



El extracto hidroalcohólico de *Plantago major* "llantén" incrementa la actividad de Catalasa en *Oryctolagus cuniculus* "conejos"

The hydroalcoholic extract of *Plantago major* "llantén" increases the Catalase activity in *Oryctolagus cuniculus* "rabbits"

Orlando Pretel-Sevillano^{1,*} ; Abhel Calderon-Peña¹ ; Patricia Torres-Plasencia¹ ; José Mostacero-León² ; Anthony J. De La Cruz-Castillo¹ 

¹ Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

² Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

RESUMEN

Esta investigación se avocó a determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Plantago major* "llantén" sobre el incremento de la actividad de Catalasa (CAT) en *Oryctolagus cuniculus* "conejos". Se utilizaron 15 especímenes, divididos en tres grupos; los primeros, sometidos a normotermia; los segundos a hipotermia, y los siguientes a hipotermia/ reperfusión; seguidamente se obtuvo el extracto hidroalcohólico a partir de las hojas de *Plantago major*, para luego administrarlos a los grupos destinados a hipotermia e hipotermia/ reperfusión, en una dosis diaria de 200 mg/Kg de peso corporal, por una semana antes de la inducción. Finalmente, a los tres grupos, se les extrajo muestras de sangre al inicio del experimento y a las dos y tres horas después. La actividad CAT fue mayor en el grupo tratado con *Plantago major* y sometido a hipotermia/reperfusión, alcanzando un valor promedio de $35,13 \pm 5,555$ UCAT/g Hb; frente a un $26,53 \pm 5,024$ UCAT/g Hb en hipotermia y un $21,97 \pm 3,223$ UCAT/g Hb en normotermia. Se concluye que *Plantago major* potenció el incremento de la actividad antioxidante de la CAT bajo condiciones de hipotermia / reperfusión.

Palabras clave: hipotermia; reperfusión; catalasa; *Plantago major*; *Oryctolagus cuniculus*.

ABSTRACT

This research aimed to determine the effect of the hydroalcoholic extract of *Plantago major* "llantén" on the increase in the activity of Catalase (CAT) in *Oryctolagus cuniculus* "rabbits". 15 specimens were used, divided into three groups; the former, subjected to normothermia; the second ones to hypothermia, and the following ones to hypothermia / reperfusion; The hydroalcoholic extract was then obtained from the leaves of *Plantago major*, to then be administered to the groups for hypothermia and hypothermia / reperfusion, at a daily dose of 200 mg/kg of body weight, for one week before induction. Finally, all three groups had blood samples drawn at the beginning of the experiment and two and three hours later. CAT activity was higher in the group treated with *Plantago major* and subjected to hypothermia / reperfusion, reaching an average value of 35.13 ± 5.555 UCAT/g Hb; compared to 26.53 ± 5.024 UCAT/g Hb in hypothermia and 21.97 ± 3.223 UCAT/g Hb in normothermia. It is concluded that *Plantago major* potentiated the increase in the antioxidant activity of CAT under hypothermic / reperfusion conditions.

Keywords: hypothermia; reperfusion; catalase; *Plantago major*; *Oryctolagus cuniculus*.

1. Introducción

Los Radicales Libres (RL) y el estrés oxidativo están asociados con un gran número de enfermedades, como el cáncer, la aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, diabetes mellitus, lesiones por isquemia-reperfusión, entre otras; pudiendo además causar destrucción de

las mitocondrias y el bloqueo en la generación de energía (Carrillo *et al.*, 2016; Núñez *et al.*, 2017; Rodríguez y Camejo, 2018; Mora *et al.*, 2019). En contraposición, el organismo secreta sustancias, como la melatonina que elimina los radicales libres; además de otras moléculas como la catalasa, glutatión sintasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glucosa deshidrogenasa y

superóxido dismutasa; enzimas antioxidantes que bloquean la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la respuesta inflamatoria (González-Ibarra et al., 2011; León-Páez et al., 2015; León et al., 2018).

Se ha demostrado que la generación masiva de radicales libres, así como la peroxidación de lípidos, se reducen al emplear la hipotermia terapéutica (HT); siendo esta una terapia potencial usada por siglos, estudiada ampliamente y actualmente está siendo recomendada por la Sociedad Americana del corazón, como tratamiento neuroprotector en el post paro cardiaco, así como para el tratamiento de las complicaciones asociadas a la lesión traumática cerebral, tales como hipertensión intracraneana; por no mencionar el hecho de que en Japón un 47% de los centros de neurotrauma la emplean (Alvis-Miranda et al., 2015; Gil et al., 2008).

Sumado a ello, la HT, preserva ATP, disminuye la concentración de ácido láctico y de otras neurotoxinas, disminuyen la producción de los RL, cambia el metabolismo celular, disminuye el consumo de O₂ entre 5 y 7% por cada 1 °C disminuido, mantiene la integridad celular cerebral y su estabilidad eléctrica, desvía a la izquierda la curva de disociación de la hemoglobina, reduce la entrada de calcio, del glutamato y la peroxidación de lípidos, atenúa la inflamación cerebral, suprime la actividad de las caspasas (apoptosis), atenúa la actividad astrocítica, inhibe el daño a la sustancia blanca y disminuye la liberación de glicina y la producción de óxido nítrico (Jaramillo-Magaña, 2011; Andresen et al., 2015; Tapia-Velasco, 2015; Lyden et al., 2018).

Ahora bien, dentro de la ingente cantidad de plantas medicinales, que constituyen una fuente natural de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas para el mundo en general; *Plantago major* "Llantén"; posee innumerables efectos farmacológicos; al ser antiinflamatorio, astringente, cicatrizante, diurético, expectorante, antidiarreico (Mostacero et al., 2011). Además de presentar monoterpenos, aucubina, vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos, flavonoides, mucílagos, taninos que le confieren propiedades antioxidantes (Soukup, 1987; Mostacero et al., 2011; Mostacero et al., 2019).

Por lo descrito en los párrafos anterior, y considerando que la exposición a periodos largos de HT profunda genera un flujo sanguíneo mínimo, comparable con cierto grado de isquemia, que se recupera tras el recalentamiento (reperusión) y que implicaría la liberación masiva de RL (Escalante y del Río, 2009; Viada et al.,

2017); la presente investigación, se avocó a determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Plantago major* "llantén" sobre el incremento de la actividad de Catalasa (CAT) en *Oryctolagus cuniculus* "conejos".

2. Material y métodos

Material Biológico

Se realizó un estudio experimental explicativo; para ello se utilizaron 15 *O. cuniculus* "conejo" machos, raza Nueva Zelanda, de tres meses de edad promedio y *Plantago major* "llantén"; ambos obtenidos del Centro Experimental de Producción y Crianza de Animales Menores "CEPCAM", Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.

Los 15 especímenes fueron reunidos en tres (3) grupos de cinco individuos cada uno:

Grupo 1: Normotermia, mantenidos a 37 °C durante tres horas.

Grupo 2: Hipotermia, enfriados hasta 28 °C en un promedio de una hora y mantenidos así durante dos horas más.

Grupo 3: Hipotermia/Reperusión, aquí los especímenes, al igual que el grupo 2, fueron enfriados hasta 28 °C en un promedio de una hora (hipotermia) y mantenidos una hora más a esa temperatura, para finalmente recalentados hasta alcanzar su temperatura inicial de 37 °C (reperusión).

Cabe destacar que a los grupos 2 y 3, se les administró la dosis diaria de 200 mg/kg de peso corporal del extracto hidroalcohólico de "llantén", por 1 semana antes de ser inducidos al estado de hipotermia/reperusión.

Seguidamente, a los tres grupos, se les extrajo 3 muestras de sangre: 1 basal (tiempo cero), otra a las dos horas y tres horas. Asimismo, se les registró la temperatura carotídea y abdominal cada 10 minutos desde el inicio hasta el final del experimento. Finalmente, los animales fueron sacrificados después de la toma de las muestras con sobredosis del anestésico.

Confección del equipo de hipotermia / reperusión

Para tal fin, se acondicionó una mesa tipo Claude Bernard (modificada por el autor) de metal de doble fondo, con conexiones para ingreso y salida de agua fría o caliente; también se fabricó el equipo de alimentación y circulación continua de agua fría o caliente, elaborado a base de mangueras de polietileno estériles (venoclisis) conectados a un tubo de vidrio doblado en U que fue ubicado dentro de la cavidad intraperitoneal de los "conejos" para inducir hipotermia o reperusión (Figura 1).



Figura 1. Mesa de Claude Bernard (modificada por el autor) a manera de depósito con tubo de entrada y salida de agua helada y/o caliente para facilitar inducir hipotermia – reperfusión.

Preparación del extracto hidroalcohólico de *P. major*

Una vez colectada la planta de “llantén”, se realizó el secado en estufa de sus hojas limpias a una temperatura de 45 °C; posteriormente se procedió a molerlas, hasta obtener un polvo fino, el cual se maceró en una mezcla hidroalcohólica de 70% de butanol y 30% de agua bidestilada, en frascos de cierre hermético, con agitación fuerte durante 5 minutos diarios, por 10 días; a fin de extraer sus principios activos. Finalmente, el macerado se filtró al vacío, se evaporó el solvente mediante rota vapor (Kuklinski, 2000; Sharapin, 2000) y se almacenó en refrigeración, hasta su empleo.

Preparación de los especímenes de *O. cuniculus*

Para ello, fue necesario someter a los conejos a ayuno, pero con agua a libre disponibilidad, desde la noche anterior a la intervención quirúrgica. Seguidamente, estos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso) vía intraperitoneal y colocados sobre la mesa tipo Claude Bernard a 38 °C para evitar la hipotermia inducida por la anestesia; luego, se les colocó una cánula traqueal, conectada a una bomba de respiración artificial de volumen controlado (aire atmosférico).

A cada uno de los conejos, se le realizó una cirugía laparoscópica de 1 cm de longitud en la

cavidad abdominal a nivel de la línea alba y se les colocó el equipo de enfriamiento/reperfusión, con circulación de agua (10 °C y 42 °C respectivamente) en la cavidad intraperitoneal, siguiendo la técnica descrita por Marion et al. (1996) y modificada por el autor (Figura 2).



Figura 2. “conejo” anestesiado, colocado en mesa de Claude Bernard, con cánula traqueal, termómetro a nivel de carótida y el equipo para inducción de hipotermia – reperfusión colocado a nivel de cavidad abdominal.

Cabe destacar que se tuvo un registro constante de la temperatura carotídea (colocando una termocupla entre el músculo por debajo de la carótida) y de la temperatura abdominal (colocando una termocupla en la cavidad visceral); de igual manera se evitó la pérdida de calor del espécimen ya sea por evaporación o convección, cerrando rápidamente con clamps, las partes intervenidas.

Tratamiento de las muestras de sangre

Para ello, se procedió a centrifugar en refrigeración las muestras de sangre heparinizada, a 1000 rpm durante 10 minutos, se separó el plasma de los eritrocitos y, a éstos últimos se los lavó con solución salina fisiológica por tres veces. Finalmente, tanto el plasma como los eritrocitos se conservaron a -20 °C hasta su análisis inmediato.

Actividad Catalasa (CAT)

La actividad de la catalasa fue determinada siguiendo el método de Aebi (1984). Para ello, se diluyó 0,7 mL de eritrocitos en 2,8 mL de agua destilada fría para hemolizar, agitando fuerte; seguidamente se tomó 20 ul del hemolizado, 10 ul de tampón fosfato 50 mM (pH 7,0) y se mezcló en cubetas de cuarzo en el siguiente orden: 1 mL de H₂O₂ 30 mM (preparada diariamente) y 2mL de hemolizado; para el blanco se utilizó 1mL de H₂O₂ 30 mM y 2 ml de tampón fosfato. En el espectrofotómetro se realizaron las lecturas a los 5 y 20 segundos a 480 nm. La actividad catalasa

de la muestra (K) se expresó como: $K = 0,153 + \log (A1/A2)$. Donde: A1: es la absorbancia a los 5 segundos y A2: es la absorbancia a los 20 segundos. El resultado final se expresó en K (actividad catalasa) por gramo de hemoglobina.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico Statgraphics, efectuándose un ANOVA con una significancia estadística del 95%.

3. Resultados y discusión

Respecto a la actividad antioxidante de la CAT en la [Tabla 1](#) si bien es cierto, no hay diferencia significativa entre los grupos ($p > 0,05$), ésta aumenta, aunque no de manera significativa, tanto en los grupos en hipotermia como en hipotermia/reperusión, quedando demostrado que el extracto hidroalcohólico de *P. major* favorece positivamente en el aumento de la actividad CAT así sea en condiciones de reperusión, donde existe mayor riesgo de pérdida de la actividad enzimática; cabe resaltar, que en esta etapa (reperusión), el organismo incrementa de forma natural la concentración de catalasa, para defenderse de las lesiones producidas por el fenómeno de isquemia-reperusión, frente al estrés oxidativo; el mismo que se ve favorecido en este caso, por la acción de *P. Major*, siendo capaces de inhibir y eliminar los Radicales libres; frenando de esta manera la lesión y la actividad inflamatoria que se produce en los tejidos de *O. cuniculus* durante la reperusión; de allí que [Jaffer et al. \(2011\)](#) afirma que la catalasa y la glutatión peroxidasa inactivan el H_2O_2 a la par que la SOD limpia específicamente el radical superóxido, catalizando su dismutación a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

De igual manera diferentes investigaciones señalan la presencia de otros agentes antioxidantes; de allí que [Gil et al. \(2008\)](#), mencionan como tales al ascorbato y el alfa tocoferol; así como [Rodríguez et al., 2018](#) mencionan al glutatión (GSH); el ácido α -lipoico, los carotenoides, la bilirrubina y la ubiquinona, no siendo suficientes para frenar el daño oxidativo, por lo que resulta beneficioso el uso de *Plantago major* frente a la hipotermia/reperusión; hecho que se puede analizar en la bibliografía que al respecto se ha consultado y que está a entera disposición ([García et al., 2003](#); [Blanco et al., 2008](#); [Cargua, 2018](#); [Mostacero et al., 2011](#); [Mostacero et al., 2019](#))

Tabla 1

Actividad catalasa en UCAT/g hemoglobina (Hb) en eritrocitos de *O. cuniculus*, en condiciones de normo-termia, hipotermia y tratados con *Plantago major*, bajo condiciones de hipotermia e hipotermia/reperusión [normotermia (N) a las cero horas, hipotermia (H) a las dos horas y reperusión (R) a las tres horas

		UCAT/g Hb		
		<i>Plantago major</i>	<i>Plantago major</i>	
Normotermia	Hipotermia	Hipotermia/reperusión		
		N.0h	H. 2h	R. 3h
26,76	30,18	45,78	12,42	44,23
21,37	21,79	29,39	19,41	36,47
20,52	28,92	18,59	30,74	32,61
18,11	31,30	37,34	37,65	30,45
23,09	20,47	20,09	33,76	31,88

UCAT: Unidades de catalasa.

Cabe destacar que en la presente investigación, el estado de hipotermia se indujo a una temperatura por debajo de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por sobre $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, clasificada como hipotermia profunda o severa ([Uriostegui-Santana et al., 2017](#)); a diferencia de otros investigadores, como [Campos, 2016](#); [Zhao et al. \(2019\)](#) y [Canbolat y Nurullahoglu \(2018\)](#); quienes realizaron estudios de Hipotermia terapéutica dentro del rango de leve a moderada; pero afirmando en todo momento que la supresión de la neuroinflamación es sino el mejor mecanismo de protección cerebral; lo que ratifica el hecho de que la HT inducida, se constituye hoy en día en una de las herramientas más efectivas contra la lesión e inflamación cerebral. En cuanto al proceso de reperusión, este se realizó aumentando la temperatura desde menos de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 120 minutos, tiempo suficiente para demostrar el efecto positivo del extracto hidroalcohólico de *Plantago major* sobre la catalasa; concordando con lo descrito por [Frink et al \(2012\)](#), quienes recomiendan que la inducción de reperusión debería de darse de forma lenta; ya que de lo contrario se revertiría los beneficios de la Hipotermia terapéutica.

4. Conclusiones

Plantago major potenció el incremento de la actividad antioxidante de la CAT bajo condiciones de hipotermia/reperusión; por lo que se recomienda continuar con las investigaciones en esta línea a fin de validar el uso de esta especie, dentro de la Hipotermia terapéutica.

ORCID

O. Pretel-Sevillano  <https://orcid.org/0000-0002-6755-4361>
A. Calderon-Peña  <https://orcid.org/0000-0001-7953-9874>
P. Torres-Plasencia  <https://orcid.org/0000-0001-6840-8713>
J. Mostacero-León  <https://orcid.org/0000-0003-2556-3013>
A. De La Cruz-Castillo  <https://orcid.org/0000-0002-5409-6146>

Referencias bibliográficas

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105: 121-126.
- Alvis-Miranda, H.; Alcalá-Cerra, G.; Calderon-Miranda, W.; Moscote-Salazar, L. 2015. Hipotermia terapéutica en la lesión traumática cerebral. *Rev. Chil. Neurocirugía* 41: 83-88.
- Andresen, M.; Gazmuri, J.; Marín, A.; Regueira, T.; Rovegno, M. 2015. Therapeutic hypothermia for acute brain injuries. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* 23(42): 1-7.
- Blanco, B.; Saborío, A.; Garro, G. 2008. Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor). *Tecnología en Marcha* 21(2): 17-24.
- Campos, N. 2016. Hipotermia: a propósito de un caso. *Medicina Legal Costa Rica* 33(2): 1-3.
- Canbolat, S.; Nurullahoglu, K. 2018. Moderate hypothermia and responses to calcium channel blockers – Role of the nitric oxide. *Physiology International* 105(1): 53-60.
- Cargua, R. 2018. Actividad antifúngica del extracto alcohólico y aceite esencial de *Plantago major* (llantén) frente a *Candida albicans*. Tesis de maestría, Universidad Regional Autónoma de los Andes, Ambato. Ecuador. 59 pp.
- Carrillo, R.; Díaz, J.; Peña, C.; Flores, O.; Neri, R.; Zepeda, A.; Pérez, Á.; Ortiz, A. 2016. Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina (México)* 59(1): 6-18.
- Escalante, J.; del Río, F. 2009. Preservación de órganos. *Medicina Intensiva* 33(6), 282-292.
- Frink, M.; Flohé, S.; van Griensven, M.; Mommsen, P.; Hildebrand, F. 2012. Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanisms following major challenge. *Mediators of inflammation* 1: 1-13.
- García, M.; González, P.; Coto, T.; Soto, G.; Pazos, L. 2003. Toxicidad sub-crónica y prueba de irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de *Plantago major* (Plantaginaceae). *Revista de Biología Tropical* 51(3): 635-638.
- Gil, N.; Gómez, J.; Gómez, A. 2008. Radicales libres y lesión cerebral. *Universitas Médica* 49(2): 231-242.
- González-Ibarra, F.; Varon, J.; López-Meza, E. 2011. Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action. *Frontiers in neurology* 2(4): 1-8.
- Jaffer, H.; Morris, B.; Stewart, D.; Labhasetwar, V. 2011. Advances in stroke therapy. *Drug delivery and translational research* 1(6): 409-419.
- Jaramillo-Magaña, J. 2011. Hipotermia en neuroanestesiología. *Revista Mejicana de Anestesiología* 34(1): 138-141.
- Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1 era Edición. Editorial Omega S.A. Barcelona, España.
- León, M.; Cedeño, R.; Rivero, R.; Rivero, J.; García, D.; Bordón, L. 2018. La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. *MediSur* 16(5): 699-710.
- León-Páez, P.; Murillo, R.; Solís-Vargas, F. 2015. Melatonina: ¿algo más que ciclo circadiano? aspectos fisiológicos y terapéuticos. *Revista Médica* 13(1): 1659-2441.
- Lyden, P.; Lamb, J.; Kothari, S.; Toossi, S.; Boitano, P.; Rajput, P. 2018. Differential effects of hypothermia on neurovascular unit determine protective or toxic results: Toward optimized therapeutic hypothermia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 39(9): 1693-1709.
- Marion, D.; Leonov, Y.; Ginsberg, M.; Katz, L.; Kochanek, P.; Lechleuthner, A. 1996. Resuscitative Hypothermia. *Critical care in Medicine* 24(2): 81-89.
- Mora, S.; Zeledón, A.; Vargas, T. 2019. Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. *Revista Médica Sinergia* 4(5): 89-100.
- Mostacero, J.; Castillo, F.; Mejía, F.; Gamarra, O.; Charcape, J.; Ramírez, R. 2011. Plantas Medicinales del Perú: Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. 1era Edición. Editorial Asamblea Nacional de Rectores. Trujillo, Perú. 909 pp.
- Mostacero, J.; Peláez, F.; Alarcón, N.; De La Cruz, A.; Alva, R.; Charcape, M. 2019. Plantas utilizadas para el tratamiento del cáncer expendidas en los principales mercados de la provincia de Trujillo, Perú, 2016 – 2017. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 18(1): 81-94.
- Núñez, A.; Benavente, I.; Blanco, D.; Boix, H.; Cabañas, F.; Chaffanel, M.; Fernández-Colomer, B.; Fernández-Lorenzo, J.; Begoña, L.; Moral, M.; Pavón, A.; Tofé, I.; Valverde, E.; Vento, M. 2017. Estrés oxidativo en la asfisia perinatal y la encefalopatía hipóxico-isquémica. *Anales de Pediatría* 88(4): 228-229.
- Rodríguez, M.; Camejo, M. 2018. Consideraciones sobre la relación ejercicio físico-estrés oxidativo. *PODIUM Revista de Ciencia y Tecnología en la Cultura Física* 13(1): 88-93.
- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 1era Edición. Editorial Roberto Pinzón S. Santafé de Bogotá, Colombia 247 pp.
- Soukup, J. 1987. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. 2da Edición. Editorial Salesiana. Perú.
- Tapia-Velasco, R. 2015. Hipotermia terapéutica. *Revista mejicana de anestesiología* 38(3): 449-451.
- Uriostegui-Santana, L.; Nava-López, J.; Mendoza-Escoto, V. 2017. Alteraciones de la temperatura y su tratamiento en el perioperatorio. *Revista Mejicana de Anestesiología* 40(1): 29-37.
- Viada, E.; Gómez, L.; Campaña, I. 2017. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico* 21(1): 171-186.
- Zhao, J.; Mu, H.; Liu, L.; Jiang, X.; Wu, D.; Shi, Y.; Leak, R.; Ji, X. 2019. Transient selective brain cooling confers neurovascular and functional protection from acute to chronic stages of ischemia/reperfusion brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 39(7): 1215-1231.

