



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Sedum dendroideum*
(SIEMPREVIVA) EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE
FIBROBLASTOS GINGIVALES IN VITRO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

CORREA ARZATE LORENA

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESORES: Dr. JAVIER PORTILLA ROBERTSON
Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

Esta investigación forma parte del proyecto PAPIIT IN223414



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitirme llegar a este momento y darme la bendición de encontrar a las personas adecuadas para llevar a cabo este sueño.

A la UNAM

Mi alma mater por aceptarme y con ello llevar a cabo mi formación profesional.

Al Departamento de Patología Bucal

Por las facilidades otorgadas para la culminación de este proyecto.

Al Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán

Por creer en mí desde el primer momento, por la paciencia en la dirección de este trabajo, por sus conocimientos, disponibilidad y facilitarme los medios necesarios para la realización de este proyecto. Gracias por enseñarme a encontrar en la ciencia una nueva pasión.

Al Instituto de Biología y al Biól. Jerónimo Reyes

Por la confianza en este proyecto y su invaluable colaboración.

Al Instituto de Química y al Dr. Manuel Jiménez

Por el respaldo en esta investigación y todos los nuevos conocimientos que obtuve durante mi estancia.

Al QFB Rafael Álvarez

Por la paciencia y todas las enseñanzas, por su dedicación, más que un asesor, un gran amigo.

DEDICATORIAS

*A mis padres
Por su apoyo incondicional, por ser mi pilar fundamental durante mi vida universitaria.*

*A mi hermana
Eres el regalo más grande que la vida pudo darme.*

*A mis profesores
Mercedes Porras, Daniel Duhalt, Elizabeth Quintino, Anabel Morales y Juan Carlos Rodríguez por enseñarme a amar mi profesión con la pasión que cada uno de ustedes logro enseñarme.*

*Al Dr. Alberto Zelocuatecatl
Por ser mi más grande inspiración a lo largo de la carrera y enseñarme que hay una vida más allá de la odontología.*

*Al Dr. Said Campos
Por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía.*

*A la Dra. Blanquita Hernández
Por todas las enseñanzas de vida, porque sólo aprendemos lo fuerte que somos cuando ser fuertes es nuestra única opción.*

*A la Dra. Laura Flores
Más que mi tutora una gran amiga.*

*A la Dra. Ana Claudia Rodríguez
Por abrirme las puertas de su segundo hogar, por la paciencia y confianza durante todos estos años de trabajo.*

*A la Lic. Linda Velázquez
Por todo el trabajo realizado.*

*A mis amigos
Sarai Gallardo, Gabriel Olivares, Víctor Vázquez y Gabriel Cristóbal por ser maravillosas personas, agradezco a la vida colocarlos en mi camino en el lugar y momento correctos.*

*A mis amigas
Jeovanna Valadez, Vania Morales y Edith Castañón, por el gran apoyo y amistad brindados, por el cariño y la comprensión. Las quiero inmensamente.
Bianca Cristino, por compartir la mayor de las riquezas, por todo el aprendizaje que juntas logramos. Te Quiero mucho.*

*A Miguel Ángel Palestino†
Cada paso fue también por ti. Gracias por enseñarme a amar mis pasiones en la vida.*

Lo único que vuelve un sueño imposible es el miedo a fracasar



ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA Y PLANTAS MEDICINALES	5
3.2 CRASULÁCEAS	5
3.3 SEDUM DENDROIDEUM	6
3.3.1 POSICIÓN TAXONÓMICA	6
3.3.2 MORFOLOGÍA	6
3.3.3 FISIOLOGÍA	7
3.3.4 ECOLOGÍA	7
3.3.5 DISTRIBUCIÓN	7
3.3.4 CULTIVO	8
3.4 USO MEDICINAL DE SEDUM DENDROIDEUM	8
3.5 MUCOSA ORAL	8
3.6 CULTIVO CELULAR	10
4. ANTECEDENTES	12
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
6. JUSTIFICACIÓN	14
7. HIPÓTESIS	15
8. OBJETIVOS	16
8.1 OBJETIVO GENERAL	16
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
9. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
9.1 TIPO DE ESTUDIO	17
9.2 VARIABLES DE ESTUDIO	17
9.2.1 VARIABLES INDEPENDIENTES	17
9.2.2 VARIABLES DEPENDIENTES	17
9.3 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES	18
9.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO	19



9.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	19
9.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	19
9.7 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	19
10. MATERIAL Y EQUIPO	20
10.1 RECURSOS	20
10.1.1 HUMANOS	20
10.1.2 MATERIALES	20
10.1.3 FINANCIEROS	21
11 METODOLOGÍA	22
11.1 ADQUISICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA	22
11.2 GENERACIÓN DEL EXTRACTO	22
11.2.1 AZÚCARES	22
11.2.2 ALCALOIDES	22
11.2.3 FLAVONOIDES	23
11.3 OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES	23
11.4 ENSAYO DE CONCENTRACIÓN TOXICA MEDIA	23
11.5 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON CONCENTRACIÓN TÓXICA MEDIA DEL EXTRACTO DE <i>Sedum dendroideum</i> EN DENSIDAD CELULAR DEFINIDA	24
11.6 ENSAYO PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL EXTRACTO DE <i>Sedum dendroideum</i> SOBRE LA APOPTOSIS DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS	24
11.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
12 RESULTADOS	26
12.1 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Sedum</i> <i>dendroideum</i>	26
12.2 CONCENTRACIÓN TOXICA Y VIABILIDAD CELULAR	27
12.3 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR	28
12.4 ENSAYO DE APOPTOSIS CELULAR	29
13 DISCUSIÓN	30
14 CONCLUSIONES	32
15. BIBLIOGRAFÍA	33



1. RESUMEN

A la planta *Sedum dendroideum* se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas, dentro de las cuales se considera su capacidad para influir en los procesos de cicatrización de las úlceras orales.

Objetivo: Determinar el efecto del extracto de *Sedum dendroideum* sobre la proliferación celular de fibroblastos gingivales *in vitro*.

Metodología: Se realizó la generación del extracto acuoso de *Sedum dendroideum*, determinando su composición química (carbohidratos, alcaloides y flavonoides). A través de cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos en combinación con el extracto acuso a concentraciones de 0%, 0.0125%, 0.025%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2% y 5%, se determinó la concentración tóxica media, proliferación y apoptosis celular por medio de ensayos de azul tripano 0.4%, MTT y TUNEL, respectivamente, determinando la proporción de cambio a través de mediciones de tendencia central y dispersión.

Resultados: El análisis cromatográfico reportó que el extracto de *Sedum dendroideum* carece de los monosacáridos (glucosa y sacarosa), así como alcaloides; siendo positivo a la presencia de flavonoides. En los ensayos de proliferación la concentración del 0.0125% presentó un efecto positivo sobre la viabilidad celular, no obstante, al aumentar la concentración del extracto se observó descenso de la misma, observando un efecto diferencial únicamente a las 24 horas de cultivo para dicha dosis. Así mismo, en la concentración 0.0125% se observó aumento en la apoptosis celular comparado a los otros grupos.

Conclusiones: El extracto de *Sedum dendroideum* presenta flavonoides, ante el análisis de proliferación se observó un efecto bivalente según la concentración empleada sobre los fibroblastos gingivales *in vitro*.



2. INTRODUCCIÓN

La búsqueda por mejorar el estilo y calidad de vida, ha incluido el uso de alternativas naturales provenientes de las plantas, las cuales han sido utilizadas como antibióticos, antiinflamatorios así como sustancias que ayuda a la cicatrización.^{1,2}

En México las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como suburbano, donde los servicios de atención médica son escasos comparado a los centros urbanos.³

Por la diversidad de especies de plantas con que cuenta, la medicina tradicional mexicana ocupa el primer lugar en América Latina y tercero en el mundo, se estima que el país tiene entre 5 mil y 10 mil especies de plantas medicinales. A pesar de la riqueza y la variedad de la flora medicinal, el porcentaje de especies que poseen estudios químicos y farmacológicos es muy limitado.^{2,3}

Las lesiones traumáticas, por ejemplo las vesículas, ampollas o úlceras representan entidades patológicas frecuentes en la cavidad oral. La mucosa bucal es delgada y por ello las vesículas y ampollas se rompen rápidamente y se transforman en úlceras, que se traumatizan con facilidad por los dientes y alimentos y se infectan en forma secundaria por la flora bucal. Por lo general, cursan con dolor como principal característica.⁴

Se sabe que diferentes especies de plantas medicinales son utilizadas empíricamente para el tratamiento de las úlceras en cavidad oral, algunas de ellas pertenecen al género de las crasuláceas, de las cuales *Sedum dendroideum*, conocida comúnmente como “siempreviva” se le atribuyen efectos curativos, no obstante, no se ha comprobado científicamente cual es el mecanismo responsable de dicho efecto, razón por la cual las primeras aproximaciones a este conocimiento deben ser *in vitro*.⁵ El objetivo de este trabajo es determinar el efecto que produce el extracto de *Sedum dendroideum* en diferentes concentraciones en la proliferación celular de cultivos de fibroblastos gingivales humanos *in vitro*.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA Y PLANTAS MEDICINALES

La medicina tradicional mexicana es considerada como un conjunto de sistemas de atención a la salud que tiene sus raíces en conocimientos que los diferentes pueblos indígenas de nuestro país han acumulado a través de su historia, es un sistema de conceptos, creencias, prácticas y recursos materiales y simbólicos para la atención y el tratamiento de padecimientos y enfermedades.^{1,2}

Las plantas medicinales son organismos que contienen sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida, es decir tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico.^{1,6}

Son diversos los padecimientos que se tratan con plantas medicinales, entre ellos las úlceras en cavidad oral, comúnmente llamadas “fuegos”, “fogasos” o “aftas”, que en base a la medicina tradicional mexicana son tratados aplicando extractos de diversas especies directamente sobre la lesión. Entre ellas se tiene la manzanilla, mastuerzo, salvia y la siempreviva, ésta última perteneciente a la familia de las crasuláceas.⁵

3.2 CRASULÁCEAS

Las crasuláceas son plantas que poseen un carácter común a muchas especies de zonas áridas o semiáridas, la succulencia, es decir tienen la capacidad de almacenar agua en sus hojas en forma de jugos mucilaginosos (viscosos). Las hay herbáceas de pocos centímetros de alto hasta arbustivas de 1.5 a 2 metros de altura. Las hojas a menudo forman rosetas, aunque pueden estar repartidas por una porción del tallo. Las flores son actinomorfas (poseen simetría radiada), los sépalos (parte que sujeta los pétalos de la flor) y los pétalos son distribuidos radialmente al centro de la flor.^{7,8}

Actualmente se reconocen 35 géneros y cerca de 1500 especies como integrantes de la familia *Crasulaceae*. Cuatro géneros son los más importantes por el número de especies que se les asigna: *Sedum* (350 – 500 especies), *Crassula* (250 especies), *Echeveria* (150 especies) y *Kalanchoe* (100 especies).⁷

México es el centro de mayor diversidad y endemismo de este grupo de plantas. Entre las crasuláceas mexicanas, diversos géneros son endémicos como *Sedum dendroideum* que se distribuye del centro del país hasta Centroamérica, donde puede ser cultivada en solares con fines ornamentales o medicinales. También se conoce como siempreviva, medye (Mazahua), kanda (Puebla) y Tetzmitl.⁹



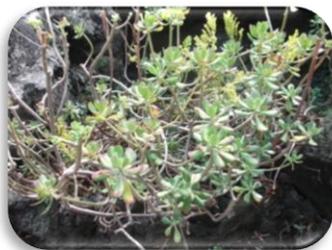
3.3 SEDUM DENDROIDEUM

3.3.1. Posición taxonómica

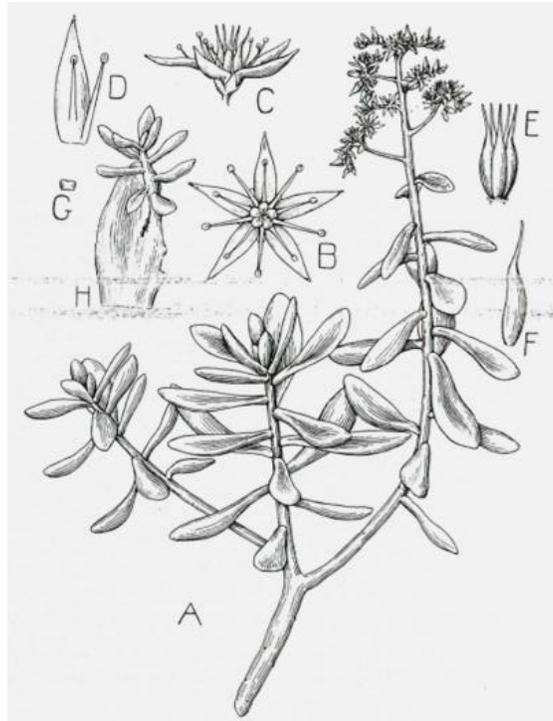
CLASIFICACIÓN DE ACUERDO CONQUIST (1981) ¹⁰	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Crassulaceae
Género	Sedum
Especie	Dendroideum

3.3.2 Morfología

Son plantas arbustivas, colgantes o epífitas (que crece sobre otra planta utilizándola de sostén) de color verde brillante, con tallos de 0.6 – 5 m de largo; hojas de forma elíptico – oblanceoladas, espatuladas u obovadas, obtusas (redondeada), angostas en la base o sésiles, de 30 – 70 mm de largo y 12 – 20 mm de ancho, verde lustroso, con glándulas subepidérmicas en los bordes que se ven como puntos rojizos o verde oscuro (no hay otra subespecie que tenga esta condición).^{8, 11, 12}



(*Sedum dendroideum*, fuente directa. Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, febrero 2013)



A. Boceto de *Sedum dendroideum* B. Flor vista superior C. Flor vista lateral D. Pétalo E. Pistilo F. Pistilo solo G. Néctar
H. Porción superior del tallo¹¹

3.3.3. Fisiología

Este tipo de plantas se caracteriza por presentar el metabolismo ácido de las crasuláceas, el cual se distingue porque la fijación de CO₂ atmosférico ocurre durante la noche y mantiene los estomas cerrados durante el día. El ácido málico sintetizado se acumula en la vacuola, de donde sale al día siguiente para ser descarboxilado y el CO₂ obtenido de esta reacción se utiliza en la síntesis de carbohidratos con la energía obtenida del proceso luminoso de la fotosíntesis.^{1,13}

3.3.4. Ecología

Es originaria de México, y habita en climas semicálido, semiseco y templado entre los 1350 y los 2750 metros sobre el nivel del mar. Cuando la planta es cultivada en solares con fines ornamentales o



medicinales, puede ser asociada a terrenos de cultivo tales como el bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino.^{2, 14}

3.3.5. Distribución

Su principal distribución es en el eje volcánico transversal y Sierra Madre Sur mexicana.^{11, 14, 15, 16}

3.3.6 Cultivo

Dependiendo del lugar en el cual se coloquen (macetas, suelo directo, invernadero) las plantas se desarrollaran dependiendo de que tanta exposición tengan al sol, su ubicación respecto a la luz es el factor más importante para determinar su salud y apariencia.⁸

3.4 USO MEDICINAL DE *Sedum dendroideum*

Varios autores han informado que *Sedum dendroideum* tiene propiedades medicinales⁵, descritas desde el manuscrito del códice de la Cruz - Badiano (1552), sin embargo su valor medicinal era conocido mucho antes de la conquista española. En dicho manuscrito se mencionaba que los tallos eran utilizados en una loción para ojos hinchados, fiebre, hinchazón alrededor de las venas, moretones y quemaduras.¹⁷

En el siglo XVI Martín de la Cruz relata su uso como: antipirético, caustica, cicatricial y regenerativo para las enfermedades de los ojos. El Códice Florentino la mencionaba para inflamaciones de las tetas, para orinar y purificar la orina, para la calentura y las enfermedades de los ojos. Standley (1922) afirmó que el jugo de *S. dendroideum* es astringente y se usa para “endurecer” las encías, las hemorroides y disentería. Martínez y cols (1944) citaron el uso de la planta triturada para las quemaduras, para el lavado de encías y para el escorbuto. Además mencionó que el jugo de las hojas aplicado a los ojos cura la irritación. Del mismo modo Standley y Steyermark (1946) reportaron que en Cobán, Guatemala el jugo de las hojas se utiliza para tratar la inflamación de los ojos y boca, razón por la cual es considerada como un elemento terapéutico para lesiones orales.^{2,17}

3.5 MUCOSA ORAL

La mucosa oral se encuentra conformada por epitelio y tejido conjuntivo subyacente. El epitelio de la cavidad oral está constituido por cuatro capas: basal, espinosa, granulosa y superficial. Debajo de la capa basal se encuentra la membrana basal que une el epitelio al tejido conectivo compuesto de fibras colágenas.^{18, 19} El fibroblasto es la célula más abundante en el tejido conectivo. Se distinguen como células grandes, aplanadas o ahusadas con finas prolongaciones. El citoplasma es eosinófilo, con un núcleo oval que



contiene 1 o 2 nucléolos y escasa cromatina muy granulada, se observa escaso retículo endoplasmático rugoso y un pequeño aparato de Golgi. Se sintetizan en la matriz extracelular de tejido conectivo y derivan de células mesenquimatosas indiferenciadas. Sintetiza las proteínas colágeno y elastina, así como glucosaminoglucanos, además de estar implicado en la producción de factores de crecimiento.^{20, 21}

Dentro de los procesos que pueden afectar a la mucosa oral encontramos frecuentemente las úlceras, que por definición, es la pérdida de la continuidad del epitelio, presentan un deterioro que sobresale del límite del tejido conjuntivo del epitelio y que puede llegar, en la mucosa hasta la submucosa, la musculatura y el periostio.²⁹ La estructura de la úlcera es decisiva para la valoración clínica, además del número, profundidad y forma de las lesiones.^{4, 22, 23}

Las úlceras agudas presentan signos y síntomas clínicos de la inflamación aguda, donde se observan lesiones cubiertas por exudado blanco amarillento y rodeadas por un halo eritematoso, la intensidad del dolor varía y hay sensibilidad al tacto o la presión.⁴

Las úlceras crónicas son poco dolorosas o bien indoloras, cubiertas de una membrana amarilla, pueden presentar bordes elevados por la hiperqueratosis, además se puede observar induración causada por las cicatrices de la inflamación crónica.⁴

Cuando una mucosa es lesionada a través de agentes físicos, químicos o biológicos, resultando en una úlcera se puede presentar una respuesta inflamatoria, siendo ésta una reacción compleja frente a agentes lesivos, consta de respuestas vasculares y celulares, mediadas por factores químicos, se puede considerar, una respuesta protectora cuyo objetivo es mantener la homeostasis ya que está estrechamente entrelazada con el proceso de reparación. La inflamación sirve para destruir, diluir, o denudar al agente agresor y activa una serie de acontecimientos que tratan de reconstruir el tejido dañado. En la reparación el tejido lesionado se reemplaza mediante la regeneración de células parenquimatosas nativas, rellenando el defecto con tejido de fibrosis (cicatriz).^{24, 25, 26, 27}

La fase inflamatoria comienza en el momento de la lesión, en ella existe constricción de los vasos sanguíneos iniciándose la coagulación mediante activación y agregación plaquetarias, después de un breve periodo de constricción, estos mismos vasos se dilatan y los capilares aumentan su permeabilidad, continuando con la fase celular, marcada por la migración de leucocitos fagocíticos que digieren y eliminan organismos invasores, fibrina, residuos extracelulares y cualquier otro material ajeno. Entre las 24 y 48 horas los fibroblastos y las células endoteliales comienzan a proliferar para formar el tejido cicatricial, similar al destruido por la lesión. La síntesis de colágeno llega a su punto máximo en 5 a 7 días. En el proceso de



remodelación existe síntesis de colágena y lisis por enzimas colagenasas, disminuye la vascularidad y continúa la remodelación de tejido cicatricial. En las lesiones en mucosa oral, la regeneración tarda alrededor de 12 días.^{25, 26, 27}

El fibroblasto desempeña un papel importante durante los procesos de cicatrización y regeneración de la mucosa oral y periodontal por medio de una respuesta proliferativa activa, inducida por diferentes factores de crecimiento presentes en el plasma y en los gránulos plaquetarios, sin embargo, no ha sido determinado que efectos podrían tener los extractos de plantas medicinales sobre su conducta celular, incluyendo su capacidad proliferativa.^{20, 21}

3.6 CULTIVO CELULAR

Los procedimientos que permiten mantener y reproducir células animales en un entorno artificial se conocen como cultivos celulares. Tales células pueden ser extraídas del tejido directamente y ser separadas por medios enzimáticos o mecánicos antes del cultivo, conservando su diferenciación, arquitectura y función. Las células también pueden ser derivadas de una línea celular o cepa de células establecidas, en las cuáles pierden su organización tisular. Las condiciones del cultivo varían ampliamente dependiendo de cada tipo de célula, pueden obtenerse en monocapas o en suspensión, sin embargo, el medio artificial en el que las células se cultivan consiste invariablemente en un recipiente adecuado que contenga el sustrato o medio que suministra los nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales), factores de crecimiento, hormonas, y gases (O₂, CO₂), así como antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias y hongos, además de regular el medio fisicoquímico (pH, presión osmótica y temperatura). Cada tipo de células requiere la adición apropiada de factores de crecimiento al medio, siendo el suero fetal bovino el más utilizado porque contiene altas concentraciones de factores de crecimiento.

Los cultivos pueden proliferar en condiciones adecuadas hasta que ocupan todo el sustrato disponible, en esta etapa las células deben ser sub cultivadas transfiriéndose a un nuevo recipiente para proporcionar más espacio para que continúen creciendo. El sub cultivar permite obtener poblaciones celulares más uniformes libres de residuos y desechos de tejidos.

El cultivo celular proporciona excelentes sistemas para el modelo de estudio para la fisiología y bioquímica normal de las células, los efectos de los fármacos y compuestos tóxicos en las células, la mutagénesis y carcinogénesis, teniendo como principal ventaja al utilizar el cultivo de células la consistencia y reproducibilidad de los resultados que se pueden obtener.



Para evaluar las respuestas de una población celular a factores externos como antibióticos, factores de crecimiento o diferentes compuestos se utilizan diversos estudios, dentro de los más comunes se encuentra el de viabilidad y proliferación celular. La viabilidad celular se define como la identificación de células vivas o muertas en una muestra total, para ello se emplean diferentes métodos. El más común es la tinción con azul tripano, éste es un colorante derivado de la toluidina, evalúa la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras.^{28, 29}

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. Los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones, pueden ser analizados mediante los ensayos de citotoxicidad, los cuales son capaces de detectarse mediante diferentes mecanismos celulares. Dentro de éstos se encuentran ensayos que determinan la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. Dentro de los ensayos más conocidos y validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).

El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.²⁹



4. ANTECEDENTES

Los recursos terapéuticos empleados por la herbolaria constituyen una alternativa viable para el descubrimiento de nuevos fármacos, sin embargo los estudios realizados sobre el efecto del extracto de *Sedum dendroideum* sobre la proliferación celular, un mecanismo importante en la reparación son escasos. No obstante, han sido probados en otro mecanismo de igual importancia.

Giany O. De Melo y Cols., en 2005 reportaron que el jugo de las hojas de *Sedum dendroideum* muestra actividades antiinflamatorias y analgésicas relacionados con una inhibición de la síntesis de prostaglandinas, así como la presencia de flavonoides en el extracto, en un segundo bioensayo realizado por los mismos autores en 2009 mencionan que *Sedum dendroideum* también inhibe el edema y una disminución en la migración de leucocitos, confirmando que los flavonoides del jugo de la planta puede bloquear la síntesis de leucotrienos (importantes para la quimiotaxis) y también bloquea la síntesis de prostaglandinas, importantes para la génesis del dolor y edema. Estos dos estudios mencionan la participación de esta planta en mecanismos básicos de la regeneración, sin embargo, es importante determinar si su efecto influye en la proliferación de células de la mucosa oral, tal como los fibroblastos gingivales.^{30, 31}

Este estudio es el primer ensayo donde se asocia el extracto de *Sedum dendroideum* con fibroblastos gingivales orales.



5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país el interés por el uso de la medicina alternativa ha ido en aumento ya que una elevada parte de la población utiliza sólo plantas medicinales y remedios caseros, por no tener recursos ni posibilidad de acceso a la medicina institucional. En la medicina tradicional mexicana *Sedum dendroideum* se utiliza como antiinflamatorio, analgésico y cicatrizante desde el siglo XVI; dentro del campo de la odontología es utilizada en diversas partes de la República Mexicana para el tratamiento de úlceras orales, aplicando el extracto de forma directa en la lesión logrando con ello un efecto analgésico y una resolución de la úlcera más rápida. Sin embargo el sustento científico sobre los efectos terapéuticos es escaso, sin tener información sobre el efecto que tiene el extracto de esta planta en la inflamación o proliferación celular para así justificar su uso. Si bien es conocido que la cicatrización oral (principalmente a nivel de mucosa) depende de la comunicación entre epitelio y tejido conjuntivo, y que los fibroblastos son las células más abundantes de este último tejido, se considera importante determinar ¿Qué efecto tiene el extracto de *Sedum dendroideum* sobre la proliferación celular de fibroblastos gingivales a diferentes dosis?



6. JUSTIFICACIÓN

El proceso de cicatrización es una secuencia de eventos que depende de la dinámica celular del tejido lesionado y circundante. Estas células producen factores de crecimiento y citocinas para llevar a cabo la reparación en tres fases: fase inflamatoria, fase de proliferación celular y fase de remodelación, siendo el fibroblasto la célula de mayor relevancia en la fase de proliferación en el tejido conjuntivo de la mucosa oral, éste participa activamente en los procesos de cicatrización y regeneración celular por medio de una respuesta proliferativa activa. Esta propiedad, nos permite utilizarlo en modelos *in vitro* de cultivos celulares, para definir o mejorar nuestro entendimiento de la cicatrización.

Al ser las úlceras orales una lesión frecuente en la población mexicana, independientemente de la causa que las originó, es necesario buscar alternativas eficaces y de bajo costo para su tratamiento, que puedan ser accesibles para la mayor parte de la población y sin efectos adversos. La medicina tradicional mexicana es una opción, ya que cuenta con una gran diversidad de plantas, las cuales son fuente de sustancias activas con actividades terapéuticas para el ser humano, logrando mejorar su calidad de vida; no obstante, aún no se tiene el suficiente soporte científico para validar su difusión.

La búsqueda de nuevos fármacos ofrece la posibilidad de encontrar principios activos en las plantas medicinales las cuales presentan diversos mecanismos de acción con aplicación en la cavidad oral, que a su vez sirven como base para su aplicación en diferentes partes del organismo, sin embargo, esta aplicación deberá probarse en protocolos y/o ensayos de bioseguridad, tales como los estudios *in vitro*.

El trabajar en cultivos celulares permite tener poblaciones celulares homogéneas así como un control preciso de las condiciones físico-químicas y fisiológicas del ambiente donde crecen las mismas, teniendo con ello reproducibilidad de los resultados que se puedan obtener. Así como minimizar las implicaciones éticas y económicas que conlleva el trabajar con animales de laboratorio de primera instancia.

Este es el primer ensayo realizado hasta la fecha donde se prueba el extracto de *Sedum dendroideum* sobre fibroblastos gingivales orales. El determinar cuál es el efecto de este extracto sobre la proliferación celular permitirá mejorar el soporte científico relacionado a un uso y costumbre ya efectuado en la medicina tradicional, el colocarse el jugo de la planta de forma directa sobre úlceras orales.



7. HIPÓTESIS

H1. El extracto de *Sedum dendroideum* inducirá el aumento en la proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos.

H0. No existirá cambio en la proliferación celular ante la exposición al extracto de *Sedum dendroideum*.



8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del extracto de *Sedum dendroideum* en la proliferación celular de cultivos de fibroblastos gingivales humanos.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto del extracto de *Sedum dendroideum* sobre la viabilidad celular a diferentes concentraciones en fibroblastos gingivales humanos.
- Determinar el efecto del extracto de *Sedum dendroideum* sobre la apoptosis de fibroblastos gingivales humanos.



9. DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1 TIPO DE ESTUDIO

- Transversal
- Comparativo

9.2 VARIABLES DEL ESTUDIO

- 9.2.1 VARIABLES INDEPENDIENTES
 - ✓ Tiempo de cultivo
 - ✓ Densidad de cultivo
 - ✓ Concentración de extracto
- 9.2.2. VARIABLES DEPENDIENTES
 - ✓ Proliferación celular



9.3 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

<u>NOMBRE DE LA VARIABLE</u>	<u>TIPO DE VARIABLE</u>	<u>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</u>	<u>DEFINICIÓN OPERATIVA</u>
Tiempo de cultivo	Cuantitativa	Periodo de tiempo en el cual las células serán sometidas a condiciones de cultivo apropiados.	Se establecerán mediciones de 0, 24, 48 y 72 horas como parámetros de referencia para establecer la medición.
Densidad de cultivo celular	Cualitativa	Concentración específica celular por área.	Se realizará conteo celular por la técnica de azul tripano para definir la cantidad de células presentes por unidad de volumen.
Proliferación celular	Cuantitativa	Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular.	A través del ensayo MTT se establecerá el porcentaje de aumento/disminución celular.
Concentración del extracto	Cuantitativa	Cantidad del extracto de <i>Sedum dendroideum</i> que se colocará a los cultivos celulares.	Se utilizarán concentraciones de 0.0125%, 0.025%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5% por cada pozo que contenga 60,000 células.



9.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO

- Fibroblastos gingivales humanos (donadas por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, DPeI)

9.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cultivos aparentemente sanos
- Cultivos a confluencia de 80%

9.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cultivos celulares que muestren signos de contaminación celular

9.7 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Cultivos con desprendimiento o pérdida de adhesión al sustrato accidental u operacional.



10. MATERIAL Y EQUIPO

10.1 RECURSOS

10.1.1 HUMANOS

- Tesista
- Biólogo para el reconocimiento de la planta
- Asesor de técnicas de cultivo celular
- Asesor en ensayos de proliferación celular
- Asesor en la elaboración de extractos orgánicos

10.1.2 MATERIALES

- Alcohol al 70%
- Solución de azul de tripán 0.4% (Corning Cat. 25-900, EU)
- Baño maría (Thermo scientific Modelo 2242, EU)
- Cajas de cultivo de 25 cm² (Corning, E.U)
- Campana de flujo laminar (Baker, Edge gard, Maine, EU)
- Centrífuga Universal (Sorvall, Modelo: 750044, China)
- Hemocitómetro (Sigma – Aldrich, bright – Line E.U)
- Hipoclorito de Sodio
- Incubadora (Queve, Stabil Therm Modelo: QWJ300TABB, E.U.)
- Medio de cultivo D MEM (Santa Cruz Boitechnology SC-224478)
- Suero Fetal bovino (Gibco by life technologies LOT: 1606662 E.U)
- Micro pipetas (Biocentrix)
- Microscopio invertido con contraste de fases y cámara digital (Zeiss Modelo: 37881 E.U.)
- Lector de Placas (Chro – Mate Awareness Technology INC Modelo: 4300 E.U.)
- Líneas celulares de fibroblastos gingivales humanos
- Pipetas serológicas estériles de 5 y 10 ml (Ultra cruz, Santa Cruz technology, México)
- Pipeteador automático (Exacta cruz, E.U.)
- Placas de cultivo de 24 y 96 pozos (Corning, E.U)
- Sistema DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection (PROMEGA G7132, LOT 0000101826, E.U)
- Solución estéril de MTT (Invitrogen V13154, LOT: 11384)
- Solución PBS/EDTA 0.004%



- Termómetro de laboratorio
- Tripsina 0.25% (Gibco by life technologies
LOT: 1391607 E.U)
- Tubos estériles cónicos de 15 ml (Excata
Cruz Technology, China)

10.1.3 FINANCIEROS

Todos los recursos materiales y de infraestructura se obtendrán del área de investigación básica del laboratorio de Patología Bucal clínica y experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, a través del proyecto PAPIIT IN223414.



11. METODOLOGÍA

11.1. ADQUISICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA

Hojas de *Sedum dendroideum* fueron recolectadas de especímenes de vida media del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Las especies fueron identificadas por el Biólogo Jerónimo Reyes Paniagua, curador de la familia *Crasulacea*.

11.2 GENERACIÓN DEL EXTRACTO

Se realizó en el Laboratorio 2-10, Departamento de productos naturales del Instituto de Química de la UNAM, a cargo del Dr. Manuel Jiménez Estrada.

Se lavó con agua bidestilada la muestra de *Sedum dendroideum* y se separaron las hojas del tallo utilizando las hojas centrales de la roseta, se pesó y se obtuvieron 345 gramos de las mismas. Posteriormente se cortaron en trozos de 1 cm aproximadamente y se colocaron en un matraz con 300 ml de agua bidestilada. Se cubrió el matraz por completo con papel de estraza y se dejó en reposo 72 horas a temperatura ambiente. Concluido el tiempo se filtró la solución con algodón y se obtuvieron 250 ml, se dividió la solución en tres matraces que se congelaron a -40°C con una solución de hielo seco y metanol. Se colocaron en una liofilizadora, a una temperatura de -41°C y una presión de 393×10^{-3} milibares, durante 48 horas, obteniéndose así el extracto de *Sedum dendroideum* en polvo.

Así mismo, se realizaron diferentes pruebas para determinar la presencia de diversas sustancias en el extracto de *Sedum dendroideum*:

11.2.1. Azúcares:

Se realizó cromatografía de placa fina utilizando como referencia glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) y sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) y como disolventes dos soluciones, la primera con acetato de etilo y metanol en proporción 1:1 y la segunda Acetato de etilo (100 ml), metanol (16.5 ml) y agua destilada (13.5 ml). Se reveló con sulfato cérico (40 g H_2SO_4 , 12 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ y 350 g hielo).

11.2.2. Alcaloides:

Se realizó la prueba con reactivo Dragendorff en una cromatoplaca usando como referencias glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) y sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) y como disolventes acetato de etilo y metanol a una proporción 1:1. Como



revelador se utilizó la solución de Dragendorff (8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua).

11.2.3. Flavonoides

Se realizó una cromatoplaqueta utilizando como referencia los flavonoides: Rutina, Quercetina y Kamferol, como disolventes acetato de etilo y metanol en proporción 1:1. Se utilizó un revelador para flavonoides (solución metanólica al 1% de ácido 2 amino etil ester difenil bórico).

Así mismo se obtuvo el punto de fusión del extracto y se realizaron pruebas de solubilidad del extracto en los siguientes disolventes: hexano, acetato de etilo, acetona, metanol, dicloro, etanol y agua.

11.3 OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES

Previo cumplimiento de las normas éticas para la investigación sobre seres humanos, las líneas celulares de fibroblastos gingivales humanos (donadas por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez) fueron cultivadas en una atmósfera humidificada del 5% CO₂/95% de aire a 37 ° C durante una semana, al término de la misma se cambió el medio.

Al llegar al 80% de confluencia, las células se sub cultivaron por tripsinización: se eliminó el medio en su totalidad, se lavaron las células con PBS/EDTA 0.004% (ácido-etilen-diamino-tetraacético), se colocaron en tripsina al 0.25% y se incubaron a 37° C por 5 minutos, se observó retracción citoplasmática al microscopio. Se agregó medio D-MEM/SFB 10% para poner fin a la digestión. La muestra se centrifugó a 1800 RPM durante 3 minutos. El sobrenadante se desechó y se re suspendieron las muestras en medio DMEM/SFB 10% (9 ml) y se colocaron 3 ml de la misma en cajas de 25 cm², obteniéndose así tres cultivos celulares. Las células se incubaron en condiciones estándares y se evaluaron al microscopio, cambiándose el medio de cultivo dos veces por semana. Es importante señalar que este proceso se realizó hasta llegar al tercer pase, con ello se obtuvo una población celular estable que nos permitió realizar los ensayos propios de la investigación.

11.4 ENSAYO DE CONCENTRACIÓN TOXICA MEDIA

Se sembraron fibroblastos gingivales en placas de 24 pozos, utilizando concentraciones de 60 000 células por pozo teniendo un control de PBS, se incubaron a condiciones estándares y se realizó cada ensayo por triplicado. Se colocaron las siguientes concentraciones del extracto: 0.0125%, 0.025%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2% y



5% en cada pozo, al término de 24 horas se realizó el conteo celular de cada uno con la técnica de azul tripano:

1. Se tomó 10 μ L de la suspensión celular a evaluar y colocó en un microtubo.
2. Se agregó 90 μ L de azul tripan al 0.4% y se unificó la suspensión por pipeteo.
3. Se colocó 10 μ L de la mezcla en cada cámara del hemocitómetro, se observó en el microscopio y se contó por separado a las células muertas y vivas para cada uno de los cuadros por considerar.
4. Se calculó los resultados:

- Células por mililitro:

Cuenta de células vivas/número de cuadros evaluados x factor de dilución x 10,000

- Células totales:

Células por mililitro x volumen (en ml) total del cual fueron extraídas las células evaluadas.

- Viabilidad celular (%)

(Número de células vivas totales) / número de células totales [vivas + muertas] x 100

Con ello se obtuvo las concentraciones a conveniencia que son mejor toleradas por las células y con las cuales se trabajó en los ensayos posteriores.

11.5 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON CONCENTRACIÓN TÓXICA MEDIA DEL EXTRACTO DE *Sedum dendroideum* EN DENSIDAD CELULAR DEFINIDA

Se sembraron fibroblastos gingivales en placas de 96 pozos, utilizando concentraciones de 10 000 células por pozo, se colocó el extracto de *Sedum dendroideum* en los pozos con las concentraciones obtenidas del ensayo de toxicidad media, además de tener un control de PBS y otro de medio DMEM/SFB10%, las células se incubaron a condiciones estándares, realizándose cada ensayo por triplicado y lecturas a las 0, 24, 48 y 72 horas, transcurrido el tiempo de cada lectura se colocaron 10 μ L de MTT y se incubaron 4 horas, posteriormente se agregó 50 μ L de DMSO y se realizó la lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm. Se graficaron los resultados, obteniéndose con ello el comportamiento de los fibroblastos ante el extracto de *Sedum dendroideum* (aumento, reducción o efecto nulo en la proliferación celular) en comparación con el grupo control.



11.6 ENSAYO PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL EXTRACTO DE *Sedum dendroideum* SOBRE LA APOPTOSIS DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

Se utilizó el ensayo Ensayo DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System, siguiendo las instrucciones del fabricante para el uso del mismo. Se empleó una concentración de 60 células por pozo en cajas de 24 pozos, utilizando dos controles y dos concentraciones del extracto (obtenidas en ensayos previos), las cuales fueron fijadas en una solución de formalina al 10% durante 25 minutos, se lavaron 2 veces cada pozo con PBS durante 5 minutos, posteriormente se colocó Tritón X-100 al 0.2% durante 5 minutos, terminado el tiempo se lavaron 2 veces con PBS durante 5 minutos. Se agregaron 100 µl de Buffer de equilibrio a temperatura ambiente por 5-10 minutos, después se agregaron 100 µl de la mezcla de reacción TdT a las células y se incubaron por 60 minutos a 37° C, para detener la reacción se agregó 2X SSC por 15 minutos, al término de este tiempo se lavaron las células 2 veces con PBS durante 5 minutos. Seguido de esto se colocó peróxido de hidrógeno al 0.3% por 3-5 minutos, lavando con PBS 2 veces durante 5 minutos al término del tiempo. Se agregaron 100 µl de solución Streptavidin HRP (diluido 1:500 en PBS) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, lavando 2 veces con PBS terminando el tiempo. Por último se tiñeron las células agregando 100 µl de solución DAB a cada pozo durante 10 minutos y lavando con agua desionizada hasta que ésta salió limpia. Se observaron las células al microscopio y se analizaron los resultados para determinar el efecto del extracto de *Sedum dendroideum* sobre la apoptosis de fibroblastos gingivales humanos.

11.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos obtenidos en cada ensayo se realizó un análisis descriptivo de las variables a través de medidas de tendencia central (promedio) y dispersión (desviación estándar), utilizando el programa Excel. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para cada concentración en relación a tiempo, así como la prueba t de Student considerando una $P < 0.05$. Se empleó el programa SPSS versión 17.0 (IBM, Chicago).

12. RESULTADOS

12.1 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Sedum dendroideum*

El análisis cromatográfico de *Sedum dendroideum* para azúcares reportó que el extracto carece de los monosacáridos glucosa y sacarosa (Fig. 1). El análisis para alcaloides también presentó resultados negativos (Fig. 2). Para la cromatografía de flavonoides la prueba es positiva sí se observa un color rojo, rosado, morado o naranja en la solución, se obtuvo una ligera coloración naranja en la columna del extracto, se presume con ello la presencia de flavonoides (Fig. 3).



Fig. 1
De izquierda a derecha: Glucosa, Sacarosa y extracto de *Sedum dendroideum*



Fig. 2
Análisis de alcaloides en el extracto de *Sedum dendroideum*



Fig. 3
De izquierda a derecha: Rutina, Quercetina, Kamferol y extracto de *Sedum dendroideum*

El intervalo del punto de fusión que se obtuvo fue de 122 °C a 128 °C, así mismo las pruebas de solubilidad reportaron que el extracto sólo es soluble en agua.



12.2 CONCENTRACIÓN TOXICA Y VIABILIDAD CELULAR

Se analizó un total 8 dosis experimentales, seleccionadas a conveniencia. La concentración 0.0125% fue la única que mostró un efecto positivo respecto a la viabilidad celular. Al aumentar la concentración del extracto se observó mayor descenso de la viabilidad alcanzando un máximo de reducción del 76% para la concentración del 2% y 5% (Tabla 1. Fig. 4).

Tabla 1. Resultados de viabilidad celular	
Concentración del extracto (%)	Viabilidad celular (%)
0.0125	+11.9
0.025	-4
0.05	-12
0.02	-52
0.5	-64.4
1	-47.9
2	-76
5	-76

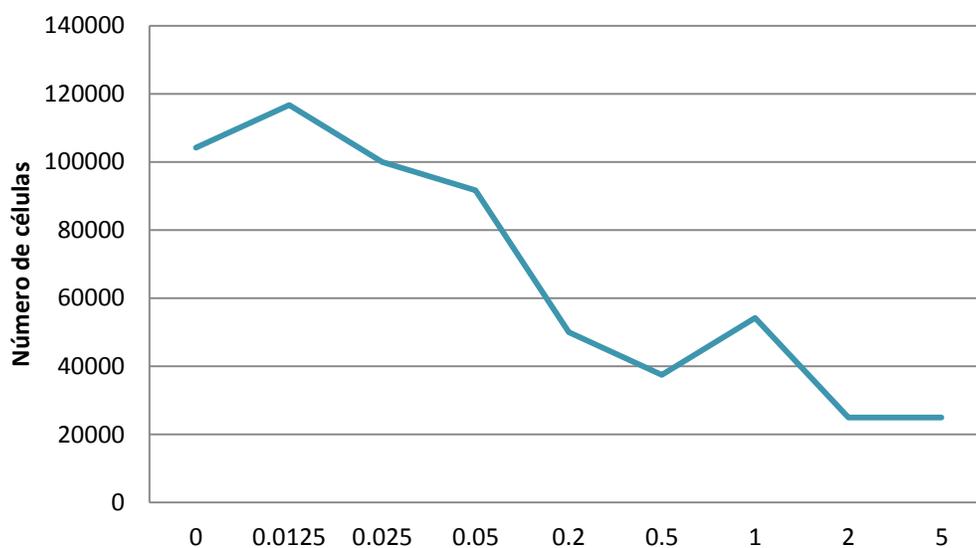


Fig. 4. Representación gráfica de viabilidad celular.



12.3 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para este ensayo se seleccionaron únicamente las concentraciones de 0.0125% y 0.025%. El análisis MTT para medir la proliferación celular indicó un efecto diferencial únicamente a las 24 horas de cultivo, ya que se observó que la concentración 0.0125% promovía mayor proliferación comparado a la concentración de 0.025%. Al tiempo de 48 y 72 horas se observó una conducta similar para ambas concentraciones en relación al control (Tabla 2. Fig. 5). El análisis estadístico indicó diferencias significativas en relación al tiempo para los grupos control, 0.0125% y 0.025%. Para el grupo control la diferencia significativa ($p=0.011$) se observó entre el control y las 72 horas, para el grupo de 0.0125% se observó un cambio significativo a las 24 horas y 72 horas ($P=0.006$ y $P=0.015$ respectivamente). Para el grupo de 0.025% se observó cambios significativos a las 72 horas ($P=0.008$).

Tabla 2 Análisis de proliferación

TIEMPO (Horas)	CONTROL	0.0125%	0.025%
0	0.64	0.62	0.655
24	0.699	0.827*	0.743
48	0.649	0.63	0.644
72	0.931*	0.942*	0.908*

* Resultados significativos $P<0.05$

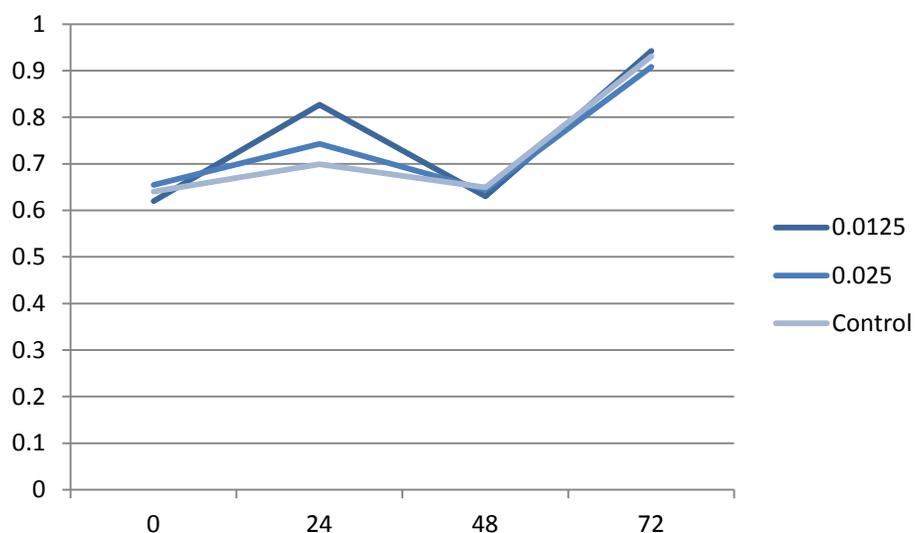


Fig. 5. Representación gráfica de proliferación células (ensayo MTT). Comparativo de dosis 0.0125% vs 0.025% de extracto acuoso de *Sedum dendroideum*.



12.4 ENSAYO DE APOPTOSIS CELULAR

Para este ensayo se utilizaron las concentraciones 0.0125% y 0.025%. El ensayo DeadEnd nos indicó un aumento en la apoptosis celular en la dosis 0.0125% comparado con el grupo control y la concentración 0.025% (Tabla 3. Fig. 6)

Tabla 3. Análisis de apoptosis celular

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO	PORCENTAJE DE MUERTE CELULAR
CONTROL	0.66
0.0125	0.86
0.025	0.33

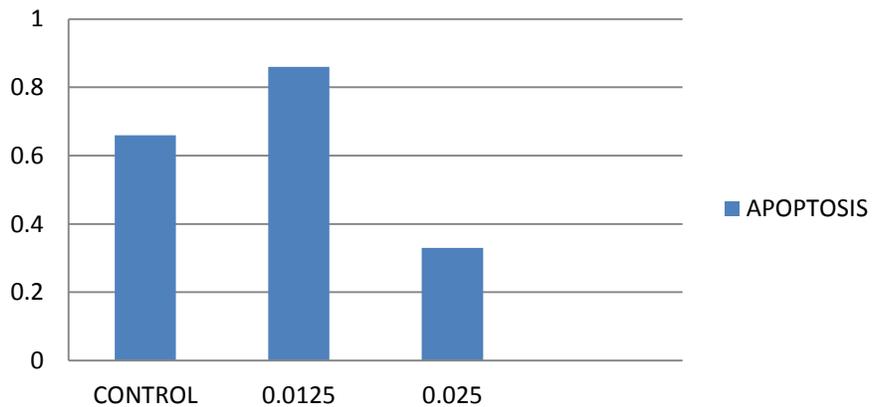


Fig. 6. Representación gráfica de apoptosis celular. La concentración 0.0125% presentó mayor apoptosis que el grupo control y experimental de 0.025%.



13. DISCUSIÓN

Sedum dendroideum es una planta mucilaginosa reconocida en la medicina tradicional mexicana por su uso en el tratamiento de úlceras orales desde hace varios siglos. Dentro de las actividades biológicas de *Sedum dendroideum* se ha comprobado su efecto antiinflamatorio y analgésico atribuido a su composición química.

30, 31

Al realizar la cromatografía de capa fina para identificar la presencia de flavonoides, el extracto tomó una coloración amarilla al ser impregnada con el revelador de productos naturales, al analizarlo en la cámara ultravioleta ($\lambda=365\text{ nm}$) se observó una coloración naranja, asumiendo con ello la presencia de genérica de flavonoides. Giany O. De Melo y Cols., en 2005 reportaron la presencia de diferentes flavonoides en el jugo de las hojas de *Sedum dendroideum*, siendo Kaempferin el más abundante. Estos mismos autores evaluaron la actividad antiinflamatoria en ratones mediante la prueba de migración de leucocitos inducida por carragenina, observando que los flavonoides inducían la inhibición en la migración de leucocitos. La regulación de la respuesta inflamatoria es básica para la cicatrización de un tejido u órgano, sin embargo no es el único fenómeno presente, ya que la proliferación o potencial mitogénico también figura de manera importante. Es en parte porqué se decidió analizar el efecto del extracto de *Sedum dendroideum* en relación a una importante parte de la cicatrización como es la proliferación, la cual no ha sido estudiado a pesar de ya ser una estrategia utilizada en la medicina tradicional.^{30, 31}

Al analizar diferentes concentraciones de *Sedum dendroideum* se observó un efecto diferencial en relación a la concentración, es decir, a mayor dosis se presentó mayor efecto tóxico, observando que las dosis menores preservaban la viabilidad celular; éste fenómeno ha sido observado en otros estudios de manera inversa. Madrid MA y Cols., en 2010 utilizaron el extracto etanólico de *Calendula officinalis* en la proliferación celular de fibroblastos gingivales *in vitro* en concentraciones de 750, 500, 150 y 100 $\mu\text{g/ml}$, logrando el mayor efecto proliferativo en concentraciones de 750 y 500 $\mu\text{g/ml}$ a las 12 horas.³² Lo cual sugiere que los extractos naturales pueden tener efecto dimórfico o bivalente, es decir, según su concentración se puede obtener dos resultados o respuestas.³²

En este estudio se logró demostrar que el extracto acuoso de *Sedum dendroideum* posee un efecto estimulante en la proliferación de fibroblastos gingivales a una concentración de 0.0125% en las primeras 24 horas, no presentando cambios importantes a las 48 y 72 horas en comparación al grupo control, esto nos sugiere que los componentes del extracto que son responsables de inducir la proliferación celular pueden tener una vida media aproximada de 24 horas. Gutiérrez-Venegas y Cols. posterior a estimular fibroblastos



gingivales con LPS bacteriano observaron que el administrar flavonoides de extractos de plantas puede tener un efecto inhibitor sobre la vía MAPK/cinasas, la cual es una vía de señalización asociada comúnmente con proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Este fenómeno podría relacionarse con el observado en nuestras mediciones de 48 y 72 horas; no obstante, debe ser determinado ante el compuesto obtenido del aislamiento de diversas sustancias tales como alcaloides, taninos, flavonoides y compuestos cianogénicos.^{33, 34}

El ensayo DeadEnd nos permitió analizar la cantidad de células que mueren por apoptosis, nuestros resultados sugieren un porcentaje mayor de muerte celular ante la concentración de 0.0125%. Este resultado puede relacionarse con la mayor proporción de células presentes en esta dosis, ya que, como se mencionó antes, esta concentración estimulo mayor proliferación de fibroblastos gingivales a las 24 hrs. Esto nos abre la pregunta de cuál es la relación proliferación-muerte generada por este extracto, lo cual es importante para poder asignar cual es efecto predominante de éste, reforzando la incógnita de cuál será el elemento o compuesto particular responsable. Para el grupo 0.025% se observó menor proporción de apoptosis, incluso que el grupo control, lo cual nos sugiere que la muerte celular por esta dosis deriva de otro mecanismo, tal como la necrosis celular. Se considera que la apoptosis en un tejido u órgano genera menos eventos adversos comparado a la necrosis ya que una muerte celular programada induce menos inflamación y respuesta inmune celular.²⁷ Sin embargo es importante seguir investigando, ya que esta es la primera ocasión que se realizan estudios relacionados con este tema.



14. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que el extracto de *Sedum dendroideum* contiene flavonoides en su composición química y sobre los fibroblastos gingivales presenta un efecto bivalente o dimórfico en relación a la dosis, ya que en una concentración del 0.0125% (concentración más baja establecida para esta investigación) aumenta la proliferación celular en los fibroblastos gingivales *in vitro* y a concentraciones mayores puede comprometer la viabilidad celular, este fenómeno se refuerza con los resultados de apoptosis que nos muestran que realmente puede inducir la muerte celular.

El uso de plantas medicinales es una práctica común alrededor del mundo; de acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de Salud, 80 por ciento de la población de los países en desarrollo recurre a distintos tipos de ellas para satisfacer o complementar sus necesidades médicas, porcentaje que aumenta cada año.

Actualmente, la importancia de las plantas medicinales radica no sólo en su riqueza como parte de la tradición milenaria, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza en cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas.

En México, la cantidad de plantas usadas por sus propiedades curativas, de las cuales se tiene registro, asciende a cinco mil especies; sin embargo, se estima que sólo 5 por ciento han sido estudiadas para validar química, farmacológica y biomédicamente los principios activos que contienen, en los cuales reside su utilidad médica, en ello radica la importancia de realizar este tipo de investigaciones para encontrar nuevas terapias en el tratamiento de afecciones con alta incidencia como lo son la úlceras en cavidad oral.

Con base a estos resultados no podemos concluir un efecto positivo o negativo sobre la proliferación/viabilidad celular de fibroblastos gingivales ya que se trabajó con extracto no fraccionado de *Sedum dendroideum*, esto nos abre la puerta a realizar futuras investigaciones sobre los efectos que tiene cada componente en específico del extracto.



15. BIBLIOGRAFÍA

1. Bucay Waizel J. *Las plantas medicinales y las ciencias: Una visión multidisciplinaria*. México: Instituto Politécnico Nacional; 2006.
2. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana [base de datos en línea]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2009 [Citado 2014 Feb 21] URL disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>
3. Osuna Torres L. *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales*; España: Universidad de Barcelona; 2005.
4. Regezzi A, Sciubba J. *Patología bucal*. 3ª ed. México: Interamericana; 2000.
5. Martínez Maximino. *Las plantas medicinales de México*, Vol. 1. México: Librería y ediciones botas; 2004.
6. Muñoz López de Bustamante F. *Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado*. España: Grupo mundi-prensa; 2002.
7. Meyran, J. *The Generic Classification of the Mexican Crassulaceae, Cactus & Succulent*. Journal of America. 1991; 63(3): 115-121.
8. Hemsley. *Biologia Centrali Americana*. Botany. 1880; Vol. I: 394.
9. Reiche C; *Flora exclusiva en el valle central de México*; México: Porrúa; 1977.
10. Reyes J. y Cols. *Echeveria, Manual del perfil diagnóstico del género Echeveria en México*. Universidad Autónoma Chapingo: Grupo publicitario imagen digital; 2011.
11. Clausen, R. T. *Sedum of the Trans-Mexican Volcanic Belt*. Ithaca: Cornell Univ. Press; 1959.
12. Meyrán J y L. López. *Las crasuláceas de México*. México: Sociedad Mexicana de Cactología, A.C.; 2003.
13. Dood, AN., AM. Borland, R.P. Haslam, H. Griffiths y K. Maxwell. *Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic*. Journal of experimental botany. 2002; 53: 569-580.
14. Martínez Máximo E. *Flora del Estado de México, tomo III*. México: Biblioteca enciclopedia del Estado de México; 1972.
15. Meyran, J. *The generic classification of the mexican crassulaceae, cactus & succulent*. Journal of America. 1991; 63(3): 115 – 121.
16. Briton & Rose, J. *N:North American Flora*, 22(1): 69-70, 1905
17. Crassulaceae base de datos [Base de datos en línea] México: Julia Etter & Martin Kristen, 1997-2015 [Citado 2014 marzo 12] URL disponible en http://www.crassulaceae.com/crassulaceae/crashome_es.asp



18. Sapp Philip y Cols. *Patología general y maxilofacial contemporánea*. 2ª ed. España: Elsevier; 2005.
19. Avery J, Chiego D. *Histología y embriología oral con orientación clínica*. 3ª ed. España: Evolve; 2002.
20. Junqueira L, Carneira J. *Histología básica, texto y atlas*. 6ª ed. España: Elsevier, 2005.
21. Geneser F. *Histología sobre bases moleculares*. 3ª ed., Buenos Aires: Médica Panamericana, 2001.
22. Neville W, y Cols. *Oral and maxillofacial pathology*. 3ª ed. China: Elsevier; 2009.
23. Cawson RA. *Fundamentos de Medicina y patología oral*. 8ª ed. México: Elsevier; 2009.
24. Bagán, JV y Cols. *Medicina bucal*. España: Mason; 1995.
25. Leyva HE., Gaitán CL. *Patología general e inmunología*. México: Trillas; 2008
26. Robbins LS, Cotran SR, Kumar V. *Patología Estructural y Funcional*. 8ª ed. México: Interamericana; 2011.
27. Rubin R., Strayes D., *Patología: fundamentos clínico - patológicos en medicina*. 6ª ed. China: Kluner; 2012.
28. Freshley RI. *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique and specialized applications*, Wiley - Blackwell, UK, 6ª Edition, 2010
29. Life technologies [base de datos en línea]. México: Thermo Fisher Scientific; 2015 [Citado 2014 Feb 14] URL disponible en <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>
30. De Melo GO, Malvar Ddo C, Vanderlinde FA, Rocha FF, Pires PA, Costa EA, et al. *Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from Sedum dendroideum*. J Ethnopharmacol. 2009; 124(2): 228-232.
31. De Melo GO, Malvar Ddo C, Vanderlinde FA, Pires PA, Côrtes WS, Filho PG, et al. *Phytochemical and pharmacological study of Sedum dendroideum leaf juice*. J Ethnopharmacol. 2005; 102(2): 217-220.
32. Madrid MA, Mahecha LC y Cols., *Efecto de la caléndula officinalis en la proliferación del fibroblasto gingival humano*. Univ Odontol. 2010 Jul – Dic. 29(63): 107 – 112.
33. Gutiérrez G., Jiménez M. y Maldonado S., *The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide – treated human gingival fibroblasts* .J International Immunopharmacology 2007; 7: 1199-1210.
34. López-Angulo, G. et al., *Chemical composition and antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three Echeveria DC. species from Mexico*. Arabian Journal of Chemistry, 2014.