-7.
  21. Alspaugh, J. A. & D.L. Granger. (1991). Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infection and Immunity* 59, 2291-6.
  22. Mauel, J.; A. Ransijn & Y. Buchmuller-Rouiller. (1991). Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *Journal of Leukocyte Biology* 49, 73-82.
  23. Ghafourifar, P.; U. Bringold; S.D. Klein & C. Richter. (2001). Mitochondrial Nitric Oxide Synthase, Oxidative Stress and Apoptosis. *Biological Signals and Receptors* 10, 57-65.
  24. Kwon, N. S.; D.J. Stuehr & C.F. Nathan. (1991). Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage derived nitric oxide. *Journal of Experimental Medicine* 174, 761-7.
  25. Samuelsen A.B. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 1-21.
  26. Hetland, G.; A.B. Samuelsen; M. Lovik; B.S. Paulsen; I.S. Aaberge; E.C. Groeng & T.E. Michaelsen. (2000). Protective effect of *Plantago major* L. Pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 52, 348-55.
  27. Michaelsen, T.E.; A. Gilje; A.B. Samuelsen; K. Hogasen & B.S. Paulsen (2000). Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology* 52, 483-90.
  28. Rehman, J.; J.M. Dillow; S.M. Carter; J. Chou; B. Le B. & A.S. Maisel. 1999. Increased production of antigen-specific immunoglobulins G and M following *in vivo* treatment with the medicinal plants *Echinacea angustifolia* and *Hydrastis canadensis*. *Immunol. Lett.* 68:391-395.
  29. Upadhyay, S.; S. Dhawan; S. Garg & G.P. Talwar. 1992. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. *Int. J. Immunopharmacol.* 14:1187-93.
  30. Kim, H.M.; C.H. Oh & C.K. Chung. 1999. Activation of inducible nitric oxide synthase by *Taraxacum officinale* in mouse peritoneal macrophages. *Gen. Pharmacol.* 32:683-688.
  31. Coeugnet, E.G. & E. Elek. 1987. Immunomodulation with *Viscum album* and *Echinacea purpurea* extracts. *Onkologie* 10:27-33.
  32. Tan, R.X.; W.F. Zheng & H.Q. Tang. 1998. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med.* 64:295-302.
  33. Calixto, J.B.; A.R. Santos; V. Cechinel Filho & R.A. Yunes. 1998. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 18:225-58.
  34. Houghton, P.J. 1996. Compounds with anti-HIV activity from plants. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:601-604.
  35. Boyanova, L. & G. Neshev. 1999. Inhibitory effect of rose oil products on *Helicobacter pylori* growth *in vitro*: preliminary report. *J. Med. Microbiol.* 48:705-706.
  36. Cáceres, A.; L. Fletes; L. Aguilar; O. Ramírez; L. Figueroa; A.M. Taracena & B. Samayoa. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *J. Ethnopharmacol.* 38:31-38.
  37. Ali, M.I.; N.M. Shalaby; M.H. Elgamal & A.S. Mousa. 1999. Antifungal effects of different plant extracts and their major components of selected aloe species. *Phytother. Res.* 13:401-407.

38. Matos, O.C.; J. Baeta; M.J. Silva & C. Pinto Ricardo. 1999. Sensitivity of *Fusarium* strains to *Chelidonium majus* L. extracts. *J. Ethnopharmacol.* 66:151-158.
39. Phillipson, J.D. & C.W. Wright. 1991. Medicinal plants in tropical medicine. 1. Medicinal plants against protozoal diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:18-21.
40. Sharma, P. & J.D. Sharma. 1998. Plants showing antiplasmodial activity—from crude extracts to isolated compounds. *Indian J. Malariol.* 35:57-110.
41. Wong, C.K.; K.N. Leung; K.P. Fung & Y.M. Choy. 1994. Immunomodulatory and anti-tumour polysaccharides from medicinal plants. *J. Int. Med. Res.* 22:299-312.
42. Chung, F.L. 1999. The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220:244-248).