

**Instituto Tecnológico de Costa Rica**

**Vicerrectoría de Investigación y Extensión**

**Dirección de Proyectos**

**Informe final de proyectos de investigación y extensión**

Optimización del protocolo de establecimiento de cultivos celulares de *Plantago major* (llantén) para la comprobación de la actividad cicatrizante de un producto farmacéutico y determinación efecto biológico contra la infección de *H. pylori* en modelos *in vitro*

**Investigadores:**

M.Sc. Giovanni Garro Monge, Escuela de Biología  
M.Sc. Karol Jiménez Quesada, Escuela de Biología  
M.Sc. Silvia Castro Piedra, Escuela de Biología  
PhD. Virginia Montero Campos, Escuela de Biología

**2021**

## Índice

Código y Título del proyecto .....	3
Autores y direcciones .....	3
Resumen.....	4
Palabras clave.....	4
Introducción .....	5
Metodología .....	8
Resultados .....	13
Discusión y conclusiones .....	47
Recomendaciones.....	50
Agradecimientos .....	50
Referencias.....	50
Cumplimiento de objetivos .....	55
Observaciones generales y recomendaciones.....	59

## 1. Código y Título del proyecto

**Título:** Optimización del protocolo de establecimiento de cultivos celulares de *Plantago major* (llantén) para la comprobación de la actividad cicatrizante de un producto farmacéutico y determinación efecto biológico contra la infección de *H. pylori* en modelos *in vitro*

**Código:** 1510044

## 2. Autores y direcciones

<b>Nombre y apellidos</b>	<b>Escuela</b>	<b>Nombramiento</b>	<b>Jornada (h/semana)</b>	<b>Meses en el proyecto</b>
Giovanni Garro Monge (Coordinador)	Escuela de Biología	indefinido	8 h	24
Karol Jiménez Quesada	Escuela de Biología	definido	16 h	24
Silvia Castro Piedra	Escuela de Biología	definido	8 h	24
Virginia Montero Campos	Escuela de Biología	indefinido	8 h	24

### 3. Resumen

A especies del género *Plantago*, entre ellas *Plantago major*, se le han atribuido propiedades medicinales debido a la diversidad de compuestos presentes en sus células. Está comprobado que metabolitos aislados o bien, extractos crudos de esta especie, pueden ayudar a la regeneración de heridas de piel, estimular la proliferación celular, disminuir la inflamación y que tienen actividad antibacteriana. Por lo anterior, en el presente proyecto se buscó optimizar el establecimiento de cultivos celulares de llantén, para elaborar, analizar y comparar la capacidad regenerativa de diferentes extractos de esta planta en un modelo *in vitro* e *in vivo*. Para ello, se evaluaron ocho tratamientos para la inducción de la dediferenciación celular a partir de hojas *in vitro*, y así comprobar el potencial de los cultivos celulares en procesos de cicatrización. El medio de cultivo seleccionado se denominó como M27.7 50S (Sales y vitaminas M&S 50%, 2,5 mg/l de TDZ, sacaros 3% m/v, pH 7). Se probaron diferentes concentraciones de diferentes muestras de extractos de *P. major*: plantas tomadas de campo, plantas cultivadas *in vitro* y además callo friable para evaluar cual era el efecto sobre la migración celular *in vitro*. Posteriormente, luego de seleccionar el tratamiento más eficiente *in vitro*, se elaboró una crema a base de esta planta para analizar el efecto durante las diferentes fases de regeneración en un modelo murino. En el caso de los resultados del modelo de regeneración *in vivo* parece ser que el extracto de llantén ejerce una acción antiinflamatoria lo que favorece el incremento en la tasa de regeneración. De esta manera se concluye que la especie *P. major* podría tener un efecto positivo en la fase aguda del proceso de regeneración tisular en piel.

**4. Palabras clave:** callo friable, cultivo celular, formulación, histología, regeneración de piel.

## 5. Introducción

En numerosos estudios se ha planteado el gran potencial en el aprovechamiento de las propiedades que ofrecen las plantas medicinales, partiendo de la base del estudio de los metabolitos secundarios presentes en las mismas, para prevenir enfermedades o bien tratar diferentes condiciones de salud.

La especie vegetal *Plantago major*, perteneciente a la familia Plantaginaceae, es una planta herbácea, con una altura aproximada de 15 cm, con hojas en forma de roseta ovaladas hasta elípticas; presenta inflorescencias tipo espigas en colores del café al verde que dan origen a gran cantidad de semillas diminutas, alrededor de 20 mil por planta, contenidas en cápsulas (Samuelsen, 2000). En la semilla se ha determinado la presencia de diferentes metabolitos secundarios como triterpenos, iridoideos, aceites fijos, alcaloides monoterpénicos y carbohidratos. En el follaje de la planta, se encuentran alcaloides como la plantagonina, flavonoides como luteolinas, hispidulinas, baicaleina, plantaginina y homoplantaginina, algunos de los cuales tienen propiedades antioxidantes; los glicósidos iridoideos como la aucubina, se consideran responsables tanto de la capacidad antiinflamatoria como de la acción antiespasmolítica (Blanco *et al*, 2008, Garro y Alvarenga, 2009).

En la medicina tradicional, las hojas de la planta *Plantago major* han sido utilizadas como tratamiento de lesiones en la piel en diferentes países (Zubair *et al*, 2016). Adicionalmente, se ha utilizado como tratamiento del cáncer, la diabetes, infecciones urinarias, infecciones virales, entre otras. Lo anterior porque se le ha evidenciado actividad antitumoral, antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana, analgésica, antiespasmódica, antiviral y hepatoprotector (Harput *et al*, 2012).

El cáncer gástrico es la segunda causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo (738 000 muertes, 9,7% del total), y a su vez el cuarto cáncer más común en el mundo, detrás de los cánceres de pulmón, mama y colorrectal. Cerca del 70% de los casos (714 000 casos) ocurren en países en desarrollo (467 000 en hombres, 247 000 en mujeres). Las estimaciones sitúan las tasas de mortalidad más altas en Asia Oriental; altas tasas de mortalidad también están presentes en ambos sexos en América Central (Ferlay *et al*, 2010). Se ha visto que el factor de riesgo más importante para el cáncer gástrico es la presencia de *H. pylori* ya que se asocia a inflamación gástrica crónica inducida por la bacteria (Brawner *et al*, 2014). De hecho, los estudios epidemiológicos han determinado que aproximadamente el 75% del riesgo total para el cáncer gástrico es atribuible a la infección por *H. pylori* (Cao y Yu, 2015). Interesantemente, extractos metanólicos de *P. major*, han sido estudiados por sus efectos contra bacterias patógenas (Abd *et al*, 2012). Entonces, tomando en cuenta que Costa Rica ocupa el noveno lugar en la incidencia de cáncer gástrico per cápita, se considera de alta importancia explotar la actividad citoprotectora de la mucosa gástrica atribuida a diferentes compuestos como flavonoides, terpenoides y alcaloides, presente dentro de extractos de *P. major*, los cuales tienen un efecto regenerador y antiinflamatorio, sumado a una potencial actividad antibacteriana, por lo que resulta necesario datos científicos que verifiquen tales propiedades.

Adicional a lo anterior, desde antes de Cristo, médicos griegos utilizaron esta planta para la regeneración de heridas en piel, generadas por distintas causas (Abd *et al*, 2012; Zubair *et al*, 2016), costumbre que se ha mantenido a través de los siglos. Su uso se justifica por las propiedades antiinflamatorias, promitóticas e inmunomoduladoras que favorecen estos procesos. Se usan principalmente los extractos de hojas de estas plantas para dicho fin (Samuelsen, 2000). Sin embargo, a pesar de que se ha venido estudiando los mecanismos implicados, existen muchas variables que dificultan la reproducibilidad de los resultados como lo son el origen de la planta, la metodología de elaboración del extracto y también la concentración utilizada. Por lo que es necesario estandarizar las condiciones para determinar el efecto biológico sobre las heridas.

Por otro lado, a pesar de la evidencia de casos, algunas plantas medicinales son mal llamadas malezas, debido a su crecimiento espontáneo. Debido a lo anterior, y por el potencial de esta planta, la

conservación de *P. major* y otras tantas especies curativas, se ve amenazada por diversos factores relacionados con el uso del suelo en actividades del área agrícola. Por lo anterior, su aprovechamiento a nivel de investigación se ha dado gracias a la Ingeniería de Tejidos Vegetales, permitiendo la utilización y conservación del germoplasma en condiciones controladas, como alternativas que favorezcan el valor agregado de actividad farmacológica asociado a esta planta (Blanco *et al*, 2008 y Garro y Alvarenga, 2009).

Para el periodo 2014-2015, se ejecutó con éxito el proyecto “Establecimiento de cultivos celulares de *Plantago major* (llantén) para la detección y cuantificación de compuestos con actividad cicatrizante y antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*” adscrito a la VIE, con el cual se logró establecer cultivos celulares *in vitro* de *P. major* o llantén, con potencial cicatrizante y antimicrobiano comprobado. La etapa actual que se trabaja en conjunto con Laboratorios Lisan, incluye como objetivo la formulación de la crema cicatrizante a partir de extractos crudos de llantén, aunque previamente deben concluirse las estandarizaciones pertinentes al proceso de cuantificación de ácidos cinámicos, en conjunto con la optimización de los protocolos de establecimiento de cultivos celulares. Aunado a los objetivos anteriores, la consecución de las pruebas de actividad antimicrobiana alcanza también su segunda fase, en la cual se pretendía establecer un modelo de infección de *H. pylori in vitro* para la comprobación de las hipótesis correspondientes. Sin embargo, por varios motivos presentados en informes de avance, este último objetivo se varió y se cambió por probar el potencial cicatrizante de la crema elaborada a base de esta planta en un modelo *in vivo*.

Es debido a todo lo anterior, que se considera importante el hacer un aprovechamiento de esta planta, ya que la alta incidencia de lesiones en piel o bien cáncer, resulta de gran interés contar con un producto con evidencia científica, de origen natural, de alta calidad, producido de manera sustentable e idealmente orgánico que pueda ser una opción terapéutica eficaz.

De esta forma el proyecto se perfila como una clara aplicación de técnicas de Biotecnología vegetal y Aplicaciones Biomédicas, para la mejora de la calidad de vida. Así mismo, facilita articulación con otras unidades de investigación a nivel local (CIB, Química) y externo (Laboratorios LISAN), lo cual es básico para la obtención de resultados fiables, eficaces y de rigor científico.

El objetivo de la presente investigación fue optimizar el protocolo de establecimiento de cultivos celulares de *Plantago major* (llantén) para la comprobación de la actividad cicatrizante de un producto farmacéutico *in vivo* e *in vitro*.

## 6. Marco Teórico

La importancia de establecer y optimizar la inducción y mantenimiento del cultivo de callo de *P. major*, es justamente lo que permite que a posterior se pueda analizar a nivel fitoquímico el aprovechamiento industrial o clínico que tiene el extracto crudo de la línea celular bajo estudio. Esto gracias a la acumulación de metabolitos secundarios presentes en las células de callo. Por ejemplo, en especies de *Plantago* sp., estudios químicos describen la presencia de oligosacáridos, cumarinas, iridiósidos, flavonoides, aminoácidos, iones inorgánicos y microelementos, compuestos volátiles y ésteres de glucósido de ácido cafeico (Fons *et al*, 1999, Ru *et al*, 2008).

Los dos principales ésteres de glucósido de ácido cafeico que corresponden al verbascósido y al plantamosido han mostrado actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatorias y antitumoral; estas sustancias han sido estudiadas mediante técnicas de cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Fons *et al*, 1999, Ru *et al*, 2008, Suomi, 2001). Por otra parte, el primer iriodósido en ser descrito en esta planta fue el catalpol, pero actualmente se conocen más de 33 monómeros de iridoiglicósidos, la mayoría importantes componentes en hierbas. Estos han sido separados e identificados como dihidrocatalpol, acetilcatalpol, leonurida, aucubina, melitósidos, cerebrosidos, glutinosidos, entre otros. Para el catalpol, también se describen propiedades hipoglucémicas, diuréticas y laxantes (Ru *et al*, 2008; Samuelsen, 2000).

Según ensayos realizados de actividad farmacológica, la aucubina ha demostrado tener una capacidad para inducir la apoptosis en células humanas cancerosas de pulmón, lo que genera que se le considere como un potencial agente antitumoral (Rakotondramasy, 2010). Si bien este es un estudio acerca de la acción farmacológica de un sólo compuesto en específico, en términos de ensayos de otras propiedades, como la cicatrización de heridas, se considera que dicha actividad no necesariamente puede atribuirse a un solo compuesto, sino que el efecto puede también ser debido a la interacción de varios compuestos que actúan de manera sinérgica (Samuelsen, 2000).

De acuerdo a lo anterior, varios de los compuestos aislados de *P. major* pueden ayudar a la regeneración de heridas; por ejemplo, el plantamajosido y acteosido, que además tienen actividades antibacterianas; algunos flavonoides y los derivados del ácido cafeico presentan capacidad antioxidante, erradicando los radicales libres; algunos polisacáridos pécticos se han descrito como eficaces contra las úlceras en ratas y por tener actividades inmunomoduladoras; por último, la cadena larga de alcoholes primarios saturados, que están presentes en la cera de la hoja, estimula al proceso de repitelización de heridas superficiales. Sin embargo, las hojas también contienen compuestos con actividad antiinflamatoria, por ejemplo: plantamajosido, baicaleína, hispidulina, aucubino, ácido ursólico y ácido oleanólico (Samuelsen, 2000, Zhong *et al*, 2012).

Por otro lado, estudios concretos sobre efecto antibacteriano de compuestos de *P. major*, utilizando el método de difusión de disco con discos de agar nutritivo, contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, compararon el efecto de una crema formulada a partir de hojas de esta especie con el de los antibióticos sulfadiazina de plata, gentamicina y tetraciclina. Los resultados mostraron que en una concentración de 20 mg de sólidos por cada gramo de base hidrófila confirman el efecto inhibitorio, con una efectividad estadísticamente igual a la de la sulfadiazina y gentamicina, y ligeramente inferior a la de la tetraciclina (Pelaéz y Herencia 2006). En otros estudios también se ha descrito su efecto contra *Staphylococcus aureus* (Kharma y Hassawi, 2006).

La bacteria de interés en este proyecto, *Helicobacter pylori*, es una bacteria Gram negativa, curvada y espiral (Claros *et al*, 2007), que representa un problema de salud pública a escala mundial dado que puede evadir la respuesta inmune del ser humano y permanecer durante toda la vida de quien la hospeda, sin producir enfermedad. Pero, en condiciones no bien establecidas en algunas personas

provoca diferentes patologías como gastritis, úlceras y cáncer gástrico. El problema se incrementa ante el panorama de que pocos trabajos en el mundo explican el por qué este microorganismo ha sido encontrado en agua de consumo (Montero *et al*, 2010).

Un contraste positivo ante lo explicado anteriormente es que, en un estudio realizado en 2007, se confirmó que existe una actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Plantago major* sobre cepas de *Helicobacter pylori*, lo que podría deberse a la presencia de un aglicón de la aucubina llamado aucubigenina liberado por una glucosidasa (Claros *et al*, 2007). El argumento anterior fortalece la tesis de que es posible generar un impacto farmacéutico si se trabaja esta planta medicinal como una opción para el tratamiento de pacientes con cuadros clínicos relacionados con la presencia de la bacteria en el organismo, principalmente con cáncer gástrico, por lo que se confirmaría su potencial uso como antimicrobiano.

De acuerdo con los resultados generados en la I etapa del proyecto, el estudio que ha realizado el Departamento de Investigación y Desarrollo de Laboratorios Lisan, ha demostrado que los marcadores químicos aucubina y verbascósido no son los apropiados para el análisis de *P. major*, ya que estos compuestos se degradan rápidamente en los extractos. Gracias a estos hallazgos, a partir de enero del 2016 I+D de Lisan, trabaja en el desarrollo de un método de ensayo basado en la hidrólisis ácida para la cuantificación de ácidos cinámicos totales. Por otra parte, se comprobó que los extractos producidos a partir de *Plantago major*, estimulan la proliferación y migración celular de las células de la dermis. Sin embargo, es necesario analizar la respuesta sistémica, utilizando organismos vivos. Por otro lado, los resultados de actividad antimicrobiana mostraron sensibilidad en la mayoría de los extractos, sin embargo, los resultados encontrados con los extractos provenientes de callo aún no son concluyentes, por lo que se continuó con la comprobación de actividad antimicrobiana *in vitro*.

## 7. Metodología

### OE1. Optimizar el sistema de callogénesis en *P. major* para la obtención de compuestos bioactivos

La semilla, requerida para la introducción *in vitro*, fue suministrada por Laboratorios Lisan, a partir de su material de campo. Las semillas fueron trasladadas a temperatura ambiente al CIB, y almacenadas a 4°C. El protocolo de introducción fue el mismo empleado en la I etapa del proyecto, según las condiciones descritas por Garro y Alvarenga (2009). Una vez germinadas las semillas *in vitro* se trabajó con cultivo de ápices de acuerdo con el protocolo descrito por estos mismos autores.

A partir de las plántulas de llantén *in vitro* se extrajeron segmentos de hoja para la inducción de callogénesis somática, con el haz en contacto con el medio de cultivo. El protocolo completo para la inducción de crecimiento de células indiferenciadas (callo), fue desarrollado en la I etapa del proyecto e incluía dos medios de cultivo M27 y M28. Entre la I y II etapa de este proyecto, existió un año (2016) sin actividades financiadas, sin embargo, se inició con la optimización de los cultivos celulares y se determinó que los medios de cultivo debían ser ajustados a un pH de 7 (M27.7 y M28.7), para así evitar la oxidación prematura de los callos.

- Tratamientos de optimización

Para esta nueva etapa, la optimización de los medios de cultivo de callos previamente establecidos: M27.7 (M&S 100%, 2,5 mg/l de TDZ, maltosa 3% m/v, pH 7) y M28.7 (M&S 100%, 3 mg/l de TDZ, maltosa 3% m/v, pH 7), consistió en la comprobación del efecto de ocho variantes o subtratamientos

cambiando la fuente de carbono (sacarosa-maltosa) y empleando sales y vitaminas M&S (1962) al 100 y al 50%, dando lugar a los tratamientos M27.7 100S (100% sales y sacarosa), M27.7 50S (50% sales y sacarosa), M27.7 100M (100% sales y maltosa), M27.7 50M (50% sales y maltosa), M28.7 100S (100% sales y sacarosa), M28.7 50S (50% sales y sacarosa), M28.7 100M (100% sales y maltosa), M28.7 50M (50% sales y maltosa).

La evaluación de callogénesis se realizó a través de las variables cualitativas de color, en una clasificación de amarillo cremoso, amarillo verdoso, café amarillento y café; formación de callo en una clasificación del 1 al 5 donde 1 corresponde a explante muerto, 2 a explante vivo pero ausencia de callo, 3 a explante con inicio de formación de callo, 4 a 50% de formación de callo y 5 a 100% de formación de callo, y friabilidad en una escala de 0, 25, 50 y 100%. Para los tratamientos se estableció un n=25.

- Pruebas experimentales

Los cultivos celulares fueron analizados por línea, de acuerdo con la fecha de inducción. Se realizaron algunas pruebas experimentales como el uso de antioxidantes antes de la multiplicación de los cultivos celulares (1 g/l ácido ascórbico y cítrico, 10 min de exposición) o bien agregando cisteína (15 y 30 mg/l) al medio. Además, se realizó el pase de los cultivos de callo a medio líquido, tal y como se planteó en la propuesta, partiendo del uso del medio de cultivos M27.7 50S.

## **OE2. Elaborar, caracterizar y cuantificar extractos crudos de *P. major* a partir de callo y hojas secas**

La sección de Investigación y Desarrollo de Procesos (I+D) de Laboratorios Lisan S.A. trabajó en el desarrollo de una metodología para de detección de un marcador químico apropiado para extractos a base de *P. major*.

- Cuantificación de Verbascósidos

### **Estándar: VERBÁSCOSIDO**

Concentración: 0,4 mg/ml disolviendo y aforando con fase móvil (Metanol: Agua, 40:60)

### **Condiciones Cromatográficas:**

Fase Móvil: Metanol: agua (40:60)

Longitud de Onda: 303 nm

Volumen de Inyección: 20 µL

Flujo: 1.0 ml/min

Columna: X-BRIDGE C18, 5 µm, 4.6x150 mm

- Cuantificación de Iridoides con base en Aucubina

### **Estándar: AUCUBINA**

Concentración: 0,125 mg/ml disolviendo y aforando con fase móvil (Metanol: Agua, 2:98)

### **Condiciones Cromatográficas:**

Fase Móvil: Metanol: agua (2:98)

Longitud de Onda: 206 nm

Volumen de Inyección: 20 µL

Flujo: 1.0 ml/min

Columna: X-BRIDGE C18, 5 µm, 4.6x150 mm

- Método de extracción para la materia prima

Se tomaron 10 g de materia prima y se realizó la extracción mediante ultrasonido empleando etanol al 50% como medio para la extracción, por un tiempo de 60 min. Las condiciones instrumentales se mantuvieron para ambos analitos (verbascósido y aucubina) dado que las pruebas para los estándares fueron positivas. Las muestras se diluyeron tomando 4 ml y aforando a 10 ml con la fase móvil respectiva para cada caso.

- Pruebas para el análisis: Materia prima y extracciones alcohólicas

Con el fin de dar mayor estabilidad de los analitos en las muestras de llantén, se realizó la extracción de la materia prima empleando solamente etanol al 95% en sustitución de la mezcla etanol: agua (50:50). Se analizaron a la vez tres extractos que se encontraban almacenados como muestras retenidas identificados de la siguiente manera: Extracto # 1 llantén hojas verdes J V 9000 ml, extracto # 2 llantén hojas secas J V 1850 ml y extracto # 3 llantén hojas verdes RC 200 ml. Las condiciones instrumentales se mantuvieron respecto a las pruebas anteriores.

#### Cuantificación de cinamatos con base en verbascósido

Inicialmente se inyectaron estándares aforados tanto en fase móvil como en metanol, para establecer el medio que generaba mayor estabilidad.

#### Cuantificación de iridoides con base en aucubina

Se realizó la inyección de estándares aforados tanto en fase móvil como en metanol, para determinar en el medio que genera mayor estabilidad al analito.

- Elaboración de extractos hidro-alcohólicos

Los extractos de *P. major* fueron elaborados en I+D Lisan, como se detalla a continuación:

Extracto 1 a partir de muestras invernadero: 25 g de hoja seca.

Extracto 2 a partir de muestras de campo: 25 g de hoja seca.

Extracto 3 a partir de hojas in vitro: 18 g de hoja seca.

Extracto 4 a partir de material liofilizado de callos: 7 g de liofilizado.

Todos los extractos se prepararon en una concentración de 10% p/v utilizando etanol al 95%. Estos extractos no fueron analizados debido al problema con la degradación de los marcadores que se evaluaron.

### **OE 3. Evaluar la actividad cicatrizante de extractos de *P. major* en líneas celulares**

Para la prueba de migración y proliferación celular “scratch wound healing”, se sembró fibroblastos murinos en una densidad de  $10^4$  cél/pozo en placas de 24 pozos y se incubaron con medio DMEM suplementado con 10% de SFB hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. En ese momento, se le realizó un rayado a cada pozo con la punta de una micropipeta, de manera que quedara una cruz en el centro. Luego, se realizaron lavados con PBS para eliminar restos de células levantadas por el proceso y se agregó DMEM con 5% de SFB como control y, además, se probaron las siguientes concentraciones: 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08% y 0,1% de cada uno de los extractos de *Plantago major*: de hoja de planta de campo, de hoja de planta *in vitro* y de callo. Para este ensayo, se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento o condición y adicionalmente, se repitió 3 veces.

Luego de agregar cada tratamiento, cada pozo fue fotografiado cada 4 horas con el fin de observar la migración celular a través de la herida inducida. Este proceso se llevó a cabo hasta que la superficie fue totalmente cubierta. El proceso de captura de imágenes se realizó de forma estandarizada con un microscopio invertido Olympus CKX31. Luego con el programa de procesamiento de imágenes Image J 1.8 K (National Institutes of Health, USA), se analizó el porcentaje de área cubierta por migración/proliferación de las células a las 24, 48 y 72 horas con los diferentes tratamientos. Los datos se analizaron con la prueba estadística ANOVA o bien Kruskal-Wallis, donde  $p \leq 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo, para esto se utilizó el programa Minitab versión 18 (State College, PA).

**OE4. Evaluar la actividad cicatrizante de extractos de *P. major* in vivo.** (Objetivo cambiado según informe de avance enviado en octubre, 2019)

Los ensayos se llevaron a cabo en el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica (UCR), ubicado en Vásquez de Coronado, San José, Costa Rica. Se trabajó con tres grupos de animales, donde todas eran hembras entre 5 y 6 semanas de nacidas de la cepa CD-1 del bioterio del Instituto. El primer y segundo grupo consistieron de 12 animales cada uno. El tercer grupo, por su parte, estuvo conformado por 6 animales. El primer grupo se utilizó para aplicar el tratamiento control. Para este, se aplicó el gel con excipiente sobre la lesión. Por otro lado, el segundo grupo fue utilizado para aplicar el gel elaborado a partir de un extracto acuoso *Plantago major* (tomado de campo) al 4%. Los individuos del tercer grupo se utilizaron como controles negativos, por lo que no se les aplicó ningún tratamiento. De manera general, a los animales se les realizó la herida en el lomo, se les aplicó el tratamiento respectivo diariamente y se eutanasiaron con CO<sub>2</sub> al día 3, 7, 14 y 28 después de la inducción de la herida para realizar los diferentes análisis durante cada una de las diferentes fases del proceso de regeneración. Para todos los grupos se trabajó con un tamaño de muestra igual a 3 ( $n = 3$ ) para cada día.

- Elaboración de la herida

Primeramente, los animales se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) vía intraperitoneal. Seguidamente se les rasuró la zona del lomo y se delimitó con un marcador el área a lesionar ( $>1\text{cm}^2$ ). Seguidamente el tejido demarcado por la tapa fue removido con el fin de extraer epidermis y dermis, donde se intentó que el tejido muscular se dejara intacto.

- Aplicación de tratamientos

Justo después de realizar la herida en los animales, se aplicó de forma tópica cada uno de los siguientes tratamientos:

Tratamiento control: a los roedores de este grupo se les aplicó en horas de la mañana el gel solo con excipiente con ayuda de un hisopo estéril. Este procedimiento se repitió durante los 7 días posteriores a la realización de la herida.

Tratamiento experimental: a los roedores de este grupo se les aplicó de igual forma en horas de la mañana el gel con el extracto acuoso de *P. major* al 4%, con ayuda de un hisopo estéril. Este procedimiento se repitió durante los 7 días posteriores a la realización de la herida.

- Manejo de los animales de experimentación

Una vez realizada la lesión y aplicado el respectivo tratamiento, se colocó un cuadro de Tegaderm sobre la misma. Los animales se mantuvieron en jaulas de manera individual para que no se hirieran

entre ellos, donde cada jaula estaba debidamente rotulada. Las jaulas se limpiaron y se les cambió de burucha cada 2 días. Además, los animales se mantuvieron con alimento y agua ad libitum. Diariamente se revisaron los animales para analizar el comportamiento, los signos de dolor, posible infección de lesión u la detección de cualquier anomalía que pudiera afectar los resultados a obtener. Además, se analizó el dolor en los animales mediante el uso de la “Mouse Grimace Scale” propuesta por Langford et al (2010), la cual se basa en la asignación de un puntaje acorde al aspecto del rostro del animal. También, se utilizó como analgesia preventiva Tramadol (5 mg/kg) cada 8 h en los animales de los tres grupos, la cual se aplicó durante las primeras 48 a 72 h pos-lesión o en caso necesario, dependiendo de los signos de dolor que presentara el roedor, acorde a lo anteriormente mencionado.

- Eutanasia de los animales

Tres animales de cada grupo fueron eutanasiados en cámara de CO<sub>2</sub> los días 3, 7, 14 y 28 con el fin de analizar el tejido formado en cada una de las fases correspondientes a la regeneración de la piel.

- Determinación de la tasa de regeneración

Para determinar la tasa de regeneración todos los animales fueron fotografiados todos los días utilizando la misma distancia focal y junto a una regla métrica (usada para la calibración y estandarización del área de la lesión). Las fotos fueron analizadas con el programa Image J y el porcentaje de regeneración cutánea en la lesión se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Área en el día de herida inicial} - \text{área en el día postoperatorio}) \times 100}{(\text{Área en el día de herida inicial})}$$

Se tomó la herida como cicatrizada o regenerada cuando hubiera un 100% de cierre de la lesión.

- Análisis histológico de la lesión en los diferentes estadíos de regeneración

Después de cada eutanasia, se tomó una muestra de la piel de la zona de la herida, incluyendo una parte de la piel sana, y se colocó en una solución de formalina fosfatada a 4°C. A las 24 horas se realizó un cambio de formalina y la muestra se cortó en tiras de tal manera que esta incluyera tejido sano y fueron devueltas a la formalina fosfatada a 4°C. El tejido cortó en secciones de 4 o 5 mm de tal forma que abarcara la zona lesionada y los márgenes sanos. Posteriormente las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina para realizar una evaluación microscópica de la estructura de la piel formada. Las imágenes histológicas de las muestras se tomaron usando una cámara Evolution MP (Media Cybernetics, USA) y se analizaron con el programa Image Pro 6.3 (Media Cybernetics, USA). Además, para determinar de manera específica el incremento en colágeno (fibrosis) las muestras también se tiñeron con rojo sirio. Se cuantificó el porcentaje del tejido total relacionado con deposición de colágeno (fibrosis) a los 28 días, haciendo uso del programa computacional “ImageJ 1.51K” (National Institutes of Health, USA).

- Análisis estadístico

Para los estudios del proceso de regeneración tisular que involucraron medición de áreas, se aplicaron pruebas de Mann-Whitney. Lo anterior haciendo uso de los programas estadísticos IBM®SPSS Statistics® y GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Se reportarán los resultados como las medias ± el error estándar (SE).

**OE5. Evaluar la actividad biológica de los dos mejores extractos de *P. major* (objetivo 4) en un modelo de infección de *H. pylori in vitro***

Se trabajó con los extractos proporcionados por Laboratorios LISAN: Callo friable con una concentración de 10 % p/v, material de campo 10% p/v y material *in vitro* 10% p/v, los cuales fueron mantenidos a - 70 °C hasta el momento de su montaje en el laboratorio.

- Preparación de suspensiones bacterianas

Se trabajó con las cepas de *H. pylori* ATCC 700392 y 700824 para los ensayos de inhibición *in vitro*; se utilizó como controles positivos de la inhibición de las cepas sensibilizados de los antibióticos que son comúnmente usados contra la bacteria: amoxicilina de 10 mg y claritromicina 15 mg y como antibiótico no usado contra la bacteria tetraciclina de 30 mg. Asimismo se probó como control negativo de inhibición una cepa de la bacteria *Pseudomonas* sp. la cual es reconocida por ser sumamente sensible con el fin de determinar si los extractos podían tener algún efecto inhibitorio.

Para la bacteria *H. pylori* se preparó cada cepa transfiriendo colonias de un cultivo de 3 días de los microorganismos crecidos en agar sangre de caballo a tubos que contenían solución salina fisiológica estéril y ajustando la turbidez al estándar 0,5 de McFarland (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006). Esta turbidez corresponde a una suspensión de  $1,0 \times 10^8$  UFC / ml de *H. pylori*.

Para el caso de la cepa de *Pseudomonas* sp. un cultivo de 24 h en agar tripticasa y soya fue utilizado y ajustado su densidad para la prueba, al estándar de Mac Farlan de 0,5 descrito en el párrafo anterior.

- Montaje de los ensayos

Se prepararon discos para cada extracto en papel cartón absorbente con un diámetro de 5 mm de diámetro cortado con sacabocados, los cuales fueron esterilizados con calor húmedo por 15 min a 121 °C e impregnados de cada extracto; se dejó absorber completamente y luego se secaron en la incubadora, todo esto justo antes de cada montaje de los ensayos.

Para el ensayo de *H. pylori*, las suspensiones bacterianas se extendieron en placas de Agar Columbia (Oxoid®) complementadas con 5% de sangre caballo desfibrinada Lake horse (Oxoid®) siguiendo la técnica de esparcimiento de Kirby y Bawer dejando secar la extensión por 20 min (Cogo, 2010). Para el montaje de la prueba de sensibilidad para *Pseudomonas* sp se siguió la misma técnica solamente que se utilizó agar Columbia sin sangre.

Las placas se incubaron a 37°C bajo condiciones microaerofílicas con atmosfera modificada con anaerogen de Oxoid® y observadas después de 4 días. Las de *Pseudomonas* fueron incubadas en condiciones aeróbicas a 37°C por 24 h. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se probaron en dos ensayos diferentes.

## 8. Resultados

### OE1. Optimizar el sistema de callogénesis en *P. major* para la obtención de compuestos bioactivos

En el cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos en la inducción de callogénesis mediante los 8 tratamientos planteados, evaluando 25 explantes en total por tratamiento. En las figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se presentan fotografías de los tratamientos.

**Cuadro 1.** Clasificación de explantes según escala de calificación de variables para los tratamientos de formación de callos.

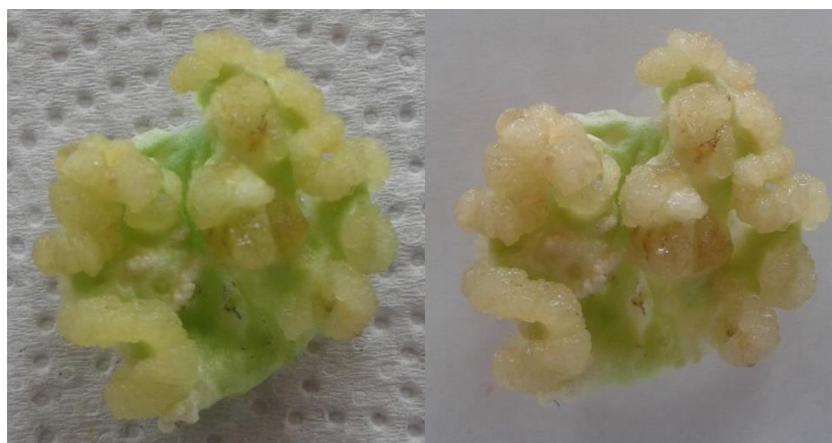
Variable	N° explantes por clasificación															
	M27.7 100S				M27.7 50S				M27.7 100M				M27.7 50M			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
<b>Formación de callo*</b>	5	20	0	0	3	9	13	0	5	20	0	0	6	19	0	0
<b>Color**</b>	0	5	2	18	0	6	0	19	4	0	0	21	0	3	0	22
<b>Friabilidad</b>	Sí		No	X	Sí	X	No		Sí	X	No		Sí		No	X

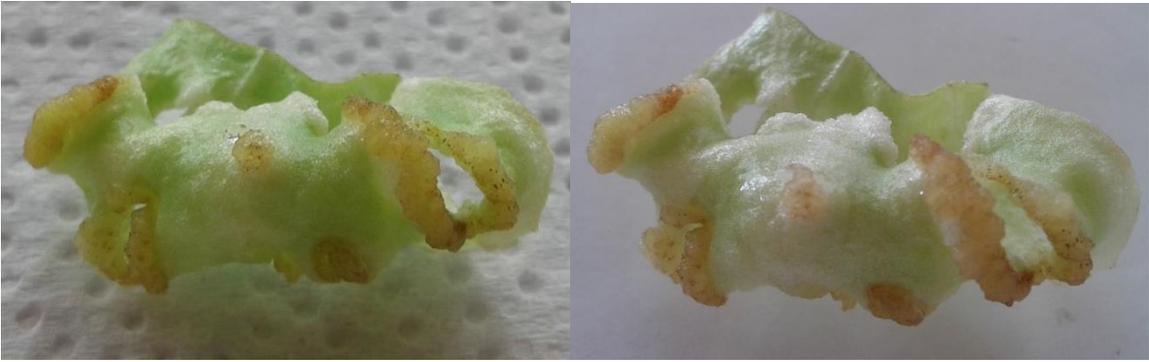
Variable	N° explantes por clasificación															
	M28.7 100S				M28.7 50S				M28.7 100M				M28.7 50M			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
<b>Formación de callo*</b>	0	3	5	17	0	25	0	0	5	20	0	0	5	20	0	0
<b>Color**</b>	8	17	0	0	0	0	0	25	0	5	2	18	0	2	3	20
<b>Friabilidad</b>	Sí		No	X	Sí		No	X	Sí		No	X	Sí		No	X

\*Formación de callo: 100% callo formado (3), 50% callo formado (2), 25% callo formado (1) y ausencia de callo (0).

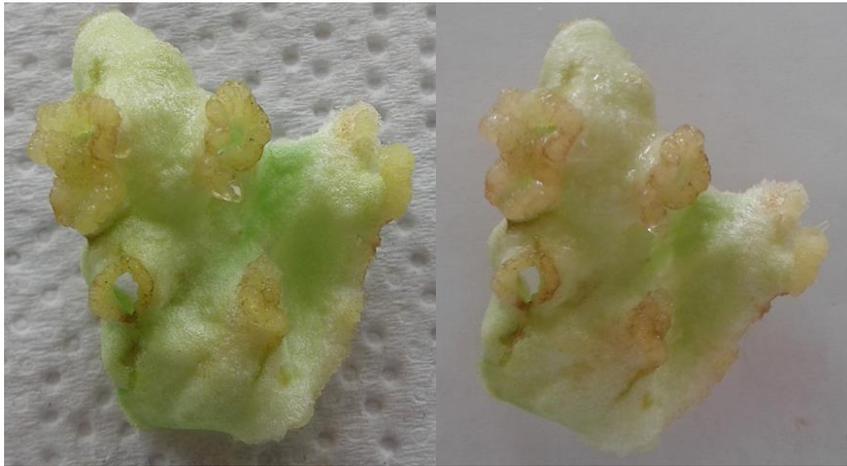
\*\*Color: amarillo cremoso (3), amarillo verdoso (2), café amarillento (1) y café/sin formación de callo (0).



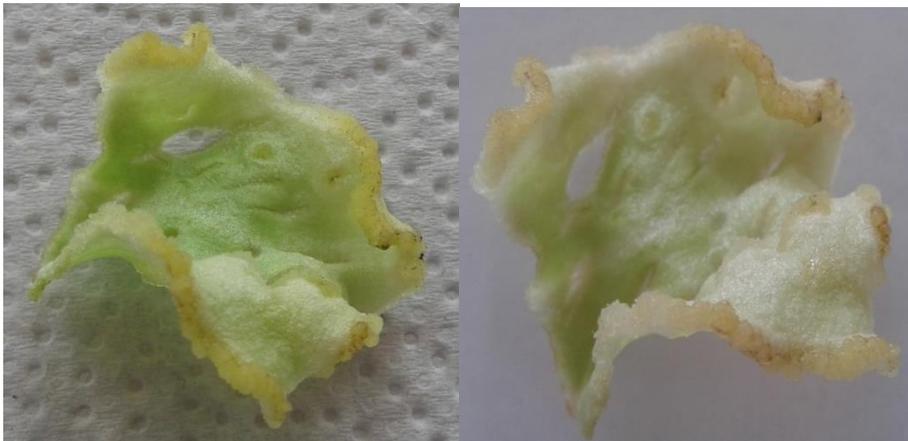
**Figura 1.** Inducción de callo de *P. major* en medio M27.7 50S



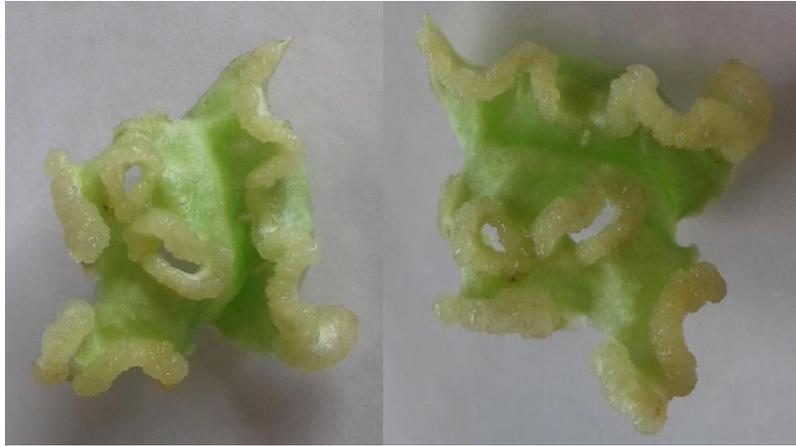
**Figura 2.** Inducción de callo de *P. major* en medio M27.7 100S



**Figura 3.** Inducción de callo de *P. major* en medio M27.7 50M



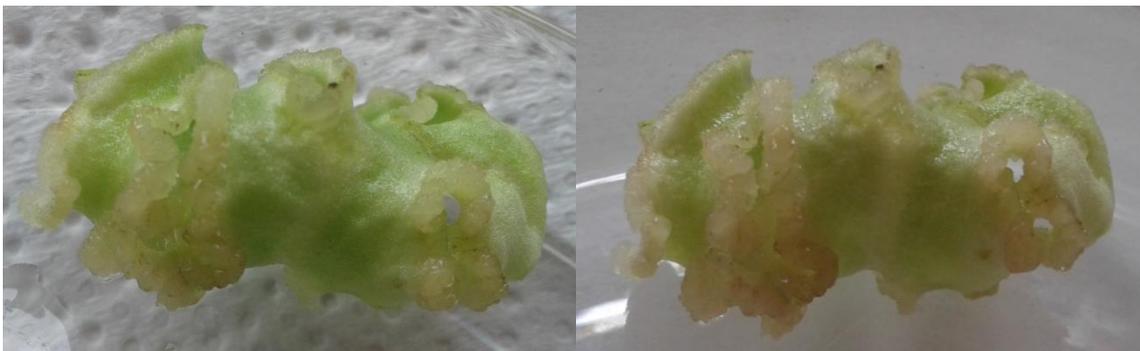
**Figura 4.** Inducción de callo de *P. major* en medio M27.7 100M



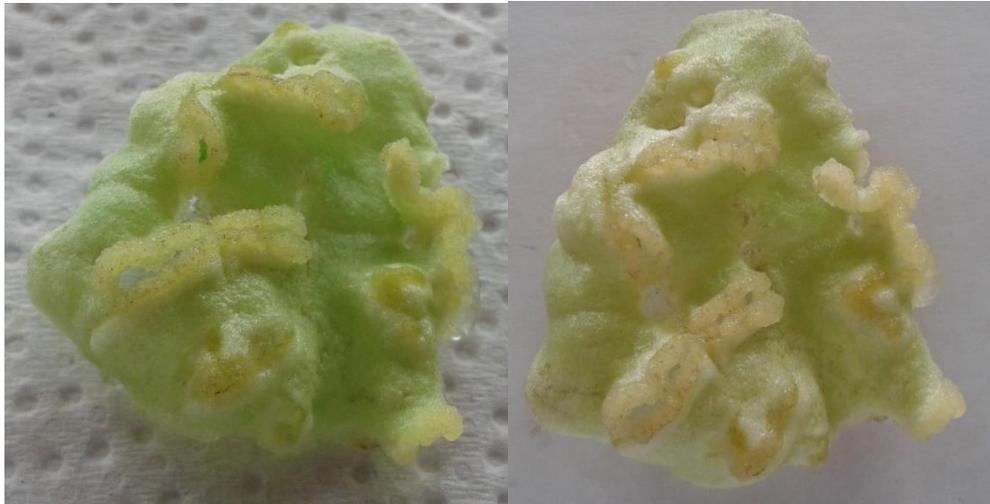
**Figura 5.** Inducción de callo de *P. major* en medio M28.7 50S



**Figura 6.** Inducción de callo de *P. major* en medio M28.7 100S

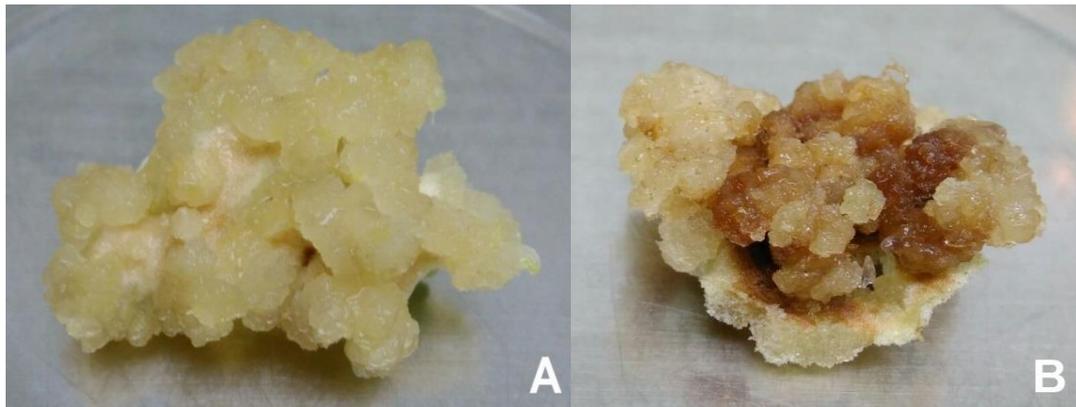


**Figura 7.** Inducción de callo de *P. major* en medio M28.7 50M



**Figura 8.** Inducción de callo de *P. major* en medio M28.7 100M

Otro factor que se consideró importante en cuanto a inducción de callo fue la edad de la planta y de la hoja utilizada. Con hojas maduras se hace referencia a hojas que ya se abrieron completamente y que se encuentran en la región intermedia de la planta, pero es importante destacar que se ha notado que las hojas más jóvenes (verde un poco más claro) tienen una mejor respuesta (figura 9).



**Figura 9.** Callo de *P. major* a las 6 semanas de inducción. A: L23-08 (Hoja joven), B: L16-08 (Hoja madura)

Todas las líneas celulares de llantén establecidas y evaluadas para la toma de decisiones y optimización de los protocolos, se detallan en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Líneas celulares de *P. major* establecidas en el proyecto y tratamientos utilizados para su inducción

Línea celular calogénica	Tratamientos	Observaciones
L02.03.17	M27.7 50S, M27.7 100S, M27.7 50M, M27.7 100M, M28.7 50S, M28.7 100S, M28.7 50M, M28.7 100M	Se determina que el mejor tratamiento en el M27.7 50S. Se realiza un subcultivo en este mismo medio con carbón activado.
L02.05.17	M27.7 50S	Se realiza un subcultivo en este mismo medio con carbón activado
L19.06.17	M27.7 50S	Se realiza un subcultivo en este mismo medio con carbón activado
L21.07.17	M27.7 50S	Se realizaron pruebas experimentales subcultivando el material en medio con cisteína (15 y 30 mg/l) y lavándolo previamente con soluciones antioxidantes (1 g/l ácido ascórbico y cítrico).
L03.08.17	M27.7 50S	-
L16.08.17	M27.7 50S	Prueba experimental utilizando hojas maduras. El material se oxidó y el ensayo se descartó.
L23.08.17	M27.7 50S	Prueba experimental utilizando hojas maduras. Se realiza un subcultivo en este mismo medio con carbón activado.
L06.09.17	M27.7 50S	Se realiza un subcultivo en este mismo medio suplementado con polivinilpirrolidona (PVP) en concentraciones de 1, 3 y 5 g/l, pero se generó oxidación del material
L18.10.17	M27.7 50S	Se realiza un subcultivo en este mismo medio.
L07.12.17	M27.7 50S	Se realiza un subcultivo en este mismo medio y se determina que los callos pueden mantenerse en subcultivo por máximo 8 semanas.
L17.01.18 L24.01.18 L04.04.18 L18.04.18 L24.04.18 L02.05.18 L03.05.18 L09.05.18 L16.05.18 L01.06.18 L26.06.18 L06.08.18 L14.08.18 L21.08.18 L22.08.18	M27.7 50S	Mediante la evaluación y seguimiento de los cultivos celulares semana a semana, desde la semana 4 y hasta la semana 8 desde su inducción, se observó que, aunque se mantenga el medio de cultivo (M27.7 50S), las condiciones de crecimiento y el empleo de hojas jóvenes después del primer subcultivo de las plántulas, cada línea de cultivo se comporta de manera distinta. En general, los cultivos celulares de llantén, alcanzan un máximo de 8 semanas de vida desde su inducción, sin posibilidad de multiplicaciones repetitivas exitosas.

En la figura 10 se presenta la apariencia de callos L19.06.17 subcultivados en medio M27.7 50S, a las seis semanas de crecimiento; mediante estas pruebas se determinó que los callos alcanzan su mayor nivel de desdiferenciación y crecimiento entre las 6 y 8 semanas de inducción o del primer subcultivo. No fue posible sostener el crecimiento de las líneas celulares por más de un subcultivo.



**Figura 10.** Callo de la línea L19-06 subcultivado en medio M27.7 con 6 semanas de crecimiento.

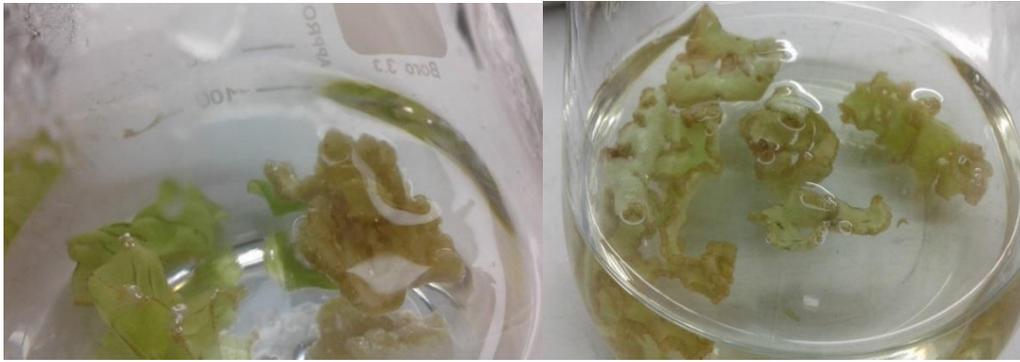
En la figura 11 se presentan los resultados del subcultivo de seis semanas de la línea L21.07.17 en presencia de sustancias antioxidantes.



**Figura 11.** Callos de *P. major* línea L19-06 a las dos semanas de ser multiplicados en medio M27.7 50S con 15g/ de cisteína.

A partir de agosto de 2018 y durante todo el período de ampliación del proyecto, las líneas celulares inducidas no fueron evaluadas, sino simplemente colectadas para su liofilización y posterior elaboración de extractos naturales.

Finalmente, se realizó una inducción de callogénesis en medio de cultivo líquido (M27.7 50S) (figura 12), también, a partir de la línea L09.05.18 se realizaron las pruebas de subcultivo en medio líquido con callos de 6 semanas, como se observa en la figura 13.



**Figura 12.** Prueba experimental para la inducción de callo de llantén en medio líquido, explantes de 4 semanas de inducidos.



**Figura 13.** Prueba experimental para el establecimiento de suspensión celular a partir de callo de llantén (explantes de 4 semanas).

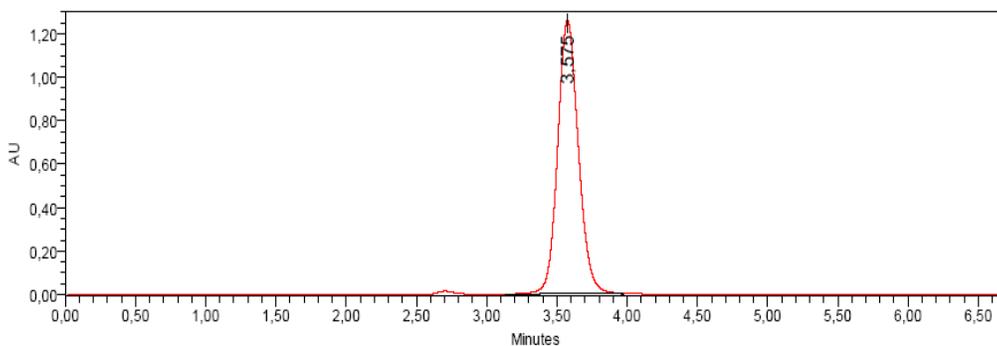
Como se verifica en las imágenes anteriores, a las 4 semanas desde su inducción en medio líquido, no fue posible observar una desdiferenciación celular a partir de los explantes de hoja utilizados, que den lugar a una conformación de callo (figura 12). Por su parte, el subcultivo de callos en medio líquido no dio lugar al establecimiento de suspensiones celulares, debido a la no-disgregación del material y la oxidación del mismo (figura 13).

## **OE2. Elaborar, caracterizar y cuantificar extractos crudos de *P. major* a partir de callo y hojas secas**

A continuación se presentan los resultados del análisis de estándares de posibles marcadores químicos:

- Cuantificación de Verbascósidos

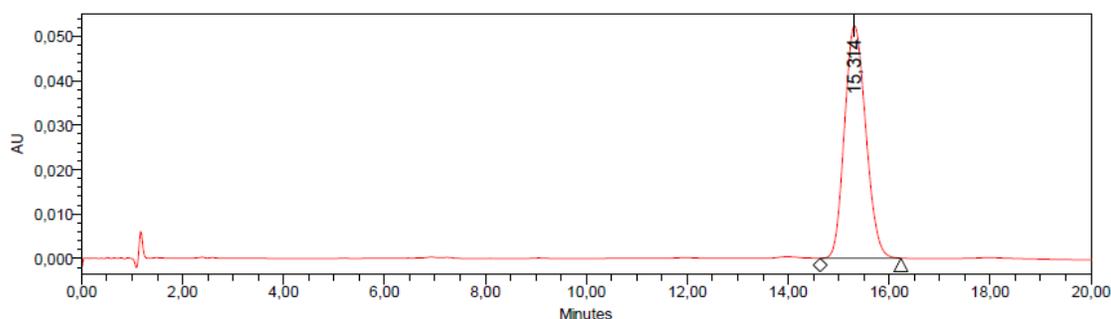
Se dio una buena resolución en el cromatograma y se tuvo una línea base estable además de una buena señal, como se observa en la figura 14.



**Figura 14.** Cromatograma obtenido con estándar de Verbascósido para la cuantificación de Cinamatos.

- Cuantificación de Iridoides con base en Aucubina

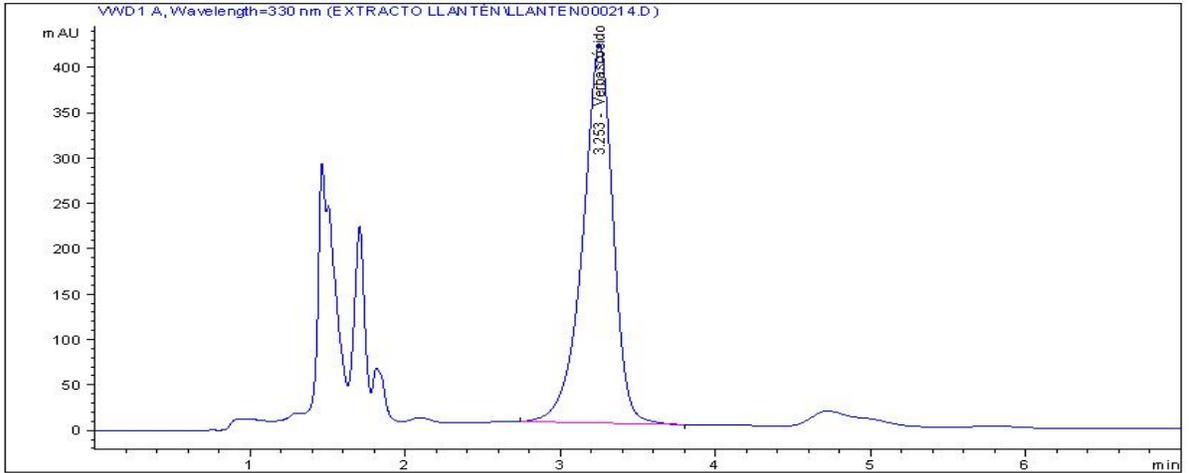
Se obtuvo una señal con línea base estable y buena resolución. Sin embargo, como se puede observar en la figura 15, el tiempo de retención es alto, por lo que la duración de cada una de las inyecciones será de 20 min como mínimo.



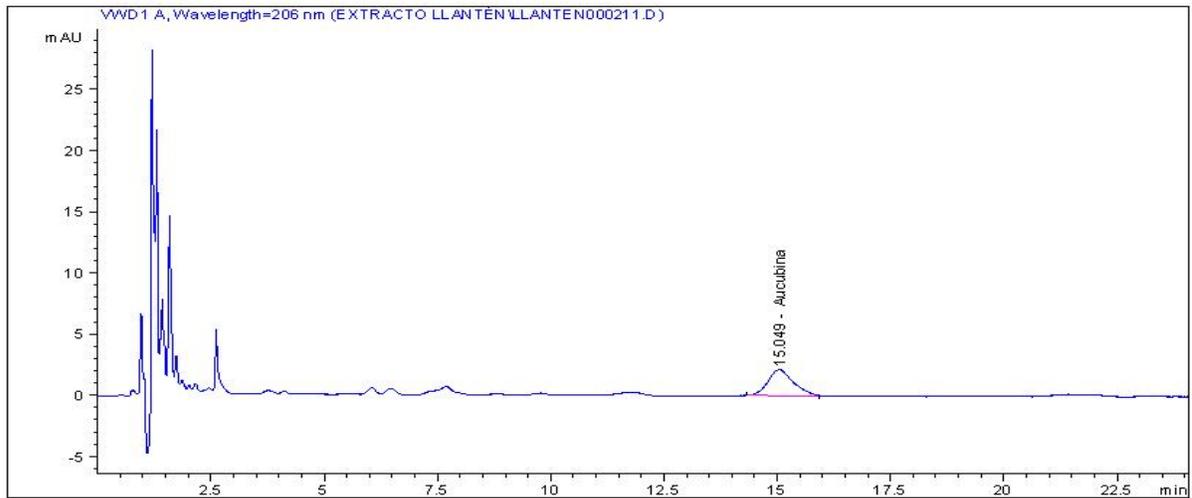
**Figura 15.** Cromatograma obtenido con el estándar de Aucubina para la cuantificación de Iridoides.

- Método de extracción para la materia prima

A continuación, se presentan los resultados del análisis de hojas secas de *P. major* cultivado en el campo (figuras 16 y 17):

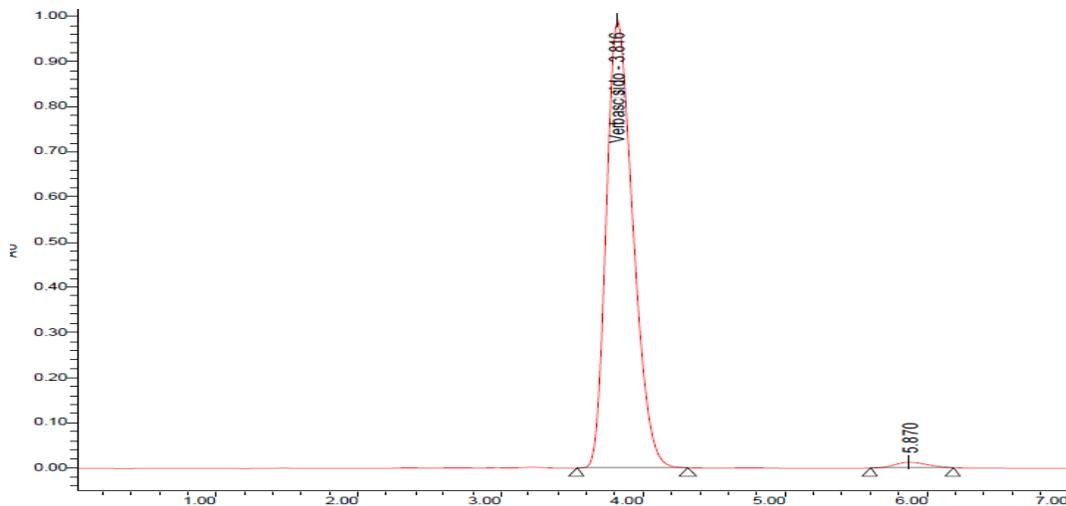


**Figura 16.** Muestra de Extracto de Llantén Materia Prima. Análisis de Cinamatos en el día de la extracción.



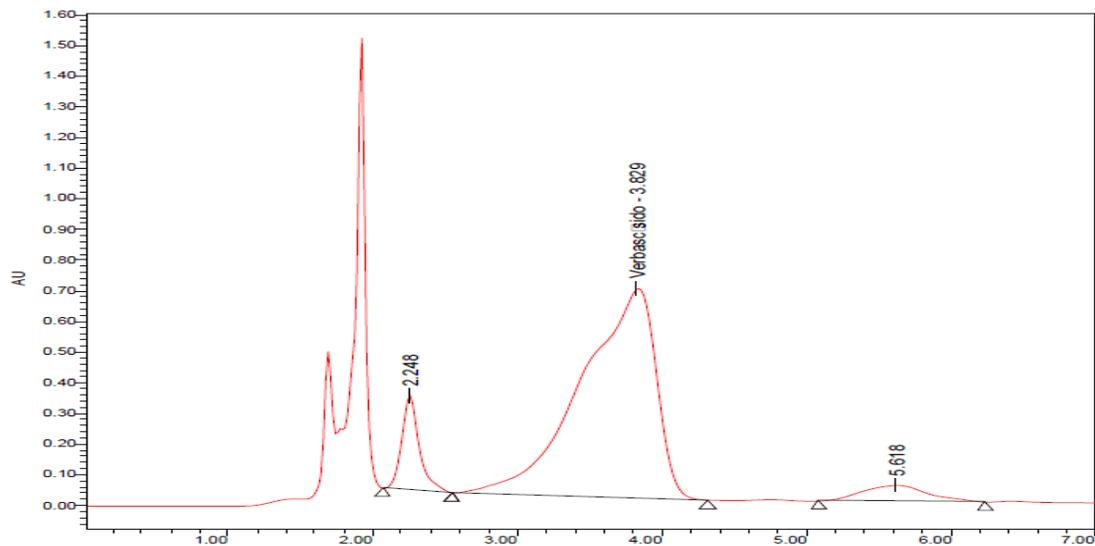
**Figura 17.** Muestra Extracto de Llantén Materia Prima. Análisis de Iridoides en el día de la extracción.

Para la figura 18, el estándar empleado fue el mismo que el mostrado en la figura 14, por lo que se puede notar una señal a 5,870 min, que se asume como producto de degradación del analito.



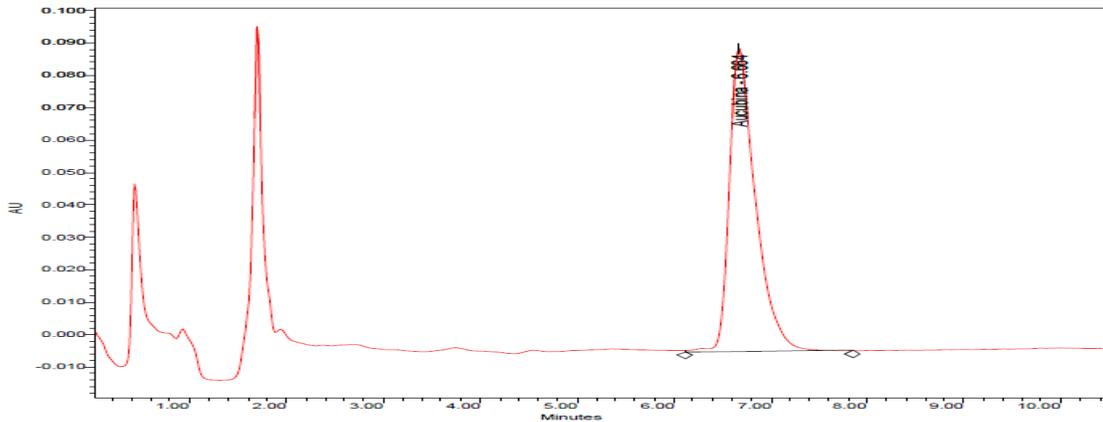
**Figura 18.** Estándar de Verbascósido para la cuantificación de Cinamatos en el día siguiente a su preparación.

De acuerdo con la figura 19, se hace evidente la descomposición del analito en la muestra. Se obtuvo el mismo resultado para repeticiones distintas del mismo extracto.



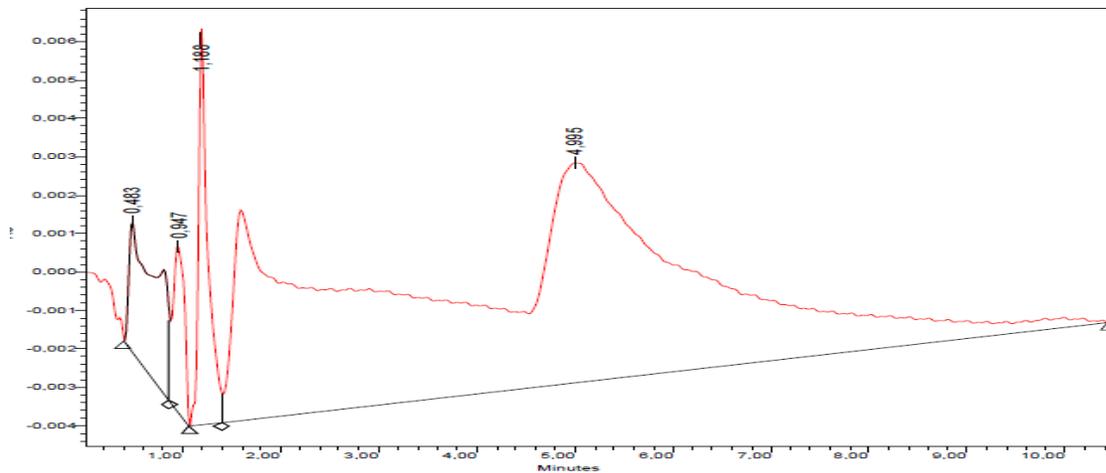
**Figura 19.** Muestra de Extracto de Llantén Materia Prima. Análisis de Cinamatos en el día posterior a la extracción.

Se repitió el análisis de iridoides cambiando la fase móvil a metanol: agua (5:95) con el fin de disminuir el tiempo de retención, lo cual resultó satisfactorio, como se presenta en la figura 20.



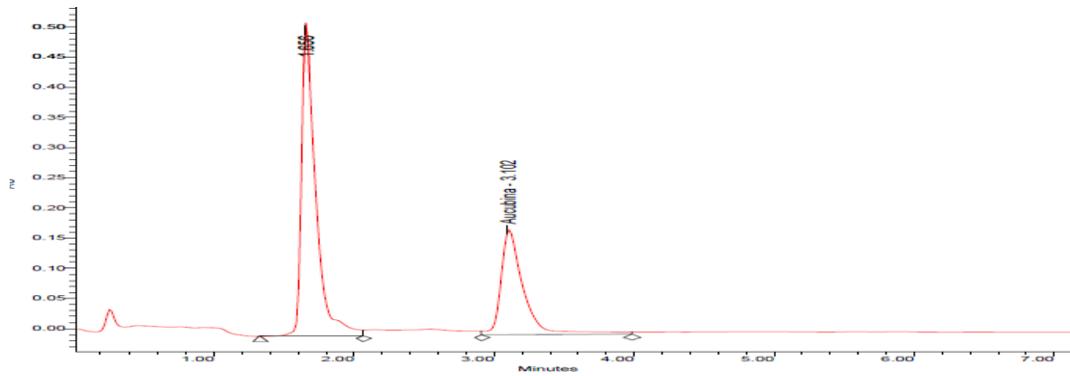
**Figura 20.** Estándar de Aucubina para la cuantificación de Iridoides en el día siguiente a su preparación.

De acuerdo con la figura 21, no es posible la cuantificación del analito ni la obtención de una resolución adecuada en el cromatograma, y se visualiza la posible degradación de la muestra con el paso del tiempo. En este caso, el resultado se da con el empleo de la misma fase móvil utilizada para el estándar, metanol: agua (5:95).



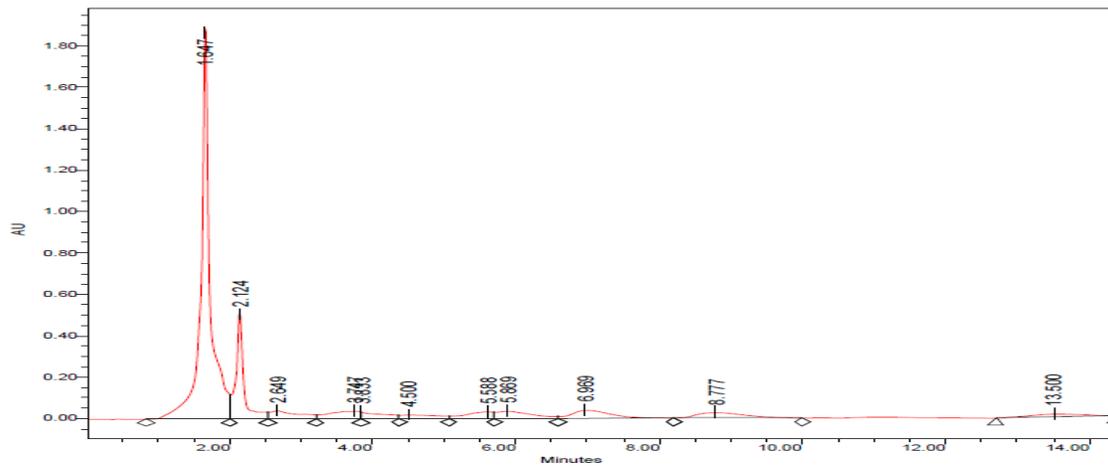
**Figura 21.** Muestra de Extracto de Llantén Materia Prima. Análisis de Iridoides en el día posterior a la extracción.

En el cromatograma presentado en la figura 22, se cambió la fase móvil a metanol: agua 10:90 para intentar una mejora en la resolución y disminuir el tiempo de retención. En este caso fue más notoria la presencia de otra señal en el cromatograma que podría deberse a la degradación del analito.



**Figura 22.** Estándar de Aucubina en el día siguiente a su preparación, cambio de fase móvil.

Finalmente, para la figura 23, se cambió la fase móvil a metanol: agua 10:90 al igual que para el estándar.

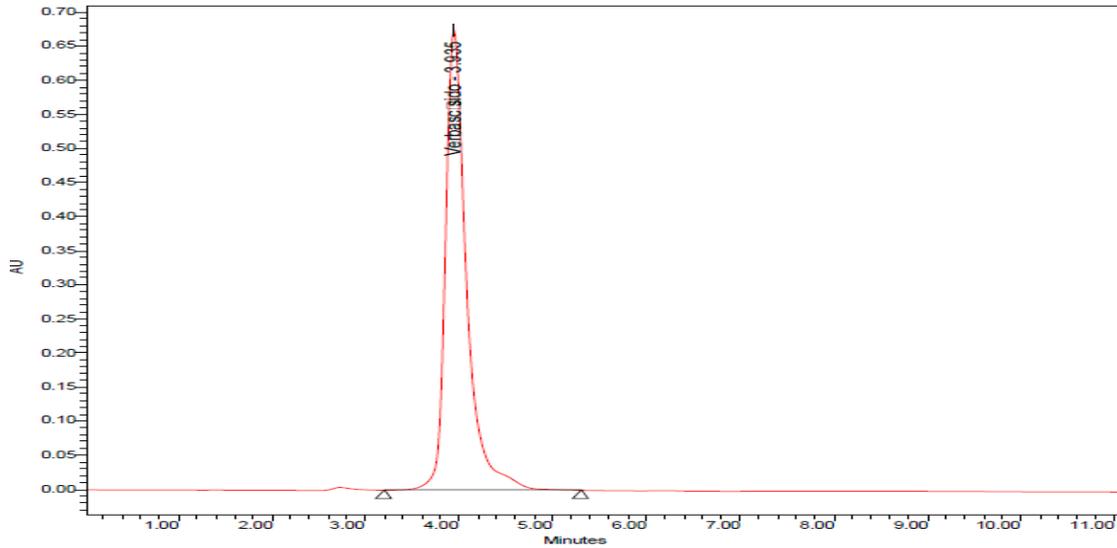


**Figura 23.** Muestra de Extracto de Llantén Materia Prima. Análisis de Iridoides en el día posterior a la extracción, con cambio de fase.

- Pruebas para el análisis: Materia prima y extracciones alcohólicas

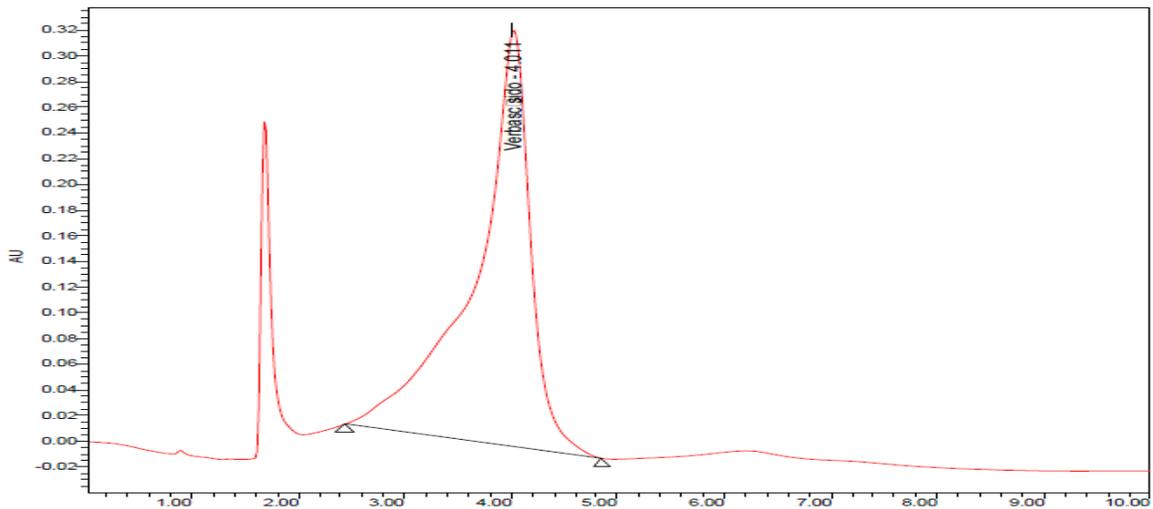
#### Cuantificación de cinamatos con base en verbascósido

Inicialmente se inyectaron estándares aforados tanto en fase móvil como en metanol, para establecer el medio que genera mayor estabilidad y se obtuvo el siguiente resultado (figura 24):



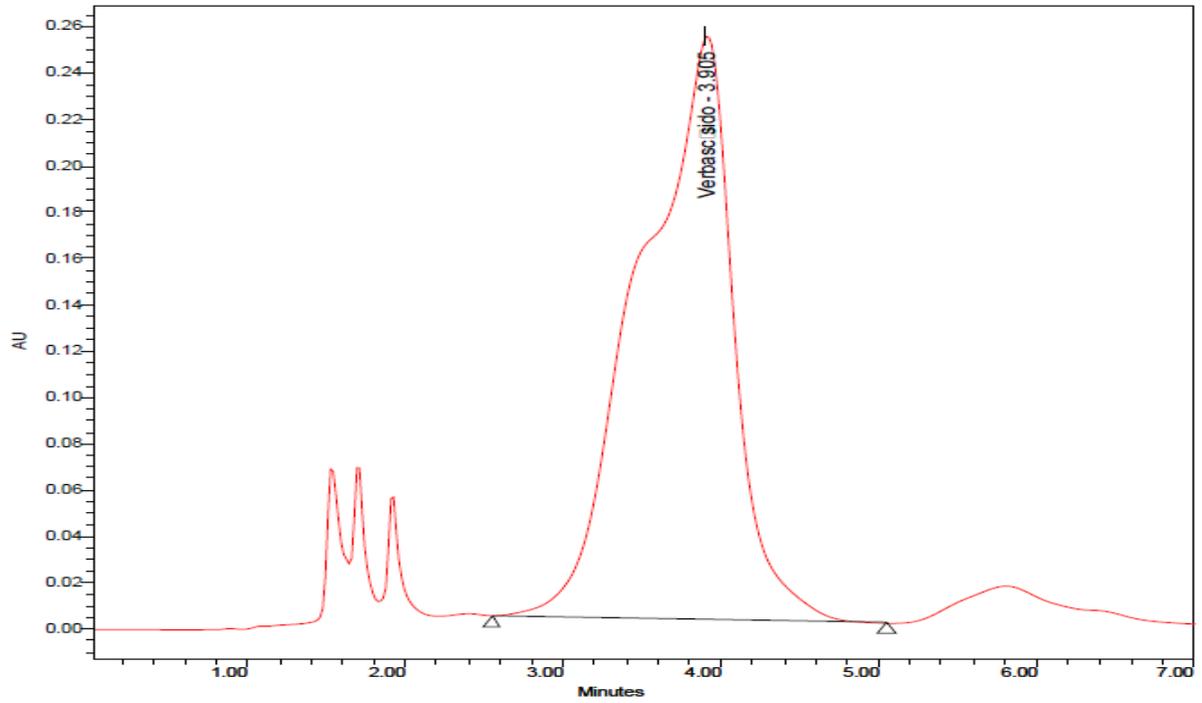
**Figura 24.** Estándar de Verbascósido disuelto y aforado en Fase Móvil (Metanol: Agua, 40:60)

La mejor señal se obtuvo con el estándar en fase móvil por lo que se trabajó las muestras en el mismo solvente (figura 25).

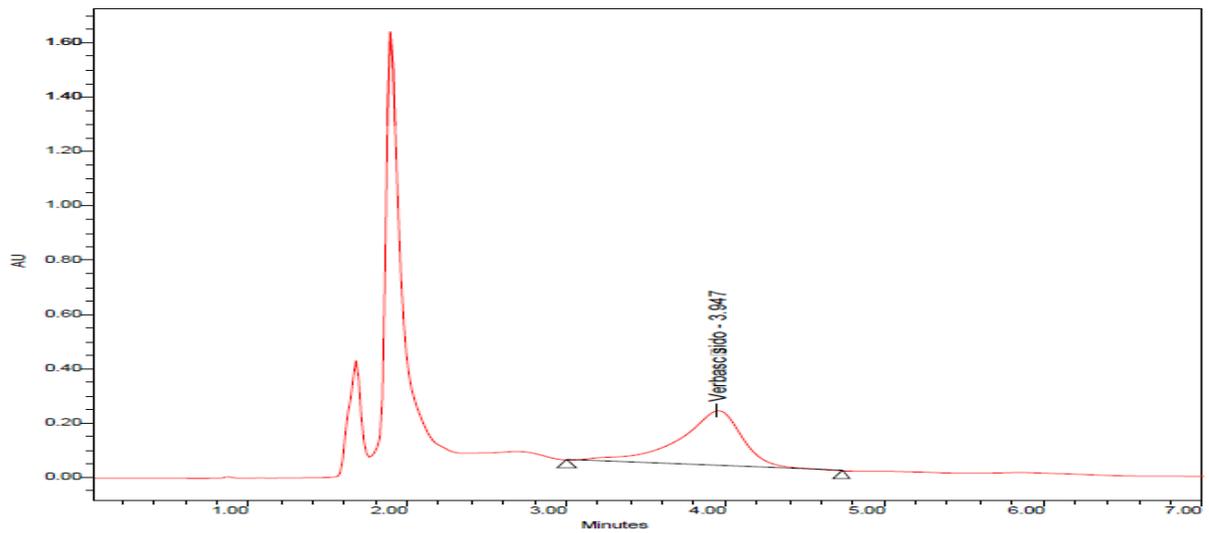


**Figura 25.** Estándar de Verbascósido disuelto y aforado en Metanol

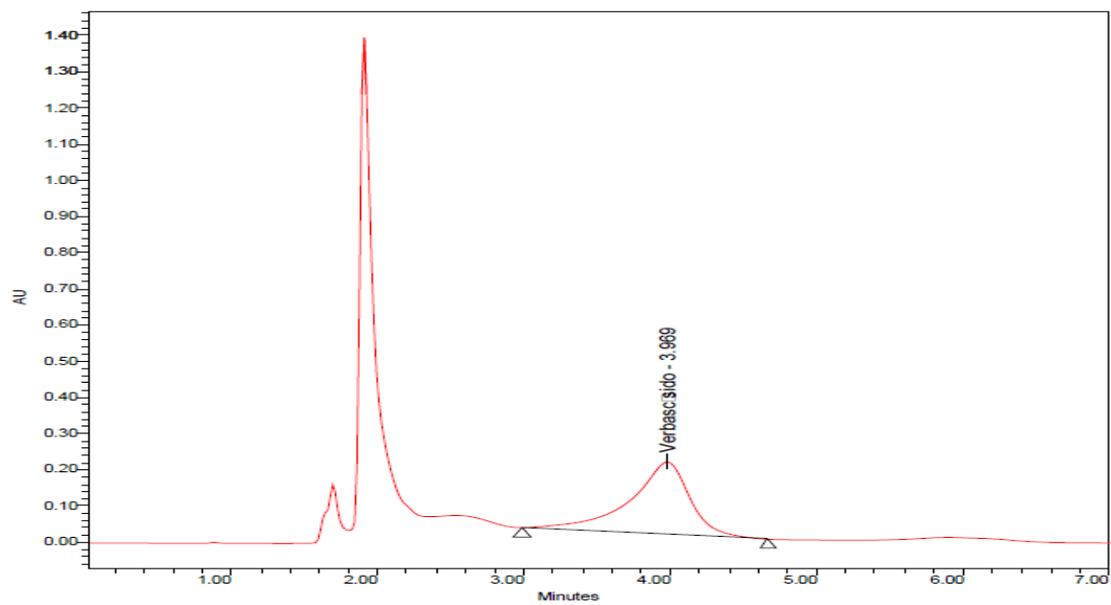
Las figuras 26, 27, 28 y 29 muestran las señales obtenidas con muestras de extractos alcohólicos de llantén. La extracción de la materia prima (figura 26) se realizó el mismo día de la prueba, y al contrario de la figura 16, se puede ver que el medio alcohólico no garantiza buenas condiciones para la muestra y su cualificación en lo que a este analito respecta. En el caso de los extractos 1, 2 y 3, (figuras 27, 28 y 29) se trata de extracciones alcohólicas que se encontraban almacenadas.



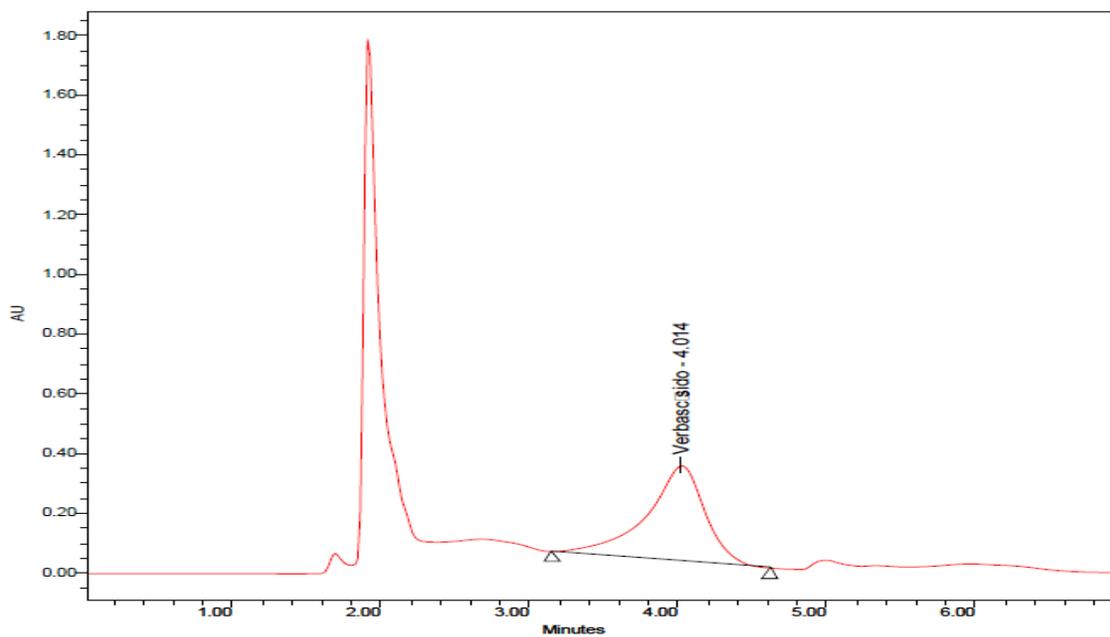
**Figura 26.** Muestra de extracto de Llantén, materia prima. Extracción Alcohólica.



**Figura 27.** Muestra Extracto # 1 llantén hojas verdes J V 9000 ML



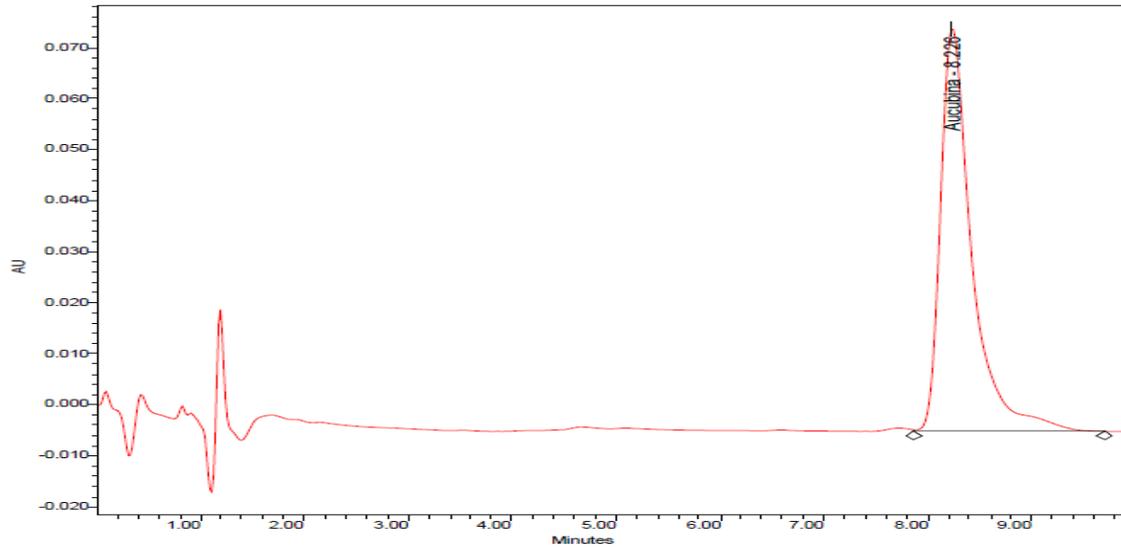
**Figura 28.** Muestra Extracto # 2 llantén hojas secas J V 1850 ML



**Figura 29.** Muestra Extracto # 3 llantén hojas verdes RC 200 ML

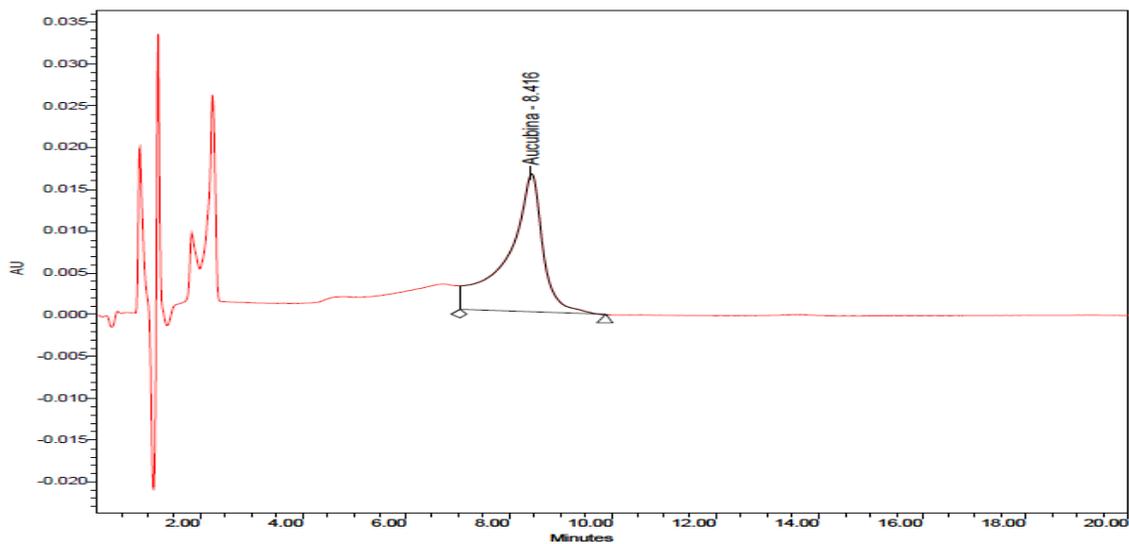
Cuantificación de iridoides con base en aucubina

Se realizó la inyección de estándares aforados tanto en fase móvil como en metanol, para determinar en el medio que genera mayor estabilidad al analito, obteniendo el siguiente resultado (figura 30):



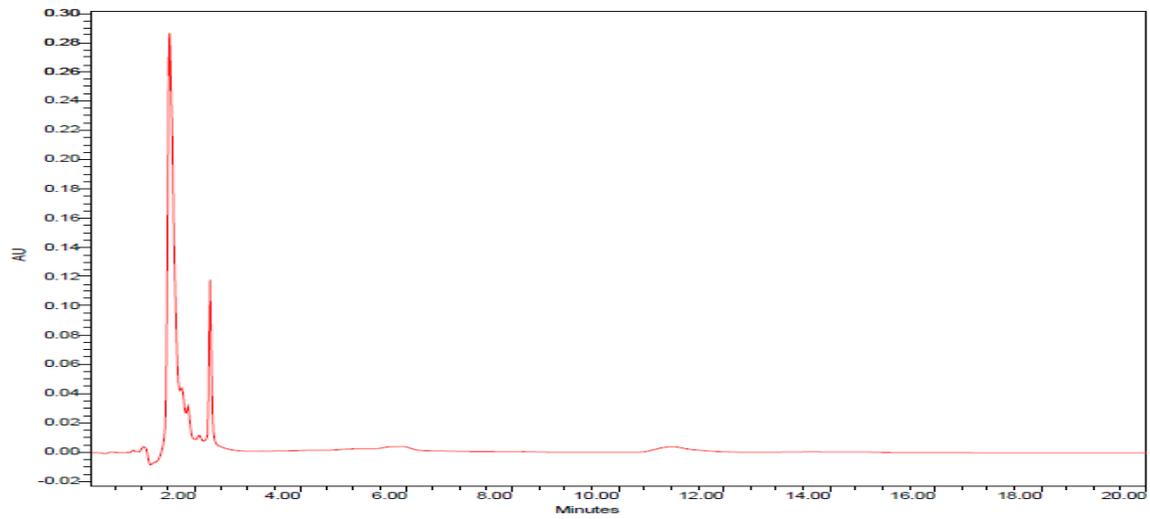
**Figura 30.** Estándar de Aucubina, disuelto y aforado con fase móvil (Metanol: Agua, 5:95).

El mejor cromatograma se obtiene empleando Fase móvil como medio, por lo que se trabajan las muestras de extracto en las mismas condiciones (figura 31).

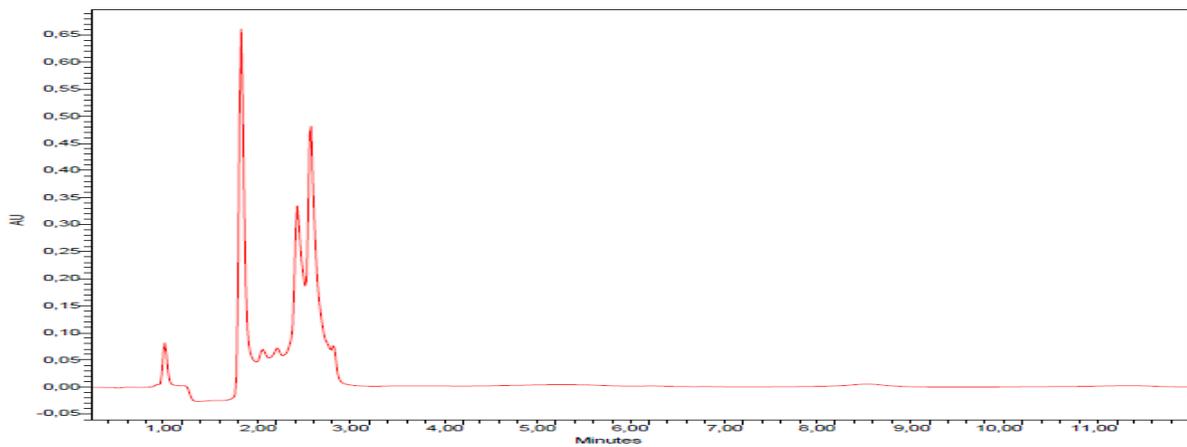


**Figura 31.** Estándar de Aucubina, disuelto y aforado con Metanol.

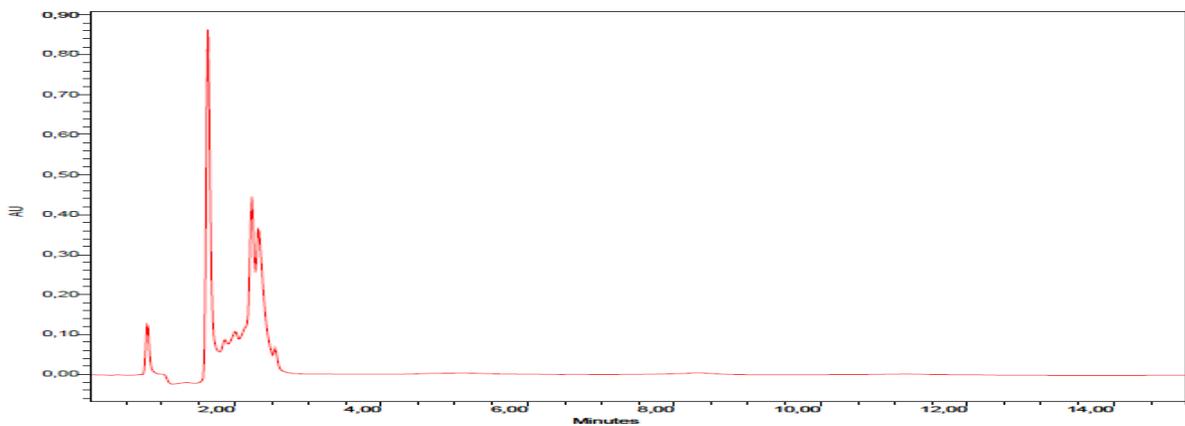
Con base en las figuras 32, 33, 34 y 35 que corresponden a muestras de extracciones alcohólicas de llantén, se puede inferir que las extracciones de la aucubina no se favorecen en este medio ya que no se obtiene señal del analito, la cual si fue posible visualizar en el estándar.



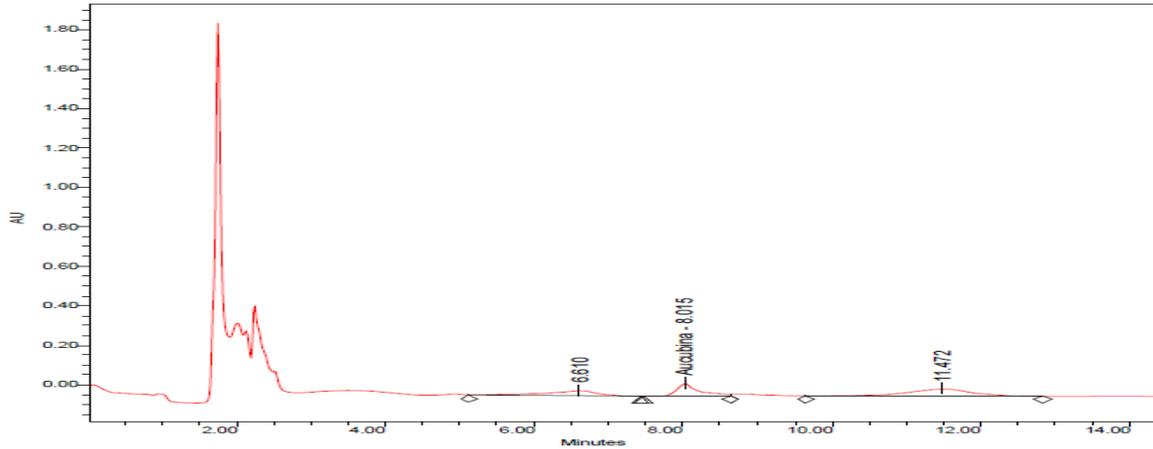
**Figura 32.** Muestra de extracto de Llantén, materia prima. Extracción Alcohólica para análisis de Iridoides.



**Figura 33.** Muestra Extracto # 1 llantén hojas verdes J V 9000 ML



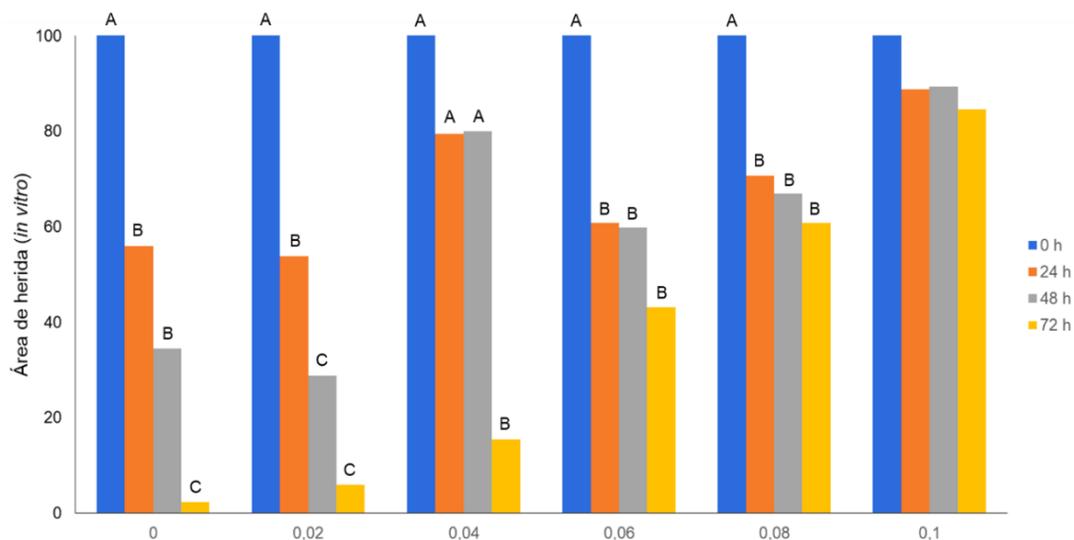
**Figura 34.** Muestra Extracto # 2 llantén hojas secas J V 1850 ML



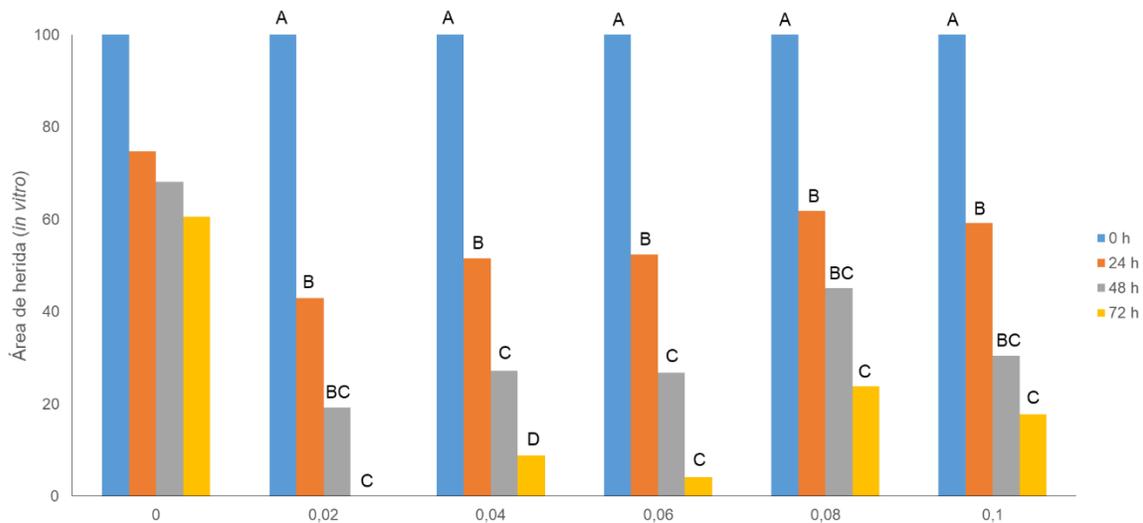
**Figura 35.** Muestra Extracto # 3 llantén hojas verdes RC 200 ML

### OE3. Evaluar la actividad cicatrizante de extractos de *P. major* en líneas celulares

Tal y como se observa en la figura 36, parece que las menores concentraciones del extracto de callo analizadas, tienen una actividad biológica importante sobre la migración celular. Por ejemplo, a las 48 y 72 horas, ya se puede observar una diferencia significativa en la migración celular con la concentración de 0,02% cuando se compara contra el respectivo control. Pero curiosamente, cuando se compara entre todas las concentraciones a las 48 h, la diferencia en la migración no es significativa ( $p > 0.05$ , ANOVA). A las 72 h, se observa que el área del control es significativamente mayor en comparación con las concentraciones analizadas ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis y mediana de Mood), pero en algunos ensayos, las células presentaron citotoxicidad a partir de la concentración de 0,04%, y es justamente debido a lo anterior **se descarta este extracto para realizar los ensayos *in vivo***.



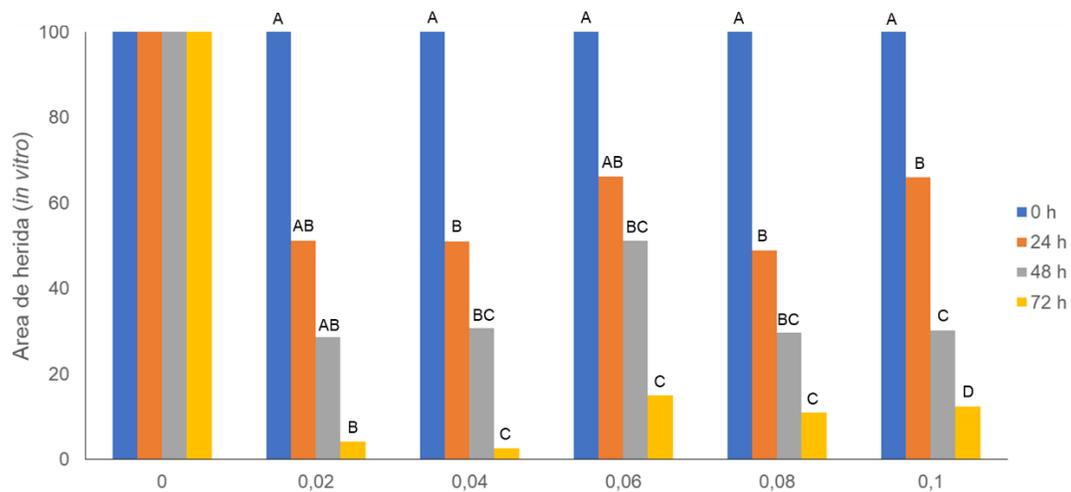
**Figura 36.** Efecto de un extracto de callo de *P. major* en diferentes concentraciones sobre la migración celular de fibroblastos murinos durante 24, 48 y 72 h (Control, 0,02%, 0,06%, 0,08% y 0,1% ANOVA; 0,04% Kruskal Wallis). Las letras que son diferentes entre cada concentración (set de columnas) representan diferencias significativas.



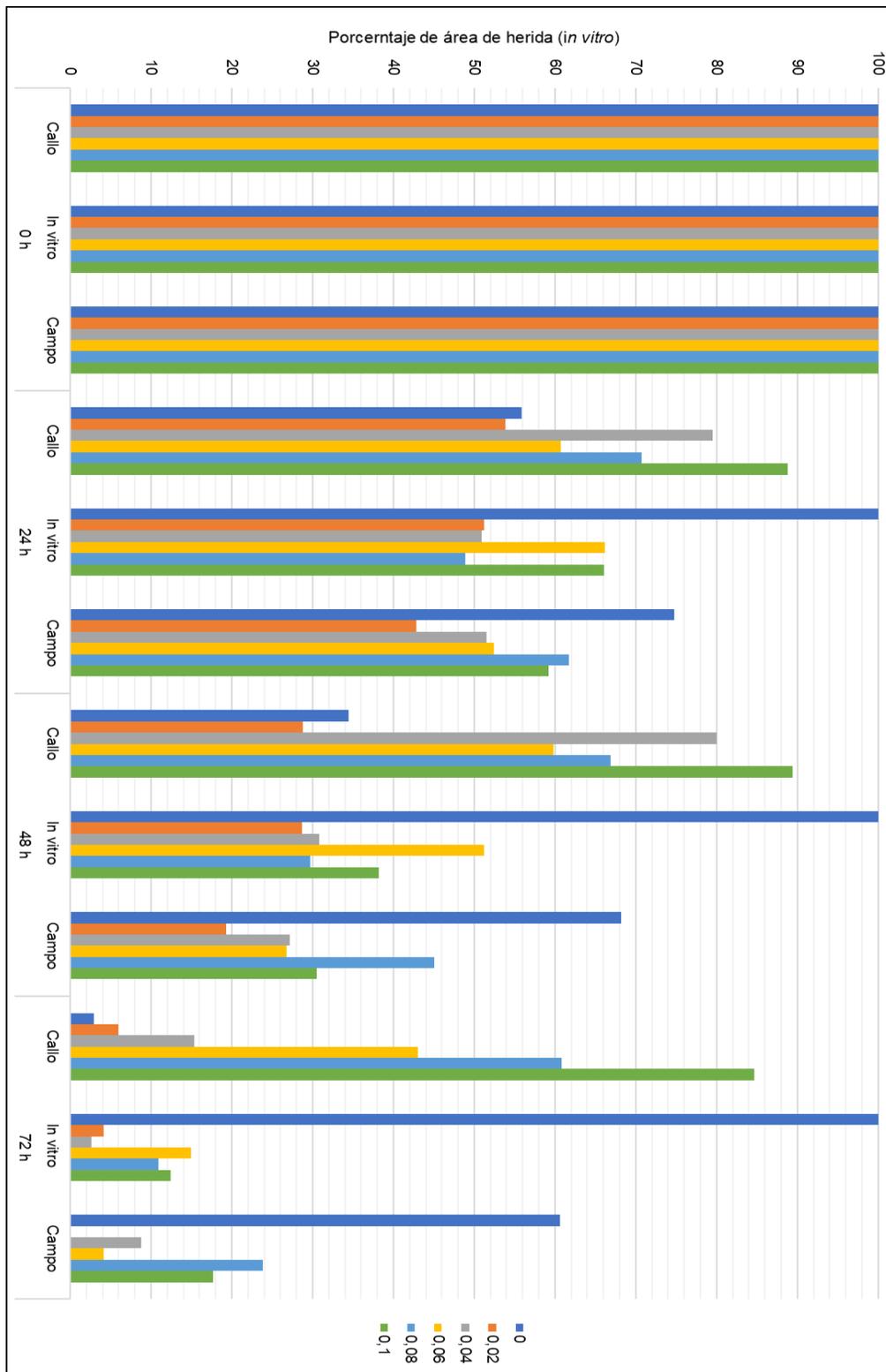
**Figura 37.** Efecto de un extracto de *P. major* (planta de campo) en diferentes concentraciones sobre la migración celular de fibroblastos murinos durante 24, 48 y 72 h (ANOVA). Las letras que son diferentes entre cada concentración (set de columnas) representan diferencias significativas.

En el caso del extracto de campo (figura 37), se puede afirmar que, a las 24 h, a pesar de que en el control hubo menor porcentaje de cierre, en comparación con las diferentes concentraciones analizadas, no hay diferencias significativas entre cada una de las concentraciones analizadas en comparación con el control ( $p > 0,05$ , ANOVA). Pero, a las 48 h, se encontró diferencias significativas entre el control y las concentraciones de 0,02%, 0,04%, 0,06% y 0,1%, siendo estas concentraciones más eficientes en estimular la migración celular ( $p < 0,05$ , ANOVA). A las 72 h, se encontró diferencia significativa entre 0,02% y el resto de concentraciones analizadas, incluido el control ( $p < 0,05$ , Kruskal-Walis y prueba mediana de Mood). Lo anterior parece indicar que este extracto presenta alta bioactividad a bajas concentraciones. Sobre todo, porque desde la etapa anterior, es el que ha mostrado más reproducibilidad en los ensayos realizados.

Finalmente, en el caso del extracto obtenido a partir de las plantas de llantén cultivadas *in vitro* (figura 38), a las 24 y 48 h, a pesar de que en el control hubo menor porcentaje de cierre, en comparación con las diferentes concentraciones analizadas, no hay diferencias significativas entre cada una de las concentraciones analizadas en comparación con el control ( $p > 0,05$ , Kruskal-Walis). A las 72 h, se encontró diferencia significativa entre el control y los diferentes tratamientos. Sin embargo, entre sí, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica que todas las concentraciones ejercen un efecto similar sobre la migración celular ( $p < 0,05$ , Kruskal-Walis y prueba mediana de Mood). Aunque se podría considerar que este extracto presenta alta bioactividad en un rango de bajas concentraciones, se descarta para realizar las pruebas *in vivo*, debido a que sus resultados no fueron reproducibles en algunos intentos.



**Figura 38.** Efecto de un extracto de *P. major* (vitroplanta) en diferentes concentraciones sobre la migración celular de fibroblastos murinos durante 24, 48 y 72 h. (ANOVA). Las letras que son diferentes entre cada concentración (set de columnas) representan diferencias significativas



**Figura 39.** Comparación del efecto de los diferentes tratamientos aplicados a fibroblastos murinos sobre la migración celular *in vitro* durante 24, 48 y 72 h.

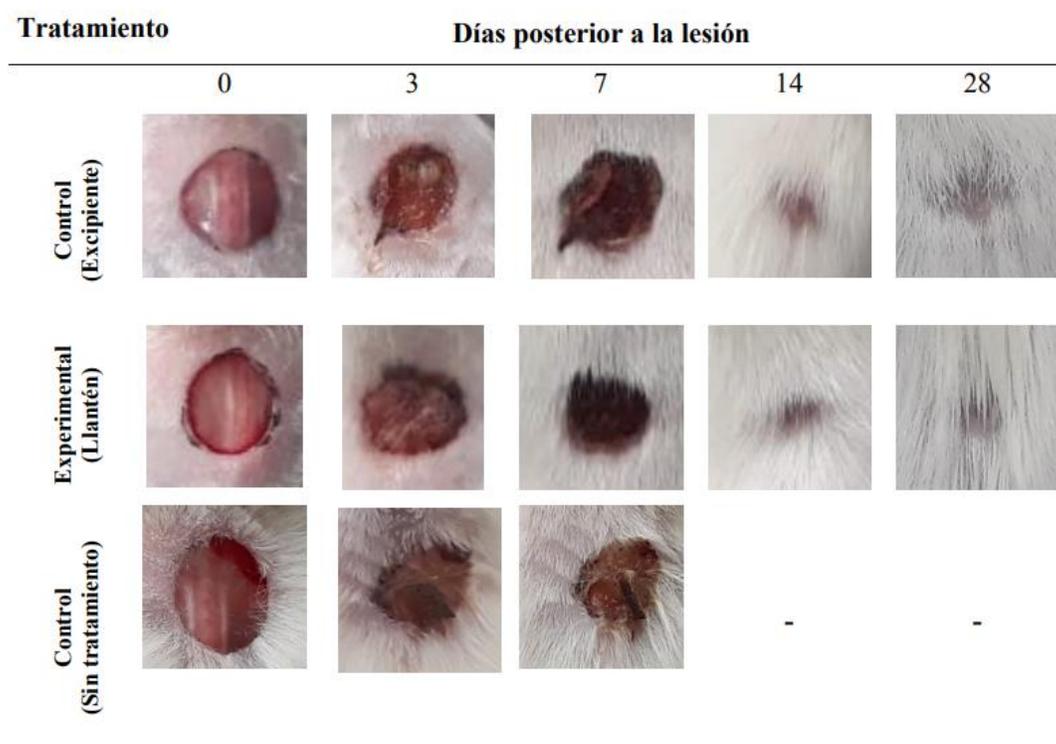
Cuando se compara todos los tratamientos (extractos y concentraciones, figura 39) se observa que a las 24 h no hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de los 3 extractos, ( $p = 0,453$ , Kruskal-Walis). A las 48 h, se encontró que los extractos 0,02% y 0,04% de planta tomada de campo, así como el extracto 0,02% de callo y 0,04% de planta de *in vitro*, estimula la proliferación de las células con respecto al resto de los tratamientos ( $p = 0,004$ , Kruskal Walis y Mediana de Mood).

A las 72 h, se encontró una migración significativamente superior cuando se utilizó el extracto de planta de campo e *in vitro* al 0,02% y 0,04%, lo que de nuevo demuestra que hay un potencial de esta planta a bajas concentraciones.

Es importante aclarar que, aunque para este estudio se descarta los extractos de callo y de plantas *in vitro*, vale la pena valorar cambios en la producción de callo, así como el estudio de otras modificaciones en el cultivo *in vitro* para explotar el gran potencial de esta planta.

#### OE4. Evaluar la actividad cicatrizante de extractos de *P. major* *in vivo*.

En la figura 40 se puede observar la evolución de las diferentes heridas de acuerdo a los tratamientos aplicados durante un seguimiento de 28 días.

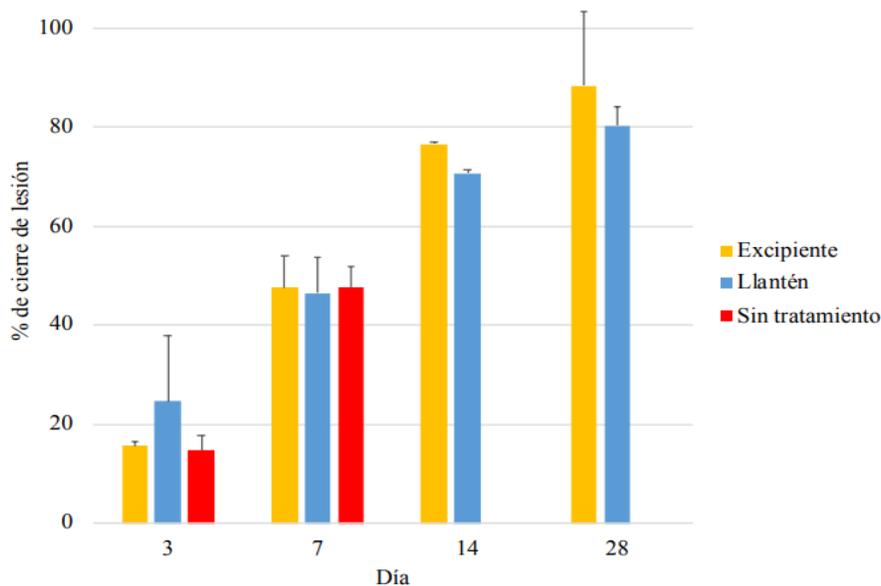


**Figura 40.** Imagen macroscópica de la evolución del proceso de regeneración de la lesión de los animales de experimentación desde el día 0 hasta el día 28. Se muestra la evolución del proceso para los diferentes tratamientos.

Como se puede apreciar, conforme avanza el tiempo la herida se contrae y el pelaje del animal que fue rasurado inicialmente empieza a recubrirla. Sin embargo, es importante mencionar que dicho

pelaje crece alrededor de la lesión y no desde ella, por lo que para poder tomar la medida real de la herida para el día 14 y 28 una vez eutanasiado el animal a este se le rasuró de nuevo el pelaje antes de tomar la foto, de manera que este factor no influya en la determinación de la tasa de regeneración. También, se observa que para el día 7 sin importar el tratamiento aplicado, ya la lesión presenta un grano o costra, propio de la regeneración de heridas. Para el día 11, ya ninguno de los animales del tratamiento control con excipiente lo presentaban, caso contrario a los animales con el tratamiento experimental

De manera más específica, en la figura 41, se puede observar el porcentaje de cierre promedio calculado para los animales de cada respectivo día y tratamiento.



**Figura 41.** Porcentaje de cierre de la lesión para los animales en estudio.

Se puede observar que el porcentaje de cierre aumenta conforme avanza el tiempo en todos los casos. Además, se pueden apreciar que para el día 3 la gráfica muestra que el porcentaje de cierre tiende a ser mayor para los animales con el tratamiento experimental (excipiente y llantén) y que en el caso de los animales con tratamiento control con excipiente y control sin tratamiento para ese mismo día el porcentaje de cierre es bastante similar, aunque la desviación estándar es muy alta para el grupo experimental. Caso semejante para estos últimos dos sucede en el día 7, lo que puede sugerir que el excipiente por sí mismo no tiene un efecto negativo ni positivo sobre el proceso de regeneración tisular. En la gráfica también se puede notar que en el día 7, 14 y 28 el porcentaje de cierre es muy similar para los grupos. Sin embargo, ya para el día 14 y el día 28 se puede notar que el tratamiento control con excipiente tiene un porcentaje de cierre notablemente mayor que el tratamiento experimental, lo cual es un efecto contrario al que era deseado. Sin embargo, no se puede decir con absoluta certeza que la diferencia entre ambos sea o no sea significativa, ya que solo se trabajó con las desviaciones estándar para hacer una primera comparación de lo que se obtuvo debido a que la población en estudio no era significativa como para realizar un análisis estadístico más elaborado.

### **Análisis histológico del proceso de regeneración del tejido**

### Conteo de PMN

En el cuadro 3 se puede observar la cantidad de PMN/mm<sup>2</sup> promedio para las muestras de cada tratamiento del día 3.

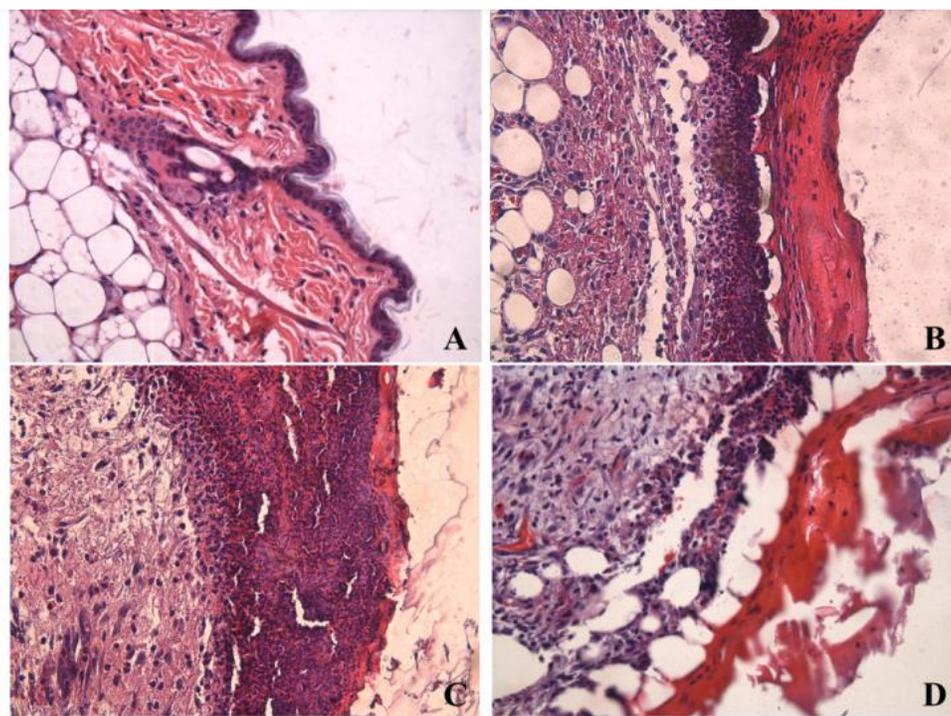
**Cuadro 3.** Cantidad de PMN/mm<sup>2</sup> en la lesión de los animales de los diferentes tratamientos en el día 3.

Tratamiento	PMN/mm <sup>2</sup>
Control (Excipiente)	2 116,6
Experimental (Llantén)	1 272,2
Control (Sin tratamiento)	2 183,3

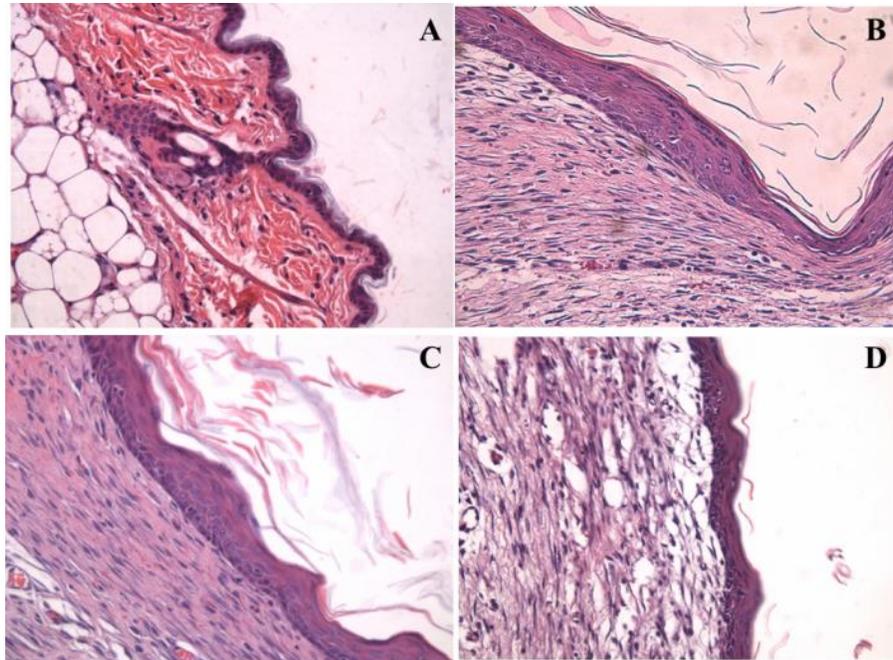
Se puede notar que la cantidad de PMN/mm<sup>2</sup> para los animales tratados con el extracto de *P.major* para el día 3 es significativamente menor que la cantidad presente en los individuos tratados con solo el excipiente y sin aplicar tratamiento ( $p < 0,05$ , Kruskal-Walis). También, es importante destacar nuevamente que entre el tratamiento control con excipiente y el control sin tratamiento, el comportamiento es bastante semejante.

### Grosor de la epidermis

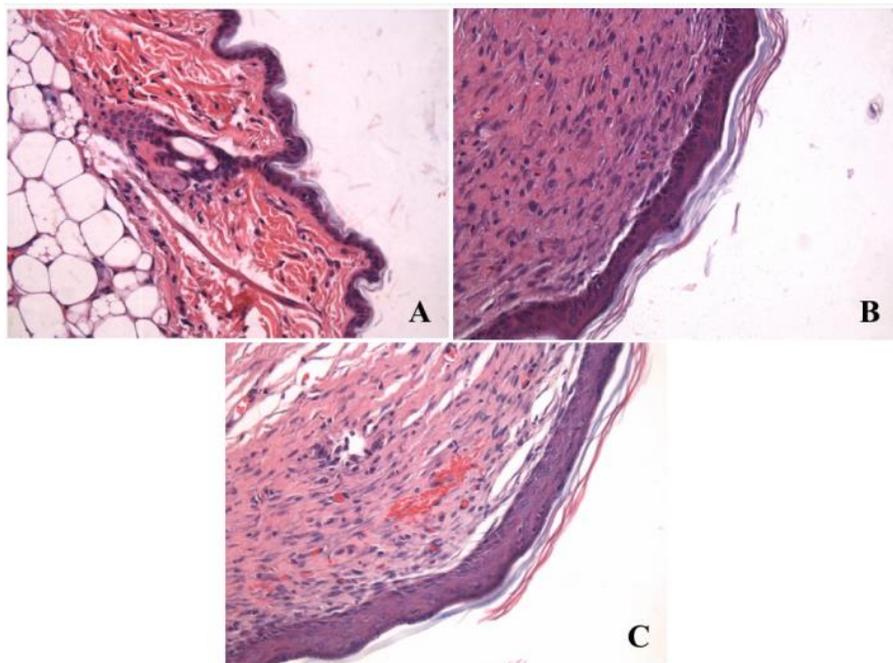
La regeneración de la epidermis con respecto al tiempo puede observarse de forma cualitativa en las siguientes figuras:



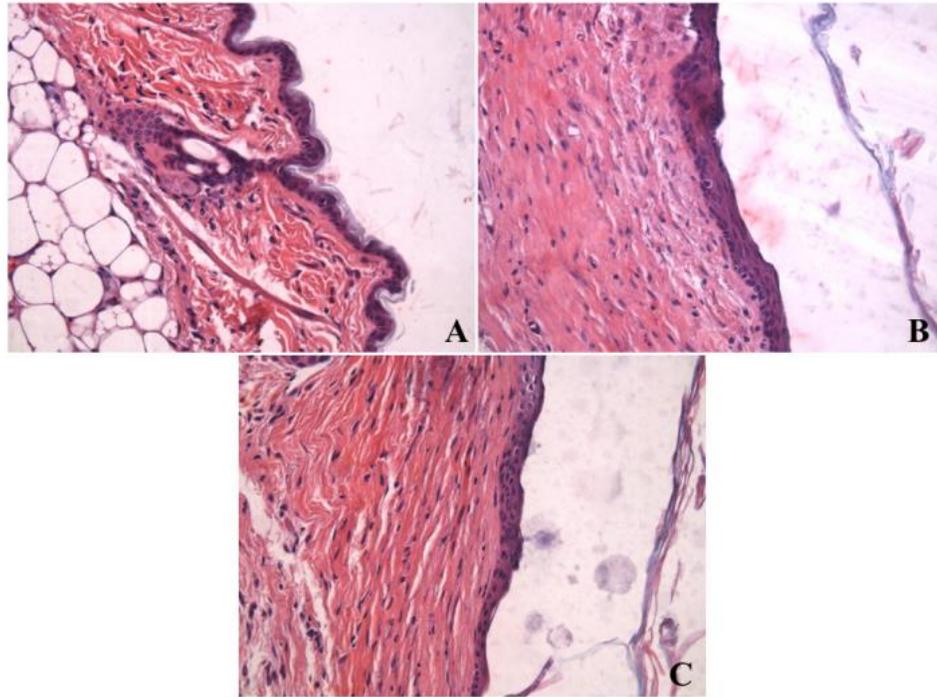
**Figura 42.** Corte histológico de una tinción con HE de piel de ratón sana (A), piel con lesión sin tratamiento en el día 3 (B), piel con lesión y excipiente en el día 3 (C) y piel con lesión y llantén en el día 3 (D). Aumento: 40x.



**Figura 43.** Corte histológico de una tinción con HE de piel de ratón sana (A), piel con lesión sin tratamiento en el día 7 (B), piel con lesión y excipiente en el día 7 (C) y piel con lesión y llantén en el día 7 (D). Aumento: 40x

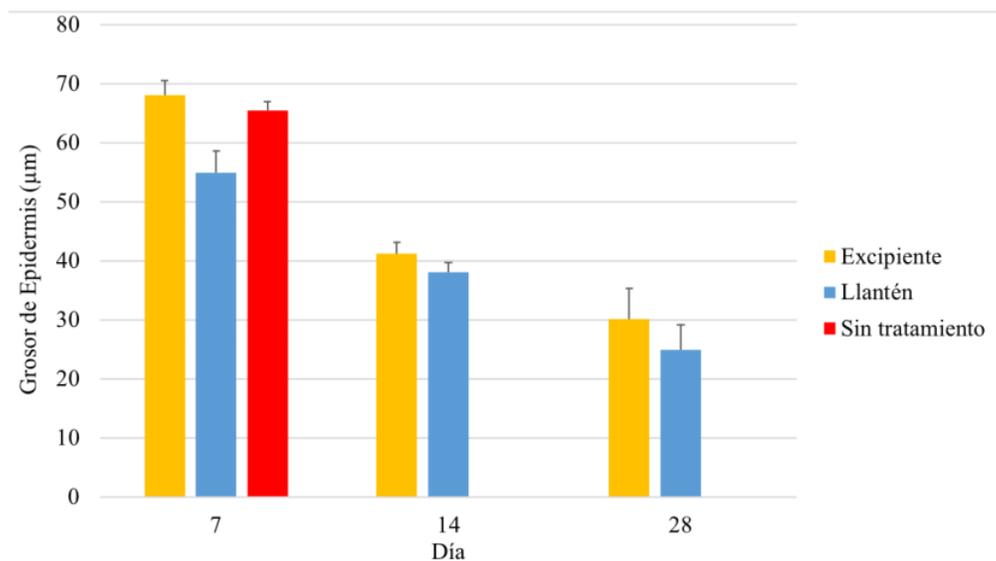


**Figura 44.** Corte histológico de una tinción con HE de piel de ratón sana (A), piel con lesión y excipiente en el día 14 (B) y piel con lesión y llantén en el día 14 (C). Aumento: 40x.



**Figura 45.** Corte histológico de una tinción con HE de piel de ratón sana (A), piel con lesión y excipiente en el día 28 (B) y piel con lesión y llantén en el día 28 (C). Aumento: 40x.

Además, para determinar el proceso de regeneración, también se procedió a medir el grosor de la epidermis regenerada en el tiempo de los grupos en estudio, figura 46.



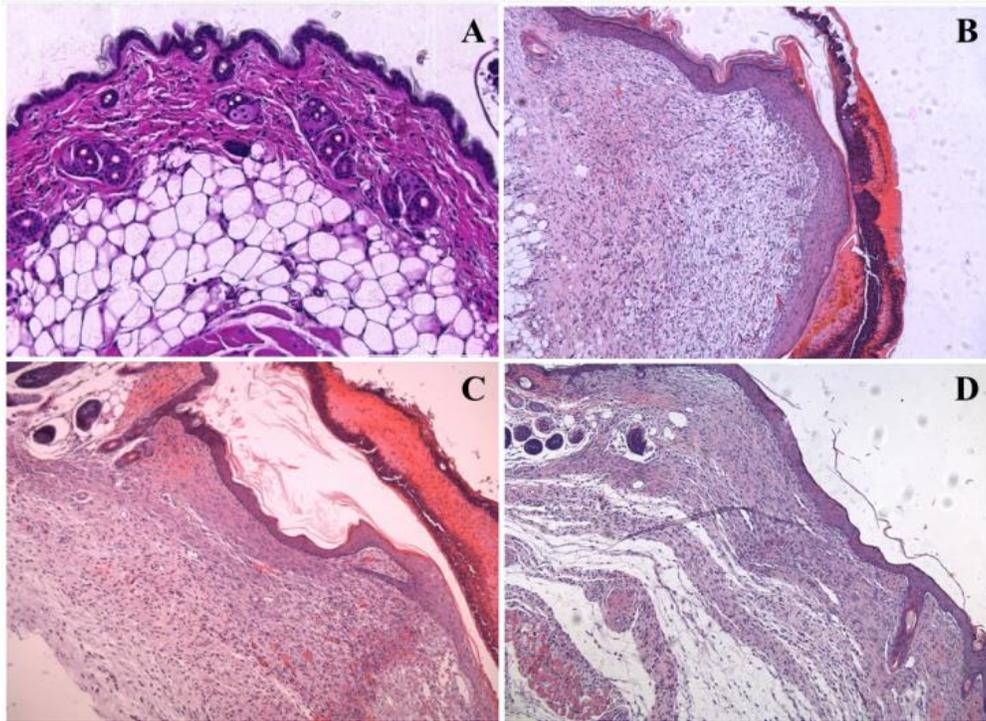
**Figura 46.** Grosor de la epidermis regenerada bajo los diferentes tratamientos

El gráfico muestra que conforme avanza el tiempo el grosor de la epidermis tiende a disminuir, donde el día 7 los animales tratados con el extracto de llantén tienen la epidermis menos gruesa, comparada con el grupo control excipiente y control sin tratamiento. Para los días 14 y 28 la diferencia ya no

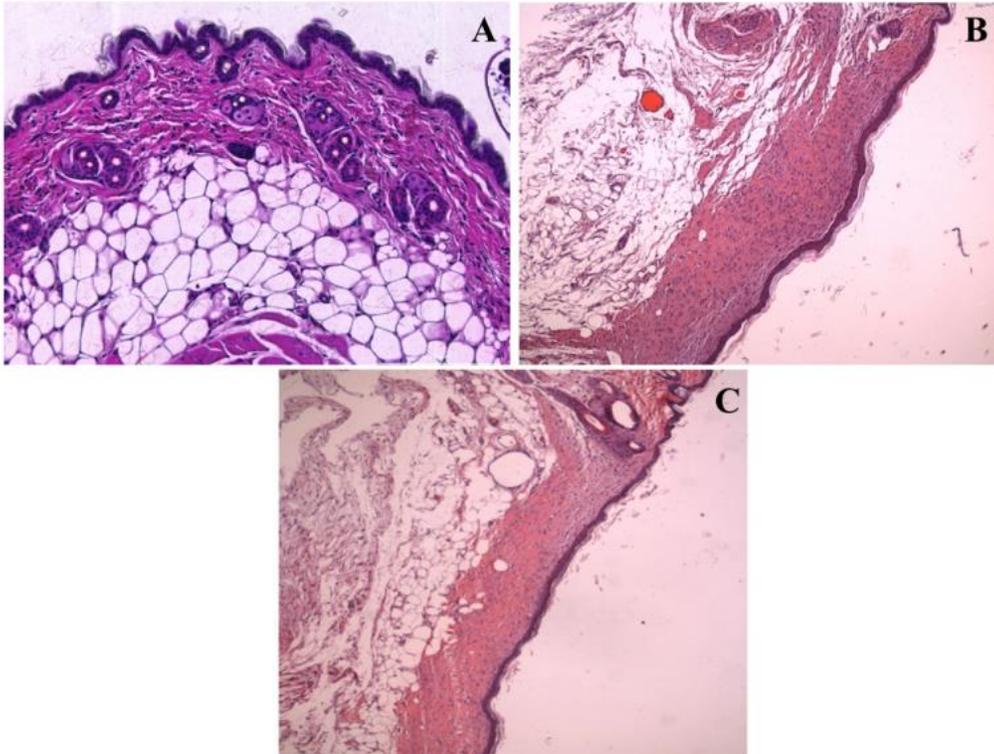
existe. Es importante mencionar que el grosor promedio de una epidermis sana es de 17,3  $\mu\text{m}$ , por lo que los grupos en estudio aún pudieron llegar a tener su epidermis más delgada.

### *Grosor de la dermis*

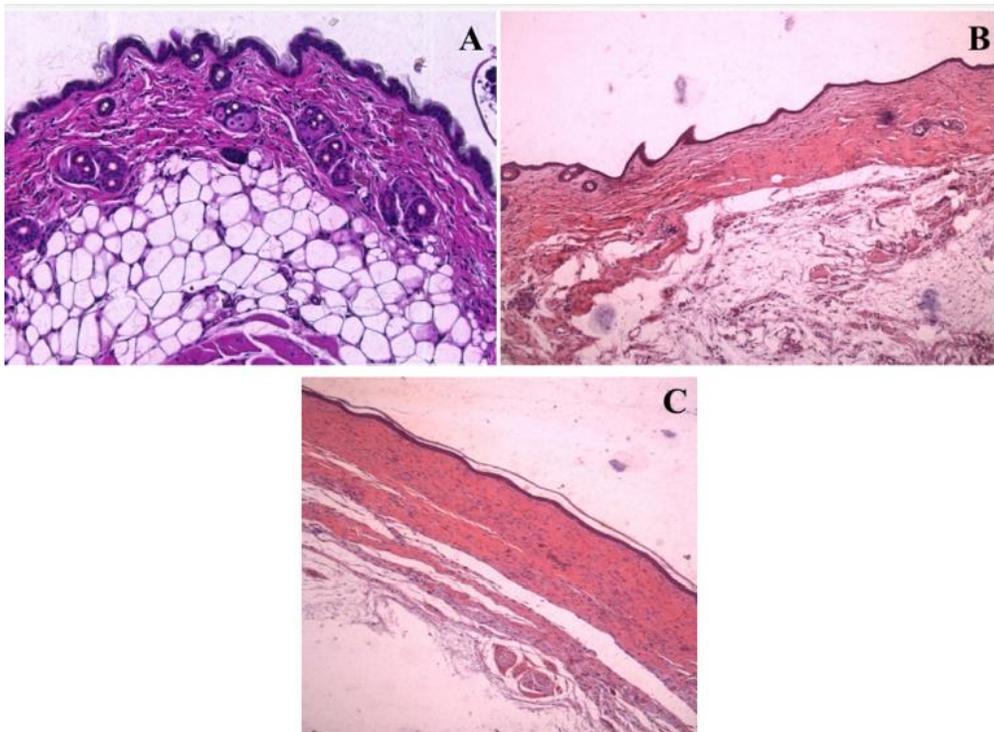
La regeneración de la dermis con respecto al tiempo puede observarse de forma cualitativa en las siguientes figuras:



**Figura 47.** Corte histológico de una tinción con HE de piel de ratón sana (A), piel con lesión sin tratamiento en el día 7 (B), piel con lesión y excipiente en el día 7 (C) y piel con lesión y llantén en el día 7 (D). Aumento: 10x.

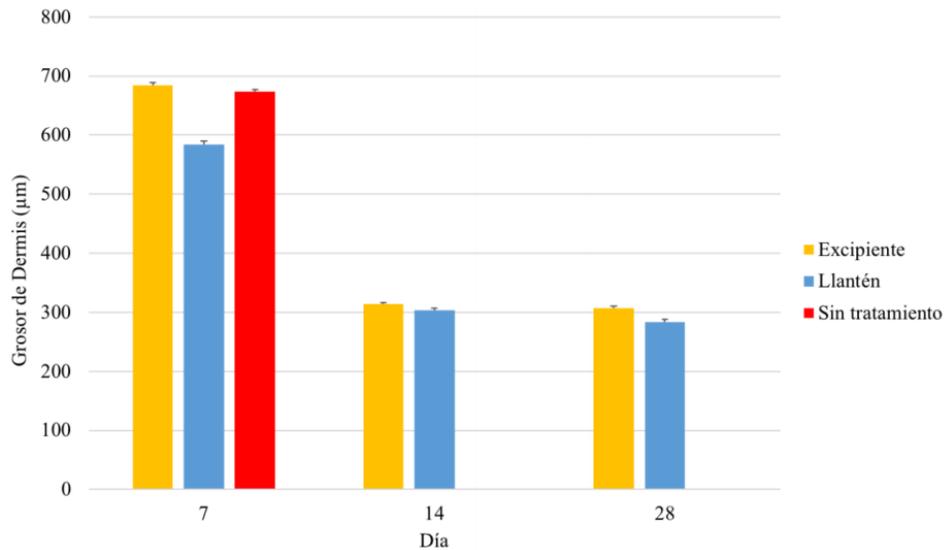


**Figura 48.** Corte histológico de una tinción con HE de piel de ratón sana (A), piel con lesión y excipiente en el día 14 (B) y piel con lesión y llantén en el día 14 (C). Aumento: 10x



**Figura 49.** Corte histológico de una tinción con HE de piel de ratón sana (A), piel con lesión y excipiente en el día 28 (B) y piel con lesión y llantén en el día 28 (C). Aumento: 10x.

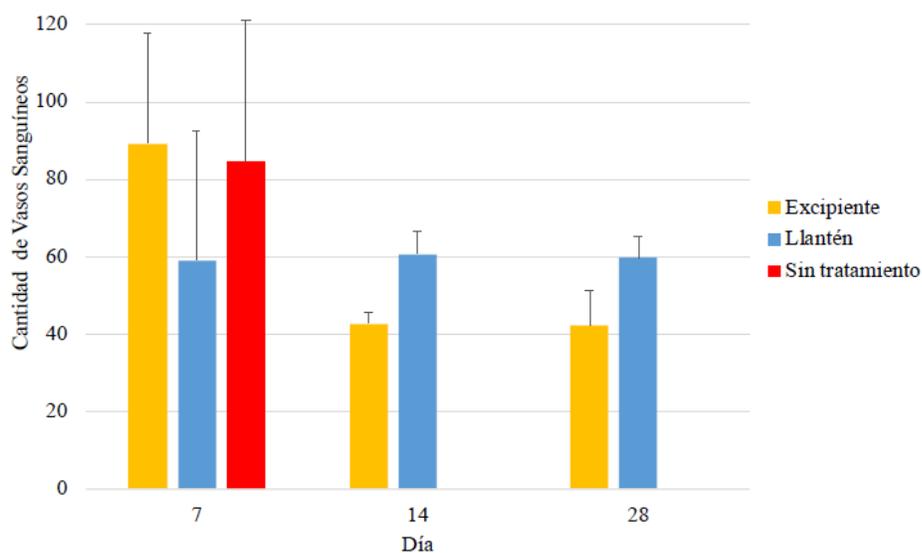
Como ocurre en el caso de la epidermis, el gráfico muestra que conforme avanza el tiempo, la dermis disminuye grosor. Los animales con el tratamiento experimental para el día 7 demuestran que tienen una dermis más delgada que los animales con tratamiento control con excipiente y control sin tratamiento (figura 50). Para el día 14 y 28 el grosor de la dermis de los grupos en estudio es prácticamente la misma. También, cabe mencionar que el grosor promedio de una dermis sana es de 182,1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 50.** Grosor de la dermis regenerada en el tiempo para los animales en estudio.

### Cantidad de vasos sanguíneos

Se realizó un conteo de vasos sanguíneos presentes en el tejido formado bajo las condiciones de los diferentes tratamientos.

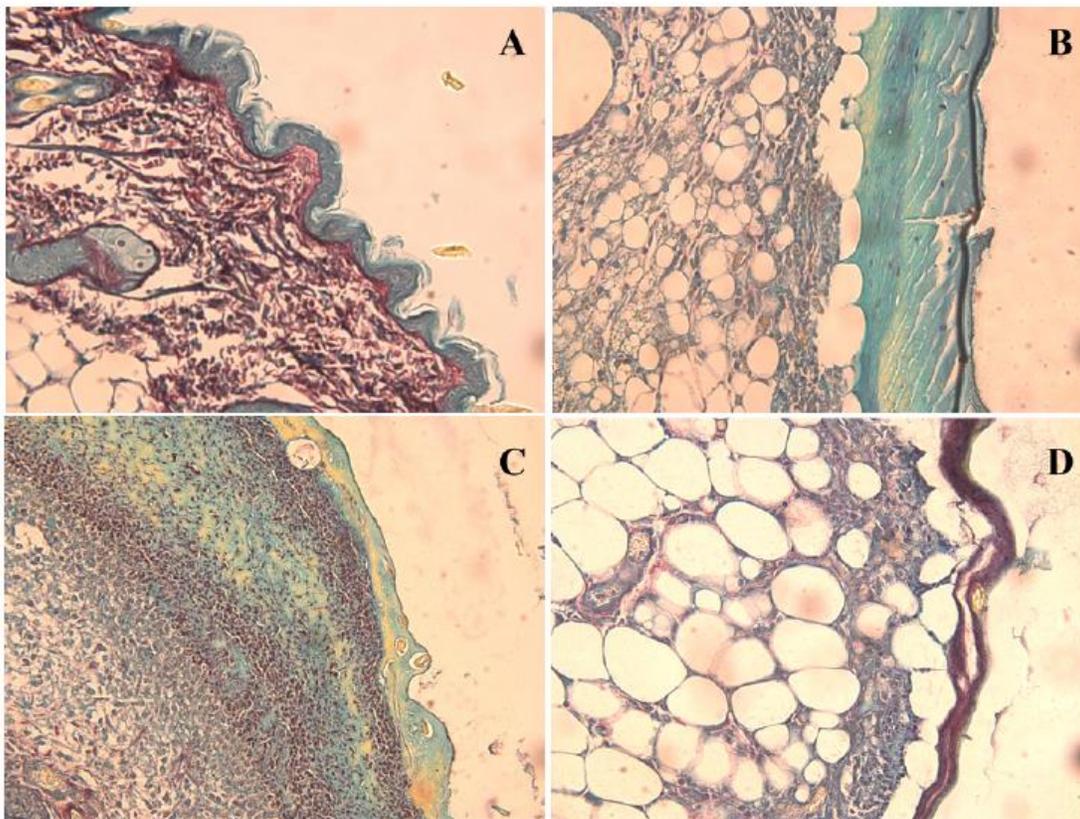


**Figura 51.** Cantidad de vasos sanguíneos presentes en el tejido regenerado

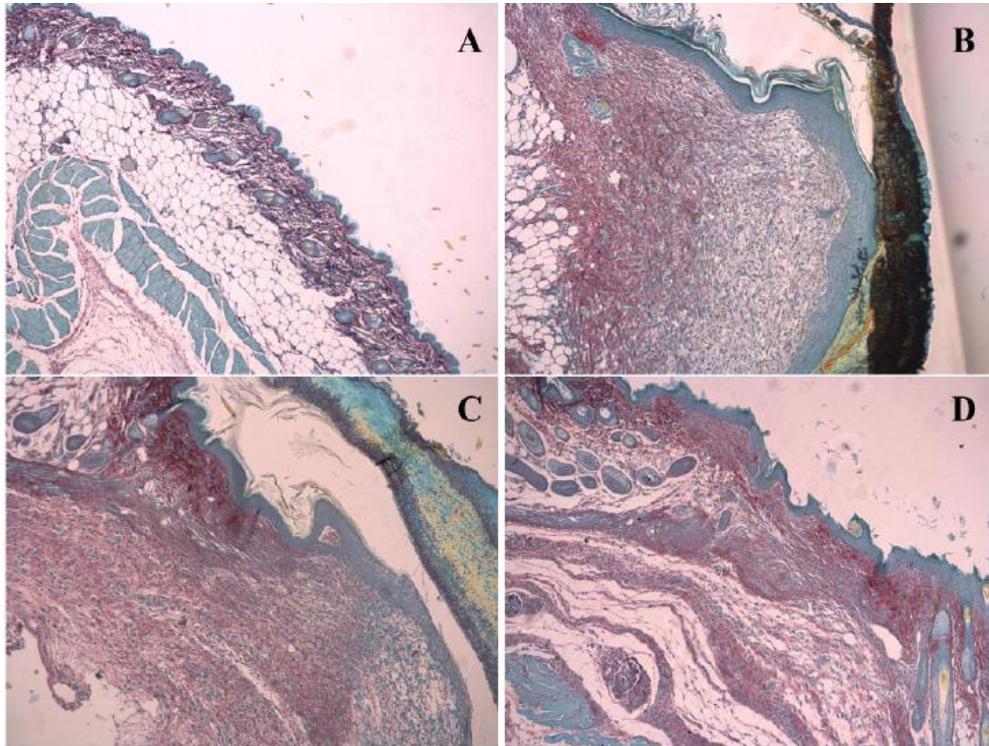
En este caso, se observa que para el día 7 es donde se contabiliza la mayor cantidad de vasos sanguíneos, lo cual es consecuente para la etapa de regeneración en la que se encuentra. Debido a que, el n era muy bajo y hubo una notable desviación estándar, se decidió no hacer un análisis estadístico ya que probablemente esa muestra no iba a ser representativa. Sin embargo, el gráfico permite observar que el número de vasos para los animales con tratamiento experimental se mantiene constante, mientras que para el caso de los animales con tratamiento control con excipiente la cantidad disminuye del día 7 al 14 para luego mantenerse constante. Para el día 14 y 28 el tratamiento experimental cuenta con más vasos que el control.

### *Depósito de colágeno*

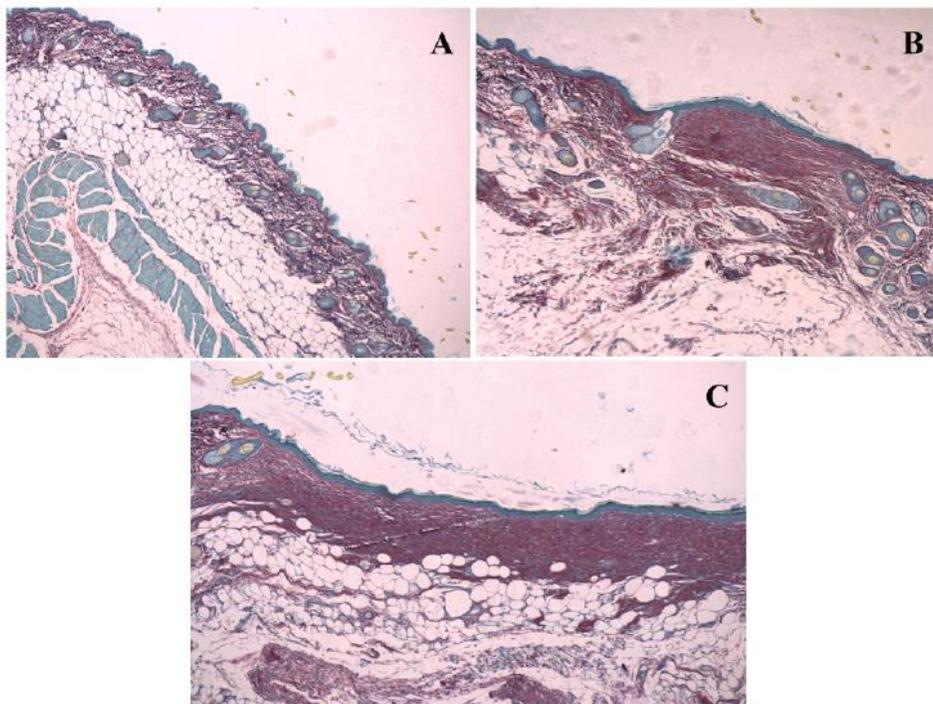
En las figuras 52, 53, 54 y 55, se puede observar el depósito de las fibras de colágeno a través del tiempo y bajo los diferentes tratamientos.



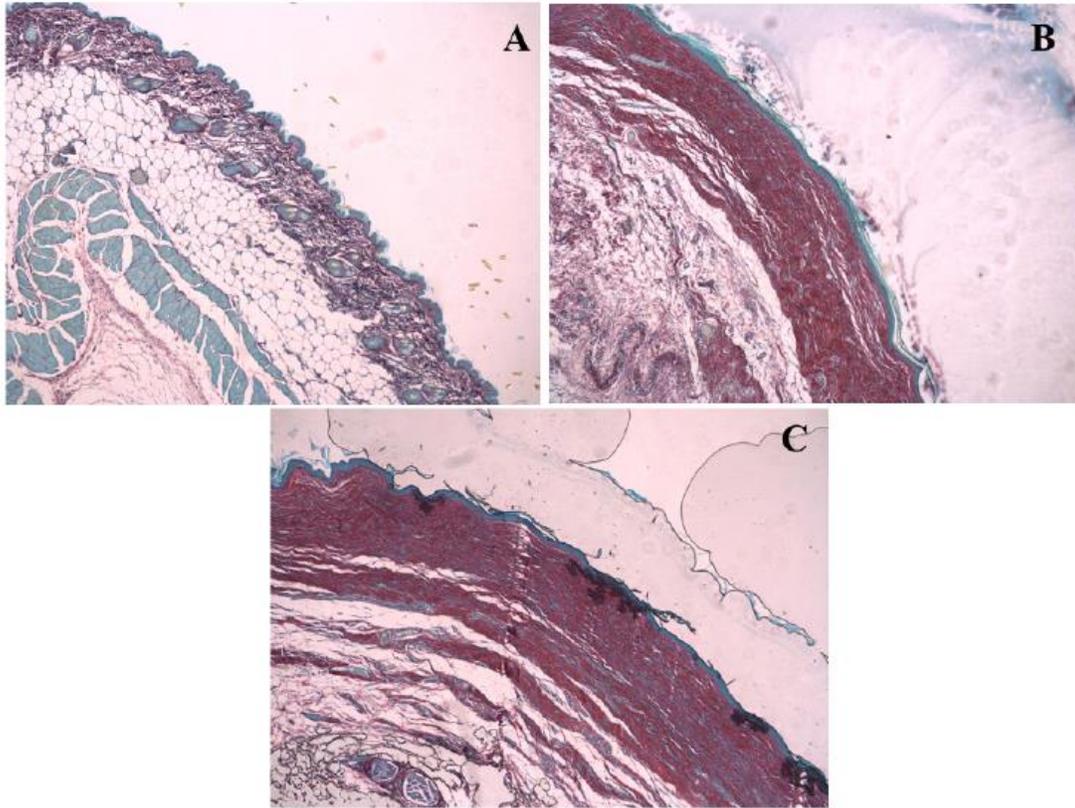
**Figura 52.** Corte histológico de una tinción con RS de piel de ratón sana (A), piel con lesión sin tratamiento en el día 3 (B), piel con lesión y excipiente en el día 3 (C) y piel con lesión y llantén en el día 3 (D). Aumento: 40x.



**Figura 53.** Corte histológico de una tinción con RS de piel de ratón sana (A), piel con lesión sin tratamiento en el día 7 (B), piel con lesión y excipiente en el día 7 (C) y piel y llantén en el día 7 (D). Aumento: 10x.



**Figura 54.** Corte histológico de una tinción con RS de piel de ratón sana (A), piel con lesión y excipiente en el día 14 (B) y piel con lesión y llantén en el día 14 (C). Aumento: 10x.



**Figura 55.** Corte histológico de una tinción con RS de piel de ratón sana (A), piel con lesión y excipiente en el día 28 (B) y piel con lesión y llantén en el día 28 (C). Aumento: 10x.

Como se esperaba, conforme avanza el tiempo las fibras de colágeno se van depositando en el área de lesión, de manera muy similar entre los diferentes tratamientos.

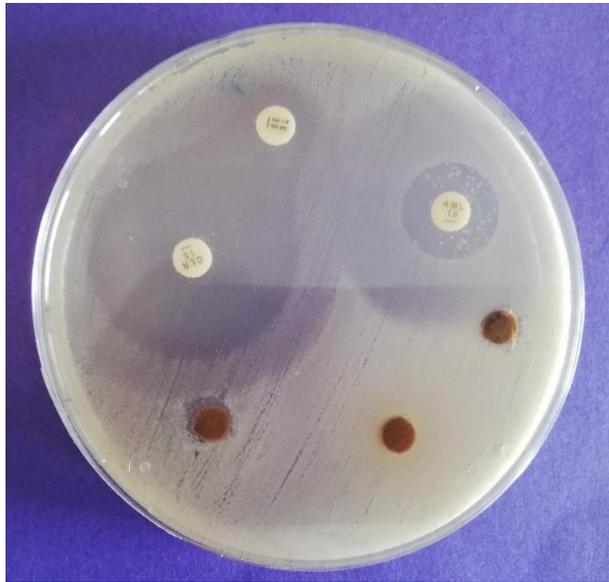
**OE5. Evaluar la actividad biológica de los dos mejores extractos de *P. major* (objetivo 4) en un modelo de infección de *H. pylori in vitro***

En todas las pruebas llevadas a cabo se obtuvo los mismos los resultados, los cuales se muestran en las figuras 56 y 57.

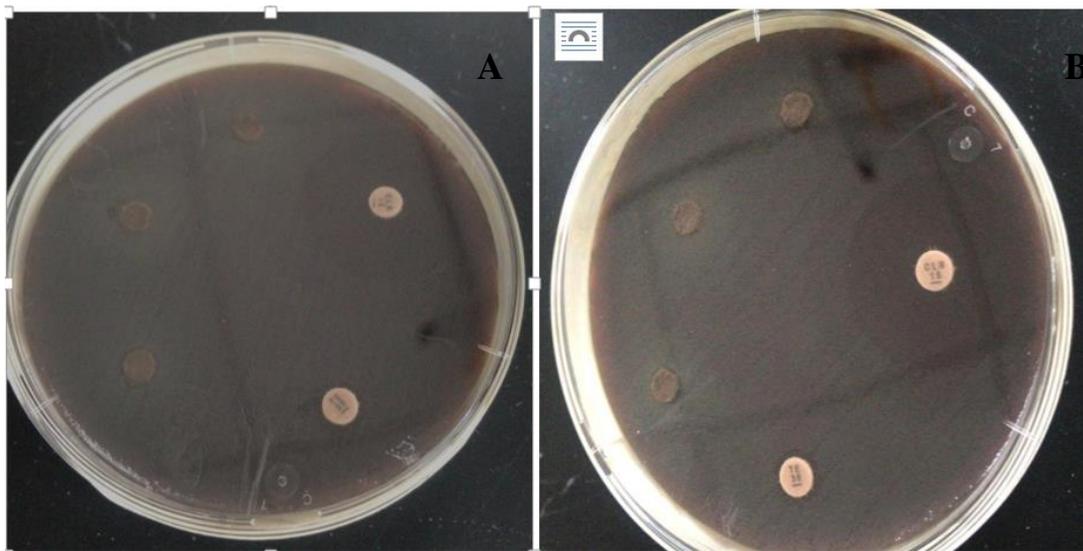
En la figura 56 se puede ver la sensibilidad de la bacteria *Pseudomonas* sp. a los antibióticos al observar el tamaño de los halos de inhibición, asimismo puede observarse que para esta bacteria no tiene ningún efecto los extractos probados.

En la figura 57 se puede ver la reacción de la bacteria *H. pylori* ante los extractos, lo cual no se observó ninguna reacción de inhibición. Como no se tuvo ninguna inhibición con los extractos no se puede montar tampoco el ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM).

En el trabajo publicado por Cogo *et al*, 2010, no se reportó ninguna inhibición de parte del extracto de *Plantago major* L contra *H. pylori*.



**Figura 56.** Prueba de inhibición de antibióticos con la cepa *Pseudomonas* sp.: sensidiscos blancos (CLR Claritromicina, TE Tetraciclina, AML Amoxicilina), sensidiscos café prueba de cada extracto.



**Figura 57.** Prueba de inhibición de antibióticos con *H.pylori*. Comportamiento de las cepa 700392 (A) y la cepa 700824 (B) con los antibióticos claritromicina (CLA) como control positivo de inhibición y (TE) tetraciclina como control negativo de inhibición para las cepas.

En la figura se observa que los sensidiscos con los extractos no presentan ninguna inhibición para la bacteria. Los halos de inhibición apenas se notan alrededor del antibiótico Claritromicina dado el color oscuro del agar sangre y el pequeño tamaño de las colonias de *H pylori*.

## 9. Discusión y conclusiones

El uso de plantas en la medicina natural es una práctica que se ha venido haciendo desde hace miles de años en las diferentes culturas. Sin embargo, no siempre se respalda con evidencia científica. En algunos casos, las pruebas se realizan con los extractos crudos sobre las diferentes condiciones de salud, pero dejando de lado el análisis de la diversidad de compuestos que pueden estar presentes ejerciendo el efecto biológico.

En primera instancia, de acuerdo con los resultados de los tratamientos de inducción de cultivos celulares de *P. major*, el medio seleccionado es el M27.7 50S, ya que fue el único que generó callos friables. Se sugiere además, dar seguimiento a las líneas celulares ya que el momento óptimo de colecta de material para su liofilización y elaboración de extractos. se encuentra entre la semana 6 y la 8. No se recomienda los subcultivos de callos para esta especie, ya que no se logró evitar la oxidación de los mismos en medios con carbón activado, ni mediante el uso de soluciones antioxidantes.

En la toma de decisiones se puede contemplar además, que el medio M27.7 contiene una concentración menor del regulador de crecimiento TDZ (2,5 mg/l), en comparación con M28.7 (3 mg/l), lo cual no sólo significa una economía en el gasto del reactivo, sino que además la exposición prolongada a algunos reguladores de crecimiento sintéticos en plantas, puede tener efectos adversos como la variabilidad genética no deseada (Danee *et al*, 2015).

Callos procedentes incluso de un mismo explante difieren en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos, es entonces cuando las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos callogénicos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación, que proporciona a los cultivos características propias y únicas, aun cuando éstos provengan de una misma planta y todavía más, de un mismo explante (Calva y Pérez, 2005).

Por tanto, en cuanto al establecimiento de cultivos celulares es importante encontrar condiciones de cultivo no sólo para que las células crezcan y se dividan rápidamente sino también para que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés. Entre los reguladores de crecimiento más usados en cultivos de células vegetales están las auxinas y citocininas (Calva y Pérez, 2005). El thidiazurón o TDZ (citocinina), ha sido reportado en diversas publicaciones científicas relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales para la inducción de callogénesis a través de la promoción de la proliferación celular (Pérez, 2013).

Esta investigación contempló el porcentaje de formación de callo, el color y la friabilidad, como parámetros de referencia de la idoneidad del proceso de inducción de callogénesis, tal y como lo recomienda Chitra *et al*, 2009, siendo los valores óptimos de inducción un 100% de formación de callos amarillo-cremosos y friables. De acuerdo con los resultados y contemplando las tres variables en estudio, el mejor tratamiento para la inducción de cultivos celulares en *P. major* corresponde al M27.7 50S.

En segunda instancia, tal y como se mencionó al inicio, esta reportado que extractos de hoja de *P. major* favorece la regeneración de heridas. A nivel de estudios *in vitro*, se ha observado que este, favorece no solo la migración celular, sino que también la proliferación ya sea de las células epiteliales como de los fibroblastos de la dermis, aspecto clave durante el proceso regenerativo (Velasco *et al*, 2006; Zubair *et al*, 2016). Consistente con lo observado en este estudio, Zubair y colaboradores (2016), encontraron que una concentración de 0,1 mg/mL presentaba un efecto biológico importante, pero una concentración de 10 mg/mL mostraba efectos negativos en la

proliferación/migración, lo que es también presentado en los resultados. Por su parte, Velasco y colaboradores observaron que este mismo efecto se observó en otro tipo de células cuando eran expuestas a extractos hidroalcohólicos de *Plantago major* en dosis de 0,4 y 0,2 mg/mL. Es importante entonces ver que esta planta estimula a las células en bajas concentraciones, lo cual es bastante provechoso a la hora de escalar un posible producto. A pesar de estos hallazgos *in vitro*, hay que considerar que la regeneración de las heridas es un proceso dinámico que consiste en cuatro fases que se sobreponen: hemostasis, inflamación, proliferación y remodelación y que involucra la participación del sistema inmune, así como del circulatorio, por lo que es necesario analizar este mismo efecto en un organismo vivo (Ashkani *et al*, 2019). De manera general, dentro de los componentes que se asocian a un efecto en la regeneración esta: polisacáridos, lípidos, derivados de ácido cafeico, flavonoides, glicósidos iridoides y terpenoides proveen actividad antiinflamatoria, antioxidantes, analgésica, inmunomoduladora, antiulcerativa y antibiótica (Ashkani *et al*, 2019), pero, el mecanismo preciso por el cual se da las propiedades aún no está claro (Zubair *et al*, 2016).

Como se pudo ver en los resultados, el porcentaje de cierre es mayor para el grupo experimental durante la fase aguda de la regeneración (día 7). Esto puede deberse a que se ha identificado que en las hojas de *P. major* hay moléculas bioactivas que tienen actividad antiinflamatoria (Zubair *et al*, 2011). Dicha propiedad, acorde Adom *et al*. (2017) puede deberse a la presencia de glucósidos iridoides como la aucubina y los flavonoides como la baicaleína y la hispidulina. Sin embargo, a partir del día 7 hasta el 28 se observa que la ventaja que tenía el porcentaje de cierre sobre los otros dos grupos ya no está presente. Esto pudo haberse debido a que solamente durante los primeros 7 días se aplicó el extracto y que era necesario aplicarlo durante todos los 28 días o bien era necesario incrementar la concentración del extracto. A pesar de ello, Ashkani *et al*, 2019 usaron extractos hidroalcohólicos al 5% en carboximetilcelulosa que aplicaron sobre ratas Sprague Dawley. Ellos probaron que estos extractos generaron un efecto antiinflamatorio e incrementaron el colágeno, vascularización y la proliferación de fibroblastos. Por otro lado, en otros ensayos se han utilizado concentraciones considerablemente mayores de *P. major*, las cuales van en un rango de concentración desde un 20% como mínimo hasta un 50% como máximo donde se han obtenido diferencias significativas en comparación con los controles (Amini *et al*, 2010; Moradi *et al*, 2018; Reyes, 2014; Rondo, 2019; Yambay, 2013).

El conteo de PMN se realizó solo para las muestras colectadas el día 3 debido a que para ese momento es cuando se espera el infiltrado de PMN, en la fase de inflamación. La presencia de una menor cantidad de PMN/mm<sup>2</sup> en las áreas analizadas sugiere que el tratamiento experimental tiene un efecto sobre el infiltrado inflamatorio. Nuevamente se hace una atribución a los compuestos con actividad antiinflamatoria que se ha reportado se encuentran presentes en las hojas de *P. major* como el posible motivo de un menor infiltrado inflamatorio (Adom *et al*, 2017; Zubair *et al*, 2016).

Las medidas de la epidermis se realizaron a partir del día 7 debido a que para ese momento ya se puede evidenciar la presencia de esta capa. En todos los grupos fue posible observar la reepitelialización en día 7, lo que indica el inicio de la etapa proliferativa de la regeneración (Gantwerker y Hom, 2012). Conforme avanza el tiempo, la epidermis se vuelve más delgada, lo cual es lo esperado ya que en la fase proliferativa el tejido se contrae de manera más pronunciada y la epidermis se reestructura de tal manera que pierde su grosor (González *et al*, 2016). Para el día 7, puede notarse que el grosor de la epidermis de los animales tratados con el extracto de *P. major* es más delgada, lo que puede deberse al efecto de los compuestos bioactivos cuya acción deriva en una aceleración del proceso de regeneración y el incremento de la proliferación de los fibroblastos, donde se ha reportado que esta actividad se le atribuyen a los taninos (Rondo, 2019). Sin embargo, cuando se llega al día 14 no se observan diferencias en el grosor de la epidermis de los grupos en estudio. Lo anterior sugiere que probablemente, era necesario continuar la aplicación del gel/crema con el extracto durante más tiempo o bien, incrementar la concentración. La misma situación ocurre para el

día 28, donde ya se encuentra el tejido en la etapa de maduración / remodelación (Wallace y Zito, 2019) donde no se observan diferencias significativas entre los grupos en estudio.

Al comparar el grosor de la dermis, esta es más gruesa que la epidermis y tiene una composición distinta. El grosor se mide a partir del día 7 (en fase proliferativa) debido a que antes aún el tejido no tiene una dermis verdadera, si no componentes que forman una prematriz celular que va a dar lugar a la dermis más adelante conocido como tejido de granulación. Para el día 7 la dermis de los animales con tratamiento control con excipiente y control sin tratamiento es semejante entre ellas y es más gruesa en ambos casos que el grupo experimental. Sin embargo, para el día 14 y el 28 se nota que ya la diferencia entre ambos lo más probable, lo que viene nuevamente a preguntarse por la aplicación del extracto. Si bien es cierto, esta es una variable que pocas veces se contabiliza como marcador de la regeneración, valió la pena analizarlo contra el grosor de una dermis normal o sana.

El conteo de vasos sanguíneos se realizó a partir del día 7 debido a que como el tejido se encuentra en fase proliferativa es a partir de este momento que se da la angiogénesis, es decir, la formación de vasos sanguíneos (Schultz *et al*, 2011). En el día 7, parece ser que la vasculización es superior en el grupo experimental, pero de nuevo, debido al bajo n y la alta desviación, se decidió no realizar análisis estadístico, sino que se sugiere repetir el estudio piloto con un n mayor. Adicional a eso, es necesario buscar otro método de conteo para los futuros ensayos, donde se utilice un marcador específico para ser detectado por inmunohistoquímica y utilizar un sistema de conteo automatizado. Para el día 14 y 28 hay una aparente mayor cantidad de vasos sanguíneos en los animales tratados con el extracto de *P. major*, lo que da como posibilidad de que sus compuestos ayuden al proceso de angiogénesis en la regeneración tisular.

Con respecto a la presencia de fibras de colágeno maduras, aunque se haya evaluado cualitativamente, esta se puede observar gracias a que la tinción de RS es muy específica ya que tiñe el colágeno rojo (Segnani *et al*, 2015). Se puede observar que conforme se avanza en el tiempo el depósito de colágeno es mayor, lo que es congruente con el proceso de regeneración y favorecedor para restablecer las propiedades mecánicas de esta capa (González *et al*, 2016).

De manera general, los efectos favorecedores en el proceso de regeneración de la piel al usar el extracto de *P. major* se observan principalmente en las primeras etapas del proceso de y que esto podría deberse a varias causas. Primero, la concentración usada del extracto, de acuerdo a lo reportada en otros estudios, podría considerarse estudiar diferentes concentraciones. De igual manera se debe determinar que parte de la planta podría presentar más metabolitos con actividad biológica o bien analizar la estabilidad de los principios activos de la planta. Finalmente, es importante mencionar que el tamaño de la muestra de los animales en estudio para este proyecto fue muy pequeña, debido a que era un estudio de tipo exploratorio o bien piloto, por lo que merece la pena repetirlos con un n mayor para cada tratamiento y aplicando el gel durante todo el estudio. También, se debe tomar en cuenta que los efectos reportados fueron solo para hembras. El uso de machos debe también considerarse para futuros ensayos puesto que se ha reportado que las hormonas sexuales pueden afectar el proceso de regeneración en ratones (Chua *et al*, 2019). Sin embargo, debido a que este ensayo fue considerado un piloto y se trabajó con un tamaño de muestra tan pequeño, lo ideal era mantener las condiciones lo más semejantes posibles con el fin de que la única diferencia fueran los tratamientos aplicados, por lo que haber añadido machos hubiera supuesto otro factor a considerar a la hora de evaluar los resultados.

Por lo anterior se concluye que los extractos de llantén podrían favorecer positivamente la regeneración de heridas de la piel. Sin embargo, es necesario continuar investigando tanto los componentes como los mecanismos detrás del efecto visualizado en este estudio.

## 10. Recomendaciones

Haga sugerencias sobre aspectos del problema no tratado en el trabajo y sobre proyectos futuros que podrían desprenderse del mismo.

1. Mejorar los procesos de compras al exterior por parte del Departamento de Aproveccionamiento
2. Capacitar a los funcionarios del Dep de Aproveccionamiento en la gestión de compras de insumos biológicos en el exterior.

## 11. Agradecimientos

A la empresa Laboratorios Lisan S.A y su personal, que a través de su sección de Investigación y Desarrollo de Procesos (I+D), contribuyó al desarrollo de este proyecto, mediante la ejecución de actividades concretas para el alcance de los objetivos, así como mediante apoyo financiero.

Al Instituto Clodomiro Picado y su personal, especialmente a la Dra. Marieta Flores, por su colaboración en la realización del trabajo final de graduación de la estudiante Daniela Porras.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC, por el financiamiento de este proyecto.

## 12. Referencias

Abd Razik, B., Hasan, H. y Murtadha, M. 2012. The study of antibacterial activity of *Plantago major* and *Ceratonia siliqua*. *The Iraqi Postgraduate Medical Journal*. Vol. 11 No. 1: pp 130–135

Adom, M.; Taher, M.; Mutalabisin, M.; Amri, M.; Abdul, M.; Wan, M.; Sengupta, P y Susanti, D. (2017). Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 96, pp 348-360.

Amini, M., Kherad, M., Mehrabani, D., Azarpira, N., Panjehshahin, MR y Tanideh, N. (2010). Effect of *Plantago major* on Burn Wound Healing in Rat. *Journal of Applied Animal Research*, 37(1), pp 53-56. doi: 10.1080/09712119.2010.9707093

Ashkani, S.; Khoshneviszadeh, M; Noorafshan, A.; Miri, R.; Rafiee, S.; Hemyari, K.; Kardeh, S. et al. (2019). The Healing Effect of *Plantago Major* and *Aloe Vera* Mixture in Excisional Full Thickness Skin Wounds: Stereological Study. *World J Plast Surg*. Vol 8, No. 19. pp 51-57

Blanco, B.; Saborío, A.; Garro, G. (2008). Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor). *Tecnología en Marcha* Vol. 21 No. 2, pp 17-24

Brawner, K., Morrow, C., Smith, P. (2014). Gastric Microbiome and Gastric Cancer. *Cancer Journal*, 20, 211-216.

Calva, G.; Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6 (11): 1-16.

Cao, L., Yu, J. (2015). Effect of *Helicobacter pylori* Infection on the Composition of Gastric Microbiota in the Development of Gastric Cancer. *Gastrointestinal Tumors*, 2, 14-25.

Chitra, R.; Rajamani, K.; Vadivel, E. (2009). Regeneration of plantlets from leaf and internode explants of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. *African Journal of Biotechnology*, 8 (10): 2209-2211.

Chua, M., Rong, M., Tuba-ang, K., Silangcruz, JM., Tanseco, P., Ming, J., Kim, W., Chung, C & Farhat, W. (2019). The impact of sex hormones on genital wound healing in mice: a comparative study. *Journal of Pediatric Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2019.09.001>

Claros, P.; Bilbao, P.; Damiani, E.; González, E. Estensoro, M.; Álvarez, M. (2007). Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *Biofarbo* 15, 37-42.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cogo, L *et al.* (2010). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *BJM*. 41(2): 304-309.

Danaee, M.; Farzinebrahimi, R.; Kadir, M.; Sinniah, U.; Mohamad, R.; Taha, R. (2015). Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. *Braz. J. Bot.* DOI10.1007/s40415-015-0140-3

Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M. (2010). Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127, 2893-2917.

Fons, F.; Tousch, D.; Rapior, S.; Gueiffier, A.; Roussel, J.; Gargadennec, A.; Andary, C. (1999). Phenolic profiles of untransformed and hairy root cultures of *Plantago lanceolata*. *Plant Physiol. Biochem* 37 (4), 291-296.

Gantwerker, E y Hom, D. (2012). Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Clinics in Plastic Surgery*, Vol. 39 No.1, pp 85-97. doi: 10.1016/j.cps.2011.09.005

Garro, G. y Alvarenga, S. (2009). Un protocolo para el cultivo in vitro y la micropropagación masiva de llantén (*Plantago major*). *Tecnología en Marcha* Vol. 22 No. 3, pp 25-33.

González, O., Costa, T., Andrade, Z y Medrado, A. (2016). Wound healing – A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614-620. Recuperado de: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S036505962016000500614&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962016000500614&lng=en&tlng=en)

Harput, U; Genc, Y.; Saracoglu, I. (2012). Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food and Chemical Toxicology* 50,1554–1559.

Kharma, A.; Hassawi, D. (2006). The genetic relationships and antimicrobial activity of *Plantago* species against pathogenic bacteria. *World Journal of Agricultural Sciences* 2 (3), 311-318.

Moradi, N., Shafie, F., Moeni, M., Kashfi, S., Rashidipour, M., Chehelcheraghi, F., Ali, S y Rasoulilian, B. (2018). The Wound Healing Effect of Plantago Major Leaf Extract in a Rat Model: An Experimental Confirmation of a Traditional Belief in Persian Medicine. *Herbal Medicines Journal*, 3(1), pp 26-30. doi: 10.22087/hmj.v3i1.702

Montero, V.; Hernández, A.; Masís, F.; Camachol, J.; García, F.; Barboza, K.; López, G.; Orozco, J. (2010). Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 24 (3), 3-14.

Peláez, P.; Herencia, D. (2008). Determinación y evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de una crema de Plantago major (llantén) en *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. *Investigaciones Amazonenses* 1 (1), 23-26.

Pérez, T. (2013). Multiplicación in vitro de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales*, 23(3), 57-61.

Rakotondramasy, V.; Mouriès, C.; Cachet, X.; Neghra, A.; El Mourabet, M.; Tillequin, F.; Koch, M.; Deguin, B. (2010). A novel series of cytotoxic iridoid glucosides derived from aucubin: Design, synthesis and structure activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 2314-2320.

Reyes, K. (2014). Elaboración de crema cicatrizante a base de romero (*Rosmarinus officinalis*) y llantén (*Plantago major*). Tesis de Grado para la obtención de título de Bioquímica Farmacéutica. Universidad Técnica de Machala. Recuperado de: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1426/7/CD00284-TESIS.pdf>

Rondo, D. (2019). Eficacia del Plantago major “Llantén” en cicatrización y calidad de cicatriz en quemadura comparado con alantoína en *Rattus rattus*”. Tesis para obtener el título profesional de médico cirujano. Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú. Recuperado de: [http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/29751/Rondo\\_HD.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/29751/Rondo_HD.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Ru, Z.; Mao, Li.; Zheng, Jia. (2008). *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 199–214

Samuelsen, A. (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A. Review of *Journal of Ethnopharmacology* Vol.71, pp 1–21

Schultz, G., Chin, G., Moldawer, L & Diegelmann, R. (2011). Principles of wound healing. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*, 423- 51 450. Edición 2011. University of Adelaide Press. doi: 10.1017/UPO9781922064004.024

Segnani, C., Ippolito, C., Antonioli, L., Pellegrini, C., Blandizzi, C., Dolfi, A & Bernardini, N. (2015). Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon, 10(12). doi: 10.1371/journal.pone.0144630

Suomi, J.; Sirén, H.; Wiedmer, S.; Riekkola, M. (2001). Isolation of aucubin and catalpol from *Melitaea cinxia* larvae and quantification by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta* 429, 91–99.

Velasco, R.; Tapia, R.; Roman, R.; Vega, E. y Perez, M. (2006). Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *J Ethnopharmacol.* Vol. 103, pp 36–42.

Wallace, H y Zito, P. (2019). Wound Healing Phases. NCBI Bookshelf. Libro en Línea. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>

Yambay, P. (2013). Elaboración y control de calidad de una crema a base de extractos hidroalcohólicos de berro (*Nasturtium officinalis*) y llantén (*Plantago major*) y comprobación de su actividad cicatrizante en heridas inducidas en ratones. Tesis de Grado para la obtención de título de Bioquímica Farmacéutica. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado de: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2473/1/56T00343.pdf>

Zhong, G.; Ling, K.; Xi, Z.; Yi, S.; Shan, S.; Huai, L.; Cheng, L.; Xiao, N.; Yan, L.; Xue, D.; Wei, X.; Han, S. (2012). Four new indole alkaloids from *Plantago asiatica*. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2, 249–254.

Zubair, M., Nybom, H., Lindholm, C y Pumpunen, K. (2011). Major polyphenols in aerial organs of greater plantain (*Plantago major* L.), and effects of drying temperature on polyphenol contents in the leaves. *Scientia Horticulturae*, Vol. 128, pp 523-529. doi: 10.1016/j.scienta.2011.03.001

Zubair, M.; Nybom, H.; Lindhol, C.; Brandner, J. y Rumpunen, K. (2016). Promotion of wound healing by *Plantago major* L. leaf extracts—ex-vivo experiments confirm experiences from traditional medicine. *Natural product research*, Vol. 30, No. (5), pp. 622-624

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN**  
**DIRECCIÓN DE PROYECTOS**

**DOCUMENTO 2**

**Código del Proyecto:**

1510044

**Nombre del proyecto:**

Optimización del protocolo de establecimiento de cultivos celulares de Plantago major (llantén) para la comprobación de la actividad cicatrizante de un producto farmacéutico y determinación efecto biológico contra la infección de H. pylori en modelos in vitro

**Departamento Académico responsable:**

Escuela de Biología

**Instituciones externas participantes:**

LISAN

INSTITUTO CLODOMIRO PICADO, UCR

**Investigador responsable:**

**MSc. Giovanni Garro Monge**

**Otros investigadores:**

M.Sc. Silvia E. Castro Piedra

MSc. Karol Jiménez Quesada

PhD. Virginia Montero Campos

**Período cubierto:**

Enero 2018 - Diciembre 2020

## **1. Cumplimiento de objetivos**

**Objetivo general:** Optimizar el protocolo de establecimiento de cultivos celulares de *Plantago major* (llantén) para la comprobación de la actividad cicatrizante de un producto farmacéutico y determinar el efecto biológico contra la infección de *H. pylori* en modelos *in vitro*.

OE	Productos	Fecha de cumplimiento	% avance	Comentarios
<p>1. Optimizar el sistema de callogénesis en <i>P. major</i> para la obtención de compuestos bioactivos</p>	<p>Protocolo optimizado para la inducción de callogénesis de <i>P. major</i></p> <p>Cultivos celulares de <i>P. major</i> en medio semisólido y líquido</p>	<p>Diciembre 2017</p>	<p>100%</p>	<p>Se cuenta con plántulas establecidas en el laboratorio. Se trabajó en la optimización del protocolo de inducción de callogénesis, determinándose que el medio M27.7 con sacarosa, facilita la inducción parcial de callos embrionarios en llantén, en un tiempo de entre 6 y 7 semanas, tiempo posterior al cual se realizaría la colecta del material.</p> <p>Se determinó que el uso de maltosa como fuente de carbono, soluciones antioxidantes, y PVP, va en detrimento de la viabilidad de los callos, los cuales se evaluaron en función del % de formación, color y friabilidad, para los tratamientos evaluados. El uso de carbón activado y el subcultivo de materiales permite el mantenimiento de los cultivos celulares por un período máximo de 8 semanas..</p> <p>Se determinó que bajo las condiciones de trabajo no fue posible establecer cultivos celulares líquidos.</p>
<p>X. Establecer un modelo de infección de <i>H. Pylori</i> <i>in vitro</i> para validar la actividad biológica de compuestos elaborados a partir de <i>P. major</i></p>	<p>Modelo de infección de <i>H. pylori</i> en línea celular gástrica estandarizado para el estudio y valoración de compuestos contra la infección de <i>H. Pylori</i>.</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Se cambio objetivo por el establecimiento de un modelo <i>in vivo</i> de regeneración (ver objetivo 5 que está implícito)</p>
<p>2. Elaborar, caracterizar y cuantificar extractos crudos de <i>P. major</i> a partir de callo y hojas secas</p>	<p>Protocolo de extracción de metabolitos secundarios</p> <p>Extractos crudos de <i>P. major</i> elaborados a partir de hojas secas de campo, invernadero y cultivo <i>in vitro</i>, así como de cultivos celulares en medio semisólido y líquido.</p> <p>Marcador bioquímico para la cuantificación de metabolitos secundarios definido</p> <p>Protocolo de cuantificación de metabolitos secundarios</p> <p>Perfil bioquímico de la composición de los extractos de <i>P. major</i></p>	<p>Junio 2018</p>	<p>100%</p>	<p>Los extractos de plantas de campo, plántulas <i>in vitro</i> y callo fueron elaborados.</p> <p>El análisis de los perfiles bioquímicos se realizó a través de los cromatogramas generados con las cromatografías GC-MS (% relativo según área bajo la curva). No fue posible establecer un marcador bioquímico para la cuantificación de metabolitos secundarios, a partir de estándares de verbascósidos y aucubina.</p>

3. Evaluar la actividad cicatrizante de extractos de <i>P. major</i> en líneas celulares.	Datos cuantificables y explicables sobre el efecto en la migración de células de los 5 extractos vegetales propuestos, en modelos <i>in vitro</i> .	Octubre 2019	100%	Se realizó el ensayo de "SWH" para determinar cuál era el extracto y la concentración a la cual se inducía la mayor migración celular. El extracto más eficiente fue el elaborado a partir de plantas de campo y la concentración más eficiente fue entre 0.02% y 0,06% (p/v), donde se alcanzó la mejor respuesta significativamente diferente a los demás extractos y al control.
4. Evaluar la actividad cicatrizante de extractos de <i>P. major in vivo</i> .	Datos cuantificables y explicables sobre la actividad biológica de extracto de <i>P. major</i> , en modelos <i>in vivo</i>	Octubre 2019- Enero 2020	100%	Con los datos obtenidos en el objetivo anterior, se decidió usar una concentración de 4% para elaborar un gel. Este gel se elaboró y se aplicó diariamente durante 7 días a ratones con heridas inducidas controladas. A nivel macroscópico no se observó diferencia con respecto al control, tampoco en la tasa de regeneración, pero a nivel histológico, si se observó una disminución importante de la inflamación, así como un cambio en la matriz extracelular formada durante la regeneración.
5. Evaluar la actividad biológica de los dos mejores extractos de <i>P. major</i> (objetivo 4) en un modelo de infección de <i>H. pylori in vitro</i>	Determinar la viabilidad de las células gástricas infectadas con <i>H. pylori</i> en presencia de los dos extractos seleccionados en el objetivo 4  Determinar la viabilidad y/o presencia de <i>H. pylori</i> en el modelo de infección en presencia de los dos extractos seleccionados en el objetivo 4	Octubre 2019- Enero 2020	100%	No se observaron resultados satisfactorios de inhibición bacteriana a partir de todos los ensayos realizados con extractos de Plantago sobre cultivos de <i>H. pylori</i> . En vista de la nula actividad antimicrobiana encontrada en estos ensayos se descartó la realización de ensayos de actividad sobre células gástricas infectadas con <i>H. pylori</i> .
<b>Completado</b>			100%	

### 1. Cumplimiento del plan de difusión

Nombre de obra	Tipo de obra	Estado (aceptado por publicar y publicado)	Base de datos de indexación	Nombre de Evento	Contó con Comité científico (Si ó NO)

## 2. Participación Estudiantil:

Nombre de obra	Tipo	Autores
Evaluación de la capacidad de un gel elaborado a partir de un extracto acuoso de <i>Plantago major</i> para inducir regeneración de la piel en un modelo murino	TFG	Daniela Porras y Silvia Castro
Cantidad de estudiantes asistentes	2	

## 3. Ejecución Presupuestaria:

Se deberá indicar el porcentaje de la ejecución presupuestaria que se logró en el proyecto. Para ello se debe considerar el monto de los recursos ejecutados más los recursos comprometidos, monto que se debe relacionar con el monto total asignado en cada uno de los años de período del proyecto. Además, se debe justificar, cuando corresponda, la sub-ejecución presupuestaria

## 4. Limitaciones y problemas encontrados

A inicios del 2018 se realizó la solicitud de compra de las células a la empresa ATCC por medio del departamento de aprovisionamiento, en ese momento se comprometió el respectivo presupuesto. Posterior a esta solicitud, la empresa ATCC indicó después de varios meses sin respuesta (aproximadamente 5 meses), que la Institución mantenía pendiente un pago desde año 2016 y por lo tanto, hasta que no se cancelara el monto, ellos no iban a despachar el pedido actualmente solicitado. Esta comunicación fue atendida por los compañeros de Aprovisionamiento y se realizó una reunión con la Dirección de Proyectos en la cual se expuso dicha situación y a partir de esto los compañeros de Aprovisionamiento gestionaron el presupuesto extraordinario que fue aprobado por la VIE para atender este pendiente.

Posterior a la cancelación del pago pendiente con la empresa ATCC, se realizó el rebajo del monto correspondiente a la nueva compra por parte de Aprovisionamiento, pero, a pesar de ello, los intentos de comunicación con la empresa proveedora ATCC para que enviaran la orden de compra fueron atendidos finales de diciembre del 2018. Por tanto, en vista de los antecedentes expuestos, se solicitó inicialmente la ampliación del proyecto por un período de 10 meses considerando que el trámite de compra y llegada de las líneas podría tardar entre 3 y 4 meses, solicitamos la asignación de 4 horas (REC) para la M.Sc. Silvia Castro Piedra y 4 horas VIE para la Dra. Virginia Montero Campos durante el segundo semestre 2019. Además de 2 horas por reconocimiento para el coordinador del proyecto por el total de meses solicitados como ampliación.

El pedido de las células y las cepas bacterianas llegó a inicios de febrero del 2019 descongelado, lo cual dañó en su totalidad el producto. Ante tal situación de urgencia, la VIE brindó el dinero para volver a comprar las células y el departamento de Aprovisionamiento realizó la compra en setiembre. Sin embargo, nuevamente se perdió la comunicación con la empresa.

Adicional a este problema de las células que no llegaban, el laboratorio y equipo donde se iba a realizar los ensayos correspondientes a los objetivos inicialmente planteados, las instalaciones estaban en muy mal estado y saturadas con otros proyectos (situación ya solucionada), por lo que en ese momento (2019), representaba un riesgo para los otros usuarios y ensayos el manejo de microorganismos patógenos como lo es *H. pylori*.

A raíz de los anterior, se realizó un cambio de objetivo, se sustituyó el diseño de modelo de infección de *H. pylori in vitro*, por el análisis de la actividad regeneradora del extracto más eficiente de llantén, obtenido en los estudios *in vitro*. Este estudio *in vivo* se realizó exitosamente en modelos animales en

conjunto con el Instituto Clodomiro Picado y a través de la realización de un Trabajo Final de Graduación de la estudiante Daniela Porras, bajo la tutoría de la investigadora M.Sc. Castro Piedra.

#### **5. Observaciones generales y recomendaciones**

De acuerdo con la experiencia generada durante la ejecución del proyecto o actividad, haga las observaciones y recomendaciones que puedan contribuir al mejor desarrollo de futuros proyectos.

3. Mejorar los procesos de compras al exterior por parte del Departamento de Aprovevisionamiento
4. Capacitar a los funcionarios del Departamento de Aprovevisionamiento en la gestión de compras de insumos biológicos en el exterior.