



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE  
*Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. ESPECIE  
UTILIZADA EN LA MEDICINA TADICIONAL PARA  
SANAR HERIDAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**LÍAN MISHEL SÁNCHEZ CÁZARES**



**DIRECTORAS DE TESIS:  
DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ  
DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMÚDEZ**

**Ciudad Universitaria Cd. Mx.,  
2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 2-4 del Instituto de Química de la UNAM, con la asesoría del Dr. Ricardo Reyes Chilpa y en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, con el apoyo y la asesoría científica de la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT DGAPA UNAM). Proyecto IG200513 “Compuestos antivirales (VIH-1) de árboles tropicales (Clusiaceae) de México: Estudio químico y toxicogenómico” por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al proyecto CONACYT-FOSISS-161687, por el apoyo económico otorgado al INR para la realización de este trabajo.

Al proyecto IN210016 “Bioprospección de la Flora Mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral” por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al programa “Nuevas alternativas de tratamiento para enfermedades infecciosas de importancia nacional” del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por el apoyo otorgado en la realización de este trabajo.

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco  
Dra. Mayra Silva Miranda  
Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez  
Dr. Ricardo Reyes Chilpa  
Dra. Phaedra Suriel Silva Bermúdez

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la UNAM, en especial a la Facultad de Ciencias por mi educación.

Agradezco al INR, tanto al equipo del laboratorio de Biotecnología como al de la UITTC y MR por el apoyo brindado en la realización de esta tesis.

Al Instituto de Química, laboratorio 2-4 por permitirme incorporar a su grupo de trabajo.

A mis tutoras, la Dra. Laura y la Dra. Phaedra por su apoyo, confianza, amistad y por todos los conocimientos compartidos conmigo.

A la Dra. Ma. Cristina Velasquillo Martínez por todo el apoyo brindado y por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo.

Al M. en C. Armando Gómez Campos por la valiosa información proporcionada para esta tesis y por su apoyo en la colecta del material vegetal.

A la M. en C. Rosa María Fonseca Juárez por su apoyo en la revisión de herbarios y en el mapa de distribución de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz). Engl. en México.

A mis profesores y compañeros de taller, por todo el tiempo y aprendizaje compartido.

A todos los compañeros de laboratorio, amigos y familia que me brindaron su apoyo durante la carrera y que me impulsan siempre para seguir adelante.

*Dedicada a mis padres y a mi hermano.*



## ÍNDICE

	Pág.
<b>Índice general</b> .....	V
<b>Índice de figuras</b> .....	VII
<b>Índice de tablas</b> .....	IX
<b>Abreviaturas</b> .....	X
<b>I. Resumen</b> .....	1
<b>II. Introducción</b> .....	3
2.1 La piel y sus características generales.....	3
2.2 Heridas en la piel.....	6
2.3 Proceso de cicatrización de heridas.....	7
2.4 Tratamiento de heridas.....	10
<b>III. Antecedentes</b> .....	11
3.1 <i>Phyllonoma laticuspis</i> (Turcz.) Engl. ....	11
3.2 Estudios químicos previos de <i>Phyllonoma laticuspis</i> (Turcz.) Engl. ....	16
<b>IV. Hipótesis</b> .....	18
<b>V. Objetivo general</b> .....	18
5.1 Objetivos particulares .....	18
<b>VI. Material y Métodos</b> .....	19
6.1 Colecta y preparación del material vegetal.....	19
6.2 Obtención de extractos.....	20
6.2.1 Extractos orgánicos .....	20
6.2.2 Extracto acuoso.....	22
6.3 Análisis del perfil Cromatográfico en Capa Fina de los extractos .....	23
6.4 Ensayos biológicos.....	23
6.4.1 Cultivo celular de fibroblastos.....	23
6.4.2 Pase de fibroblastos y cuantificación celular .....	24
6.4.3 Ensayo de MTT .....	26
6.4.4 Curva de proliferación de fibroblastos .....	27
6.4.5 Curva de calibración de MTT.....	27

6.4.6	Ensayo de citotoxicidad de extractos por medio de MTT .....	28
6.4.7	Estandarización del ensayo de cierre de herida <i>in vitro</i> .....	29
6.4.8	Ensayo de cierre de herida con fibroblastos tratados con mitomicina-C .....	32
6.4.9	Ensayo de citotoxicidad en células Vero .....	33
6.5	Fraccionamiento del extracto con mayor actividad por medio de Cromatografía en Columna .....	33
6.6	Análisis estadístico.....	35
<b>VII.</b>	<b>Resultados</b> .....	36
7.1	Rendimiento de los extractos .....	36
7.2	Perfil cromatográfico de los extractos.....	36
7.3	Curva de calibración de MTT .....	38
7.4	Curva de proliferación de fibroblastos .....	39
7.5	Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos: Método de MTT .....	41
7.6	Evaluación del potencial efecto cicatrizante <i>in vitro</i> : ensayo de cierre de herida .....	42
7.7	Evaluación del efecto de la mitomicina-C sobre el potencial cicatrizante de los extractos.....	49
7.8	Concentración inhibitoria 50 (CI <sub>50</sub> ) del extracto metanólico en células Vero .	55
7.9	Fraccionamiento del extracto metanólico: Cromatografía en Columna .....	56
7.10	Perfil cromatográfico de las fracciones metanólicas .....	57
7.11	Evaluación de la cicatrización <i>in vitro</i> : fracciones metanólicas .....	58
<b>VIII.</b>	<b>Discusión de resultados</b> .....	60
<b>IX.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	67
<b>X.</b>	<b>Perspectivas</b> .....	68
<b>XI.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	69



## Índice de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema de la anatomía de la piel y sus principales componentes .....	5
<b>Figura 2.</b> Corte histológico de piel .....	6
<b>Figura 3.</b> Distribución del género <i>Phyllonoma</i> a nivel mundial .....	12
<b>Figura 4.</b> Distribución de <i>P. laticuspis</i> en México .....	13
<b>Figura 5.</b> Esquema de una inflorescencia de <i>P. laticuspis</i> .....	14
<b>Figura 6.</b> Microscopia electrónica de barrido de una flor de <i>P. laticuspis</i> .....	14
<b>Figura 7.</b> Fruto de <i>P. laticuspis</i> creciendo sobre la vena media del ápice de la hoja ...	15
<b>Figura 8.</b> Ejemplar de herbáριο de <i>P. laticuspis</i> .....	19
<b>Figura 9.</b> Evaporación al vacío de los disolventes en rotavapor.....	21
<b>Figura 10.</b> Proceso de obtención del extracto acuoso.....	22
<b>Figura 11.</b> Reacción metabólica de la sal Metil-Tiazol-Tetrazolio (MTT) a formazán ...	26
<b>Figura 12.</b> Tratamientos aplicados a las células en cultivo para evaluar el posible efecto citotóxico de los extractos de <i>P. laticuspis</i> .....	29
<b>Figura 13.</b> Obtención de heridas por medio de raspado vertical con punta de micropipeta .....	30
<b>Figura 14.</b> Monocapa celular de fibroblastos en cultivo y herida obtenida por raspado vertical con punta de micropipeta.....	31
<b>Figura 15.</b> Cromatografía en Columna para el fraccionamiento del extracto metanólico .....	34
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico de los extractos orgánicos de <i>P. laticuspis</i> .....	37
<b>Figura 17.</b> Curva de calibración de la proliferación celular por el ensayo de MTT .....	38
<b>Figura 18.</b> Curva de proliferación de fibroblastos humanos en cultivo .....	39
<b>Figura 19.</b> Fotografías de las heridas a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento con el extracto de AcOEt a las concentraciones de 0.1 y 0.01 µg/mL.....	43
<b>Figura 20.</b> Fotografía de las heridas a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento con el extracto MeOH a las concentraciones de 0.1 y 0.01 µg/mL.....	44
<b>Figura 21.</b> Fotografías de las heridas a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento con el extracto acuoso a las concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01 µg/mL .....	45

<b>Figura 22.</b> Gráfica que representa el porcentaje de cierre de herida a las 24 horas de tratamiento con los extractos de <i>P. laticuspis</i> .....	47
<b>Figura 23.</b> Gráfica que representa el porcentaje de cierre de herida a las 48 horas de tratamiento con los extractos de <i>P. laticuspis</i> .....	48
<b>Figura 24.</b> Fotografías de las heridas tratadas con mitomicina-C, a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento con el extracto AcOEt a las concentraciones de 0.1 y 0.01 µg/mL.....	50
<b>Figura 25.</b> Fotografía de las heridas tratadas con mitomicina-C, a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento con el extracto MeOH a las concentraciones de 0.1 y 0.01 µg/mL.....	51
<b>Figura 26.</b> Fotografías de las heridas tratadas con mitomicina-C, a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento con el extracto acuoso a las concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01 µg/mL .....	52
<b>Figura 27.</b> Gráfica que representa el porcentaje de cierre de heridas mitomizadas, a las 24 horas de tratamiento con los extractos de <i>P. laticuspis</i> .....	53
<b>Figura 28.</b> Gráfica que representa el porcentaje de cierre de heridas mitomizadas, a las 48 horas de tratamiento con los extractos de <i>P. laticuspis</i> .....	54
<b>Figura 29.</b> Curva concentración-respuesta de la actividad inhibitoria del extracto MeOH en células Vero. ....	55
<b>Figura 30.</b> Perfil cromatográfico del extracto metanólico comparado con las fracciones obtenidas a partir de dicho extracto .....	57
<b>Figura 31.</b> Gráfica del porcentaje de cierre de herida a las 24 horas de tratamiento con las fracciones del extracto MeOH de <i>P. laticuspis</i> .....	58
<b>Figura 32.</b> Gráfica del porcentaje de cierre de herida a las 48 horas de tratamiento con las fracciones del extracto MeOH de <i>P. laticuspis</i> .....	59

## Índice de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Estudio fitoquímico preliminar de los extractos de <i>P. laticuspis</i> .....	17
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento obtenido del material vegetal de <i>P. laticuspis</i> .....	36
<b>Tabla 3.</b> Número calculado de células a diferentes días de cultivo, obtenido a partir de la extrapolación de las lecturas de absorbancia en la curva de calibración de MTT.....	40
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos tratados con los extractos de <i>P. laticuspis</i> , evaluado por medio de MTT .....	41
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento obtenido en las fracciones del extracto metanólico.....	57

## Abreviaturas

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>AcOEt+H</b>	Fracción de 70% Acetato de Etilo- 30% Hexano
<b>Anti/Anti</b>	Antibiótico-Antimicótico (penicilina/estreptomicina)
<b>CC</b>	Cromatografía en Columna
<b>CCF</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>cm</b>	Centímetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro cuadrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>DMEM</b>	Medio de Cultivo Mínimo Esencial (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b><i>et al</i></b>	Expresión del Latín, "y otros"
<b>Fig.</b>	Figura
<b>g</b>	Gramos
<b><i>in vitro</i></b>	Expresión del Latín, "dentro del vidrio"
<b><i>in vivo</i></b>	Expresión del Latín, "dentro del vivo"
<b>L</b>	Litro
<b>m</b>	Metro
<b>M. en C.</b>	Maestro en Ciencias
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MeOH-F</b>	Fracción de 100% Metanol
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (Metil-Tiazol-Tetrazolio)
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PBS</b>	Buffer Salino de Fosfatos (del inglés, Phosphate Buffered Saline)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto

<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>µg/mL</b>	Microgramos por mililitro
<b>µL/pozo</b>	Microlitros por pozo
<b>µL</b>	Microlitros
<b>°C</b>	Grados Centígrados

## I. Resumen

La cicatrización es un proceso complejo por el cual se lleva a cabo la reparación de heridas, en el caso de la piel, conduce a la regeneración del epitelio y al reemplazamiento de la dermis por un tejido cicatrizal. Este proceso consta de tres fases (inflamatoria, proliferativa y de remodelación) que actúan simultáneamente y que dependen de la acción de células y proteínas que estimulan el crecimiento, reparación y remodelación del tejido lesionado. Los fibroblastos son una de las primeras células que participan en este evento ya que son los responsables de liberar factores de crecimiento, de la formación de fibras de colágena y de la migración, proliferación, adhesión celular y la diferenciación fenotípica con el fin de reparar la herida.

Existen factores que pueden afectar y retrasar este proceso, una de las principales causas son las infecciones; debido a ello existen una serie de medicamentos y terapias alternativas como el uso de plantas medicinales que son empleadas por sus propiedades cicatrizantes, antisépticas y antiinflamatorias. Tal es el caso de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. conocida como “encarnadora” o “la hierba del venado”, la cual Vega en 2002 y Alcántara *et al.* en 2017 mencionan que es utilizada en el estado de Guerrero para la cicatrización de heridas en la piel. Sin embargo, no se tienen conocimientos científicos que avalen esta propiedad. Es por eso que en el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad y el potencial efecto cicatrizante en cultivo de fibroblastos, de los extractos orgánicos y acuoso de las hojas de *P. laticuspis* (Turcz.) Engl. por medio del ensayo *in vitro* de cierre de herida. Para ello se colectó la planta y se realizaron extractos orgánicos con los disolventes de polaridad ascendente: hexano, AcOEt y MeOH; y se obtuvo un extracto acuoso por medio de una infusión, siguiendo el método tradicional empleado por

la comunidad. Para la evaluación biológica se realizaron ensayos de citotoxicidad con Metil-Tiazol-Tetrazolio (MTT) y del potencial cicatrizante de los extractos obtenidos por medio de la evaluación de la migración de fibroblastos humanos *in vitro* mediante el ensayo de cierre de herida.

Los resultados demostraron que el extracto AcOEt a las concentraciones 1, 0.1 y 0.01 µg/mL y el extracto MeOH a la concentración de 1 µg/mL producen un efecto citotóxico sobre los cultivos de fibroblastos. En cuanto al potencial efecto cicatrizante de los extractos se observó que los extractos Acuoso y MeOH a la concentración de 0.01 µg/mL estimulan el cierre de la herida por medio de la migración/proliferación celular de los fibroblastos hacia el sitio de la herida, produciendo un efecto significativo con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento.

A partir de los resultados obtenidos se determinó que el extracto MeOH es el que presenta un mayor efecto cicatrizante, mismo que puede contener los metabolitos responsables de la actividad, debido a ello se realizó una Cromatografía en Columna del extracto con la cual se obtuvieron dos fracciones MeOH-F y AcOEt-H, y se evaluó el potencial efecto cicatrizante producido por éstas, observando que a las 48 horas de tratamiento la MeOH-F presenta un efecto significativo con respecto al control y un porcentaje de cierre de herida mayor al del extracto MeOH sin fraccionar.

Estos resultados arrojan las primeras evidencias de que el extracto MeOH de *P. laticuspis* (Turcz.) Engl. estimula a los fibroblastos en las primeras fases de la cicatrización y promueven la adhesión y la proliferación/migración *in vitro*, eventos importantes en la reparación de las heridas.

## II. Introducción

### 2.1 La piel y sus características generales

La piel es la primera línea de defensa del cuerpo humano, protege al organismo de fuerzas físicas, agentes químicos, microorganismos y patógenos (Paul *et al.*, 2011). Es el órgano más grande del cuerpo, con una superficie de 1.5-2 m<sup>2</sup> y constituye el 16% del peso corporal. Cumple con un gran número de funciones como la regulación de la temperatura corporal, es una barrera de protección, reduce el daño de la radiación ultravioleta, actúa como órgano sensitivo, previene la pérdida de líquidos, excreta sudor y sebo por sus diferentes glándulas e incluso absorbe la radiación ultravioleta mientras sintetiza vitamina D (Mescher, 2010; Paul *et al.*, 2011; Meruane y Rojas, 2012).

La piel está constituida por tres capas (Fig. 1):

1. *La epidermis*, que es la capa más externa, está formada por un epitelio plano estratificado queratinizado. Las células que la conforman son los queratinocitos, que son las células más abundantes de la piel (Gartner, 2008). La epidermis está formada por cinco capas o estratos (Fig. 2) de acuerdo a la morfología y posición que ocupan los queratinocitos.

La capa basal o germinativa, formada por células columnares, es la encargada de producir células nuevas por medio de mitosis, mismas que son desplazadas continuamente hacia la superficie.

Durante la migración se constituyen los siguientes cuatro estratos: estrato espinoso, formado por 8 a 10 capas de células poligonales encargadas de la síntesis de proteínas, principalmente queratina; a continuación el estrato granuloso, que puede poseer de 2 a 4 capas o estar ausente, es en esta capa

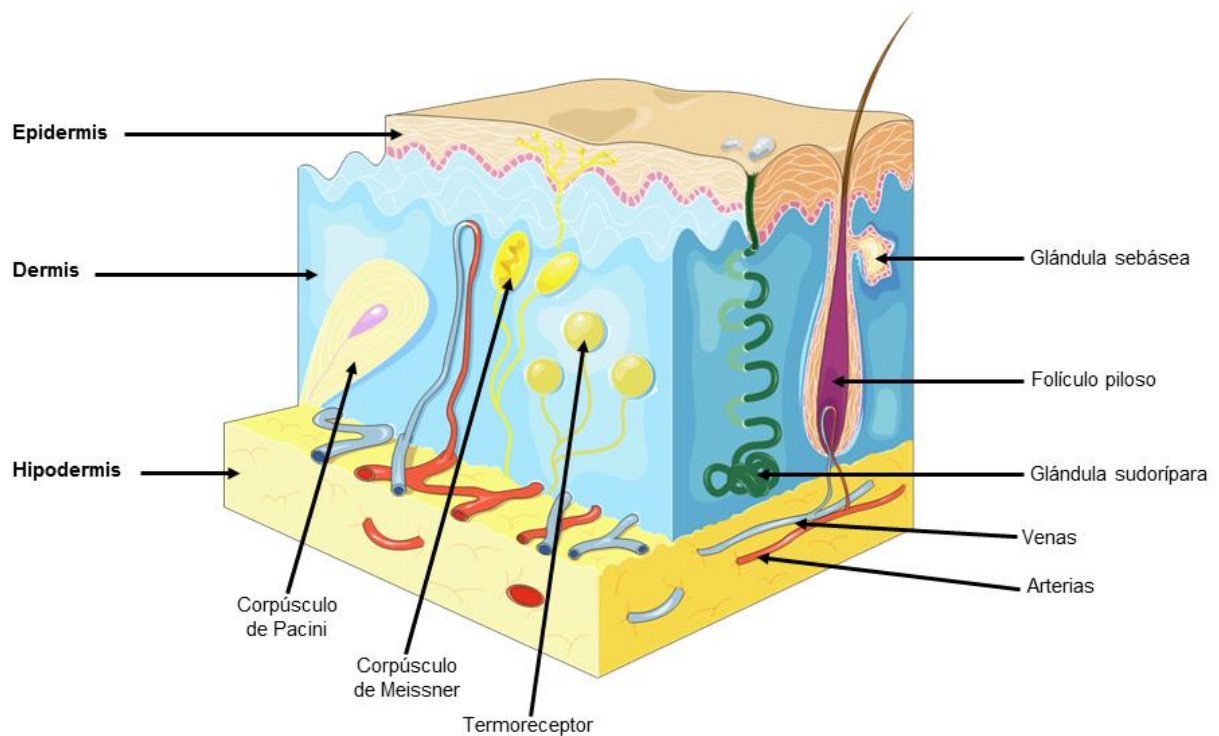


donde se inicia el proceso de queratinización y contiene una gran cantidad de gránulos lipídicos que forman una barrera contra la pérdida de agua (Meruane y Rojas, 2012); le sigue el estrato lúcido, formado por células aplanadas en proceso de muerte, generalmente se encuentra en áreas con piel gruesa como palmas y plantas de los pies (Meruane y Rojas, 2012); hacia la superficie, el estrato más externo es el estrato córneo, formado por células muertas anucleares que forman escamas que son reemplazadas continuamente (Estrada y Uribe, 2002; Navarrete, 2003; Paul *et al.*, 2011).

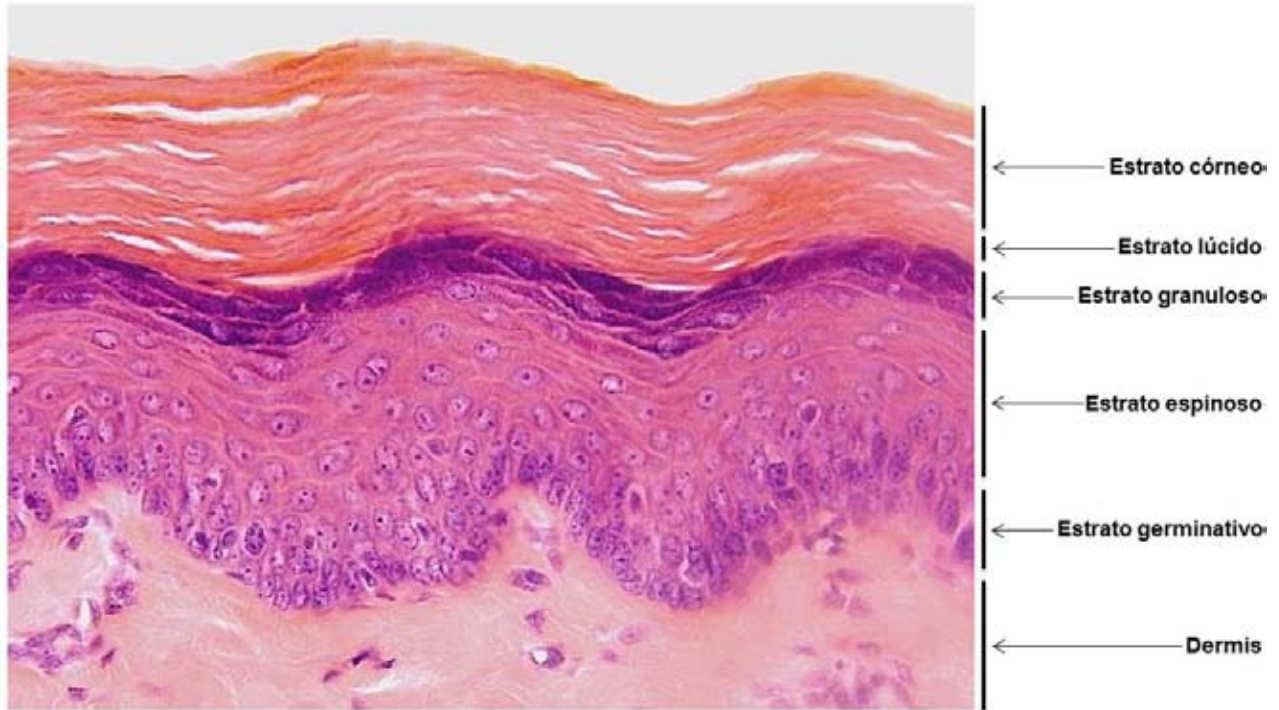
2. *La dermis* está constituida por tejido conjuntivo denso, irregular y colagenoso, las células que la componen principalmente son los fibroblastos. Provee la función de protección mecánica, proporciona integridad estructural, elasticidad y una red vascular para nutrir la piel (Fitzpatrick, 2008; Gartner, 2008).
3. *La hipodermis*, también llamada tejido subcutáneo, es la capa más profunda de la piel, la constituye un tejido conjuntivo laxo con cantidades variables de células grasas (adipocitos) (Gartner, 2008). El espesor de la hipodermis es muy variable dependiendo de la localización, el peso corporal, el sexo o la edad. Su principal función es almacenar energía, sirve como aislante térmico y como protector mecánico frente a golpes (Mescher, 2010).

En la piel también se encuentran las células de Langerhans, que no son tan numerosas, pero son parte del sistema fagocítico mononuclear y son de gran importancia para el sistema inmunológico. Se encuentran también terminales nerviosas conformadas por los corpúsculos de Pacini, que son receptores de presión, las células de Merkel y los corpúsculos de Meissner que son mecano receptores, y también los termo receptores que

son sensores de calor o frío. La piel también contiene folículos pilosos de donde crece el vello o el cabello y glándulas que producen excreciones sudoríparas o sebáceas (Fitzpatrick, 2008; Gartner, 2008; Mescher, 2010).



**Figura 1.** Esquema que muestra la anatomía de la piel y sus principales componentes (tomado y modificado del banco de imágenes científicas: *fciencias.com*, marzo de 2016).



**Figura 2.** Corte histológico de piel, en donde se observan los cuatro estratos de la epidermis (modificado de: Atlas de histología, Sistema tegumentario, 2015).

## 2.2 Heridas en la piel

La piel al estar en frecuente exposición con el entorno, se vuelve susceptible a sufrir heridas que comprometen su integridad alterando el desarrollo normal de sus funciones.

Una herida es una lesión que genera la pérdida de continuidad en la integridad de la piel, pudiendo ser por causas traumáticas o por isquemia (Jiménez, 2008; Guarín-Corredor *et al.*, 2013), mientras que una lesión es cualquier daño que le ocurre al cuerpo. De esta forma, la herida es considerada una deformidad o pérdida de continuidad, que puede afectar desde la epidermis hasta estructuras más profundas como tendones, músculos, vasos, nervios, órganos parenquimatosos e incluso huesos (Salem *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2014; Velnar *et al.*, 2009).

Las heridas son clasificadas en agudas y crónicas:

- *Heridas agudas*: Son de corta evolución y se caracterizan por una curación completa dentro de 6 a 12 semanas, el proceso ocurre casi siempre sin ninguna complicación y el resultado es una herida bien sanada (Lucha *et al.*, 2008; Guarín-Corredor *et al.*, 2013).
- *Heridas crónicas*: Se definen como las heridas en las que no se ha logrado llevar a cabo un proceso de cicatrización ordenado, la mayoría de las heridas que no han cicatrizado en 3 meses son consideradas como crónicas (Jiménez, 2008; Guarín-Corredor *et al.*, 2013). El mecanismo más usual es la desregulación de una de las fases del proceso de cicatrización, esto ocurre con frecuencia en la fase inflamatoria debido a infecciones (Valencia, 2010).

Cuando se produce una herida, se desencadena naturalmente un conjunto de procesos biológicos que utiliza el organismo para recuperar su integridad y arquitectura, el cual es conocido como proceso de cicatrización.

### **2.3 Proceso de cicatrización de heridas**

La cicatrización es un proceso complejo de reparación que, en el caso de las heridas en la piel, conduce a la regeneración del epitelio y al reemplazamiento de la dermis por un tejido fibroso conocido como cicatriz. Este proceso implica una serie de eventos coordinados cuya finalidad es recuperar la integridad del tejido dañado, permitiendo su regeneración y restaurando sus funciones (Kurzer, 1991; Salem *et al.*, 2000; Ramírez, 2010).

El proceso de cicatrización consta de tres fases que actúan simultáneamente y que dependen de la acción de células y proteínas que estimulan el crecimiento, reparación y remodelación del tejido lesionado (Kurzer, 1991; Lucha *et al.*, 2008; Guarín-Corredor *et al.*, 2013).

Existen dos tipos de cicatrización: de *primera intención*, se produce en heridas limpias y ocurre durante las primeras horas después de haber sido cerrada la herida. El segundo tipo, de *segunda intención*, se caracteriza porque no se alcanza a regenerar la arquitectura normal de la piel debido a la pérdida extensiva de tejido por un trauma severo, una quemadura, o en heridas contaminadas e infectadas, en donde el tiempo de cicatrización dependerá de la extensión de la herida (Salem *et al.*, 2000; Valencia, 2010).

Cuando se produce una herida, inmediatamente se desencadena la coagulación sanguínea, la cual tiene una duración de hasta 15 minutos y su objetivo principal es evitar la pérdida de sangre, la entrada de patógenos al organismo y la formación de un coágulo que proteja la zona dañada (Guarín-Corredor *et al.*, 2013). Una vez formado el coágulo se desencadena el proceso de cicatrización que consta de tres fases descritas a continuación:

1. Fase inflamatoria: Comienza a los 15 minutos posteriores a que se produjo la lesión, una vez formado el coágulo, y tiene una duración de uno a seis días. La inflamación involucra una reacción vascular y celular que prepara a la herida para su posterior reparación. En esta fase las bacterias y patógenos son fagocitados y removidos, y numerosos factores son liberados para promover la migración y división de las células implicadas en el proceso tales como EGF, FGF, PDGF y TGF (Kurzer, 1991; Guarín-Corredor *et al.*, 2013).

2. Fase proliferativa: Inicia hacia el tercer día y dura aproximadamente de 15 a 20 días. El objetivo de esta fase es generar una barrera protectora, con el fin de aumentar los procesos regenerativos y evitar el ingreso de agentes nocivos; se caracteriza por la activación de dos grandes procesos: angiogénesis y migración de fibroblastos, los cuales facilitan la formación de una matriz extracelular provisional, compuesta principalmente por colágena tipo I, II y III, que proporciona un andamiaje para la migración celular y la síntesis de una matriz extracelular madura. El tejido adquiere una coloración rojiza debido a la intensa angiogénesis que se está produciendo (Lucha *et al.*, 2008; Guarín-Corredor *et al.*, 2013).
3. Fase de remodelación: Inicia simultáneamente con la síntesis de la matriz extracelular en la fase de proliferación y puede durar hasta uno o dos años, dependiendo la extensión y características de la herida (Guarín-Corredor *et al.*, 2013). Esta fase se caracteriza por la epitelización, en donde los queratinocitos proliferan desde los bordes y migran hacia la herida para cubrirla. Se produce una contracción producida por los miofibroblastos para hacer más pequeña la zona, en el área se reabsorbe el agua y las fibras se juntan, con lo cual se aplanan la región, al mismo tiempo, ocurre la sustitución del colágeno tipo III por el tipo I que es más fuerte, produciendo un aumento de la fuerza tensil de la piel (hasta 70 a 90% de la fuerza original). Hay una disminución celular y los capilares neoformados se atrofian, produciendo la disminución del color cicatrizal (Kurzer, 1991; Lucha *et al.*, 2008).

## 2.4 Tratamiento de heridas

El cuidado inapropiado de una herida puede retrasar su curación haciendo que el área se infecte y resulte en una herida crónica, la infección es una de las complicaciones más frecuentes de heridas que no cicatrizan y pueden poner en riesgo el avance del proceso de curación (Guarín-Corredor *et al.*, 2013).

Existen fármacos comerciales que promueven la cicatrización de las heridas, como el Recoveron (acexamato de sodio) o el Debrisan (dextranómero), sin embargo, estos son caros y poco accesibles, además de que su uso no es común entre la población.

Por el contrario, cuando se tiene una herida es común emplear remedios caseros que aceleren el proceso de cicatrización, mismos que con frecuencia incluyen el uso de plantas medicinales con propiedades desinfectantes, antiinflamatorias, antibacterianas, anestésicas y/o regenerativas de la piel. A lo largo de la historia se han aplicado múltiples plantas y sus derivados para la cicatrización de heridas, entre ellas encontramos *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Aloe vera* o *Aloe barbadensis* (sábila), *Caléndula officinalis* (caléndula), *Uncaria guianensis* (uña de gato), *Hidrocotile asiatica* (centella asiática) y *Mimosa tenuiflora* (tepezcohuite) (González *et al.*, 2004).

De éstas, un caso muy conocido es el uso del Tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.), el cual es ampliamente usado desde la época prehispánica; su nombre tiene raíces de la lengua náhuatl, significa "árbol del cerro que sangra". Este arbusto era utilizado por los mayas desde hace más de 10 siglos como cura para lesiones superficiales en la piel. Hoy en día se sigue utilizando, ya que tiene un reconocido poder de regeneración celular (Gómez y Ávila, 2011). El extracto acuoso de la corteza produce una importante estimulación *in vitro* de la actividad mitocondrial y la proliferación de

fibroblastos dérmicos humanos, esta actividad se debe a la presencia de arabinogalactanos en el extracto (Zippel *et al.* 2009).

Otra planta que etnobotánicamente es reportada para la cicatrización de heridas en la piel es *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl., mejor conocida como encarnadora o hierba del venado (Alcántara, 2006).

### **III. Antecedentes**

#### **3.1 *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl.**

*Phyllonoma* es un pequeño género de árboles que consta de cuatro especies distribuidas desde México hasta Perú (Fig. 3) (Mori y Kallunki, 1977; Pérez-Calix, 2011; Tobe, 2013 y 2015). Pertenece a la Familia Phyllonomaceae y al Orden de las Aquifoliales (Tobe, 2015; APG, 2016).

De acuerdo a una revisión de herbario realizada en marzo de 2016, con ayuda de la M. en C. Rosa María Fonseca Juárez, en México *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. se distribuye en los estados de Chiapas, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Veracruz (Fig. 4); habita en vegetación de bosque mixto de Pino-Encino con elementos de bosque mesófilo de montaña (Pérez-Calix, 2011), en una elevación de 1000-2600 msnm.





**Figura 3.** Distribución del género *Phyllonoma* a nivel mundial, se observa en color verde los países en los que se distribuye la planta, la intensidad del color representa la abundancia en cada país, siendo Costa Rica y México los países en los que se encuentra más distribuido (tomado de Tropicos.org, 2016).



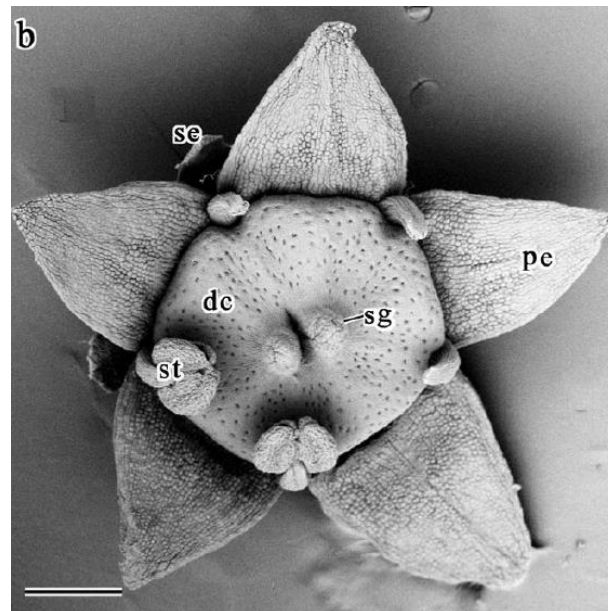
**Figura 4.** Distribución de *P. laticuspis* (Turcz.) Engl. en México, se observa a modo de puntos azules la presencia de la planta en los estados de Chiapas, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Veracruz (elaborado a partir de los datos obtenidos en la revisión de herbario).

*Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. es un árbol que alcanza 8-10 m de alto. Los tallos poseen ramas delgadas y flexibles. Las hojas son alternas, miden 1.6-10.3 cm de largo y 0.5-2.3 cm de ancho, lanceoladas con margen acerrado, con peciolo de 2-13 mm de largo. Las inflorescencias son racemosas y le proporcionan su característica más distintiva, ya que crecen cerca del ápice de la hoja (Fig. 5) (Tobe, 2013). Las Flores son blanquecinas con tintes purpúreos, crecen sobre una bráctea pequeña, miden 2.5-5 mm, poseen cinco sépalos triangulares, libres entre sí; tienen cinco pétalos ovado-

triangulares; cinco estambres con filamentos de 0.5 mm de largo; ovario ínfero, con dos lóculos fusionados y dos estilos libres (Fig. 6). El Fruto es una baya globosa a subglobosa, coronado en el ápice por restos del cáliz; posee de 2 a 9 semillas por fruto. Florecen y fructifican durante todo el año (Mori y Kallunki, 1977; Pérez-Calix, 2011; Tobe, 2013).



**Figura 5.** Esquema de una inflorescencia de *P. laticuspis* (Turcz.) Engl. en donde se observa que las flores crecen cerca del ápice de la hoja, característica distintiva del género. (Dibujo elaborado por: Lían Mishel Sánchez Cazares, 2016)



**Figura 6.** Flor de *P. laticuspis* (Turcz.) Engl. observada bajo microscopio electrónico de barrido (la escala corresponde a 200 μm), en donde se observan los sépalos *se*, pétalos *pe*, estambres *st*, disco nectarario *dc* y estigmas *sg* (Tobe, 2013).



**Figura 7.** Fruto blanquecino con restos del cáliz en el ápice, creciendo sobre la vena media, cerca del ápice de la hoja (foto tomada en la colecta de marzo de 2015, Lían Mishel Sánchez Cazares).

*Phyllonoma laticuspis* (Turcz). Engl. (Fig. 7) es conocida popularmente con los nombres de “mil hojas” y “hoja de músico”, nombres basados en la forma y abundancia de sus hojas, pero también se conoce como “la medicina del venado”, “hierva de la viruela”, “sana todo”, y “encarnadora”, estos nombres dados debido a sus propiedades para curar heridas-lesiones en la piel. El uso de esta planta data de hace más de 40 años en la localidad de Carrizal de Bravo, Guerrero. Mismo que se localiza a 2350 msnm, en la carretera filo de caballos, en el municipio de Atoyac de Álvarez (Vega, 2002; Alcántara, 2006 y Alcántara *et al.*, 2017).

De acuerdo al trabajo etnobotánico realizado por Vega (2002) y por el M. en C. Armando Gómez Campos, se sabe que el uso de la planta comenzó a partir de que los pobladores de Carrizal de Bravo, Guerrero, observaban que los animales heridos,

principalmente los venados, ingerían y se echaban sobre las hojas que desprendía este árbol, observando que estos animales se recuperaban en un corto periodo de tiempo. Lo anterior dio inicio al uso de esta planta bajo el nombre de “la medicina del venado”, empleándose para sanar heridas de la piel.

En el mismo estudio etnobotánico se relata que “el modo de empleo de la planta es a través de infusión, hirviendo y dejando reposar hasta el día siguiente ya que el agua ha adquirido un color café caramelo, esta infusión es ingerida o empleada para lavar las heridas en el caso de lesiones graves y operaciones; en aproximadamente tres días el paciente está completamente recuperado”.

### **3.2 Estudios químicos previos de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl.**

En el 2002, Vega realizó estudios químicos y biológicos de extractos de la lámina foliar de *P. laticuspis* y demostró que esta especie presenta propiedades antibacterianas.

En dicho estudio se realizó la caracterización fitoquímica preliminar de los metabolitos secundarios presentes en extractos de hexano, AcOEt, MeOH y acuoso, por medio de Cromatografías en Capa Fina (CCF), las cuales fueron reveladas con indicadores específicos para cada tipo de compuesto, de esta forma se evidenció la presencia de esteroides, glucósidos, fenoles, terpenos y sapogeninas (Tabla 1).

En el mismo estudio se evaluó la actividad antibacteriana contra cepas de *Bacillus subtilis* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa), por medio del método de halo de inhibición, en donde se observó que los extractos de AcOEt y MeOH presentaron actividad frente a *B. subtilis*. Mientras que el extracto acuoso a altas concentraciones resulto activo frente a ambas bacterias.

**Tabla 1.** Estudio fitoquímico preliminar de los extractos de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl, en donde la presencia de los metabolitos es indicada por ✓ y la ausencia por X.

Extracto/Metabolito	Esteroides y triterpenos	Alcaloides y compuestos nitrogenados	Azúcares, esteroides, terpenos y fenoles	Flavonoides	Sapogeninas y esteroides	Fenoles
Hexánico	✓	X	✓	X	✓	✓
Acetato de Etilo	✓	X	✓	X	✓	✓
Metanólico	✓	X	✓	X	X	✓
Acuoso	✓	X	✓	X	X	X

En un segundo estudio realizado en 2014 por Patrón y colaboradores, se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos EtOH de *P. laticuspis* y también se realizó la caracterización fitoquímica general de los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad por medio de CCF reveladas con indicadores específicos. En este estudio se observó la presencia de esteroides, flavonoides, taninos, quinonas, alcaloides y cumarinas.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, también se determinó mediante halos de inhibición sobre cultivos de *E. coli*, *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus aureus*, en donde se observó que los extractos EtOH presentan actividad bacteriostática frente a las tres cepas estudiadas.

#### **IV. Hipótesis**

Con base en los antecedentes etnobotánicos de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz). Engl., que reportan su uso tradicional en la cicatrización de heridas en la piel, se espera que los extractos orgánicos y/o acuoso de dicha planta presenten un potencial efecto cicatrizante en estudios *in vitro* realizados con cultivos celulares de fibroblastos.

#### **V. Objetivo general**

Evaluar el potencial efecto cicatrizante de los extractos orgánicos y acuoso de las partes aéreas de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz). Engl. por medio del ensayo *in vitro* de cierre de herida.

##### **5.1 Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de los extractos orgánicos y acuoso de *P. laticuspis* en cultivos de fibroblastos.
- Estandarizar el ensayo *in vitro* de cierre de herida.
- Evaluar el potencial cicatrizante *in vitro* de los extractos orgánicos y acuoso de *P. laticuspis* por medio del ensayo de cierre de herida en cultivos de fibroblastos.
- Estudiar el efecto de la migración en el cierre de las heridas *in vitro* por medio del uso de mitomicina-C.
- Determinar el extracto de mayor actividad cicatrizante.

## VI. Material y métodos

### 6.1 Colecta y preparación del material vegetal

El material vegetal de *Phyllanoma laticuspis* (Turcz). Engl. fue colectado en la localidad de la Cruz del Rosario en Taxco de Alarcón, Guerrero, en marzo de 2015. La zona de colecta fue al pie del cerro el Huizteco, a 18°35'475" latitud Norte y 99°37'855" longitud Oeste; a una altura de 2075 msnm, en donde existe una vegetación de Bosque de Pino-Encino.

El material vegetal colectado se lavó para eliminar restos de tierra, posteriormente se dejó secar a la sombra sobre papel periódico.

La clasificación taxonómica del ejemplar se realizó con la ayuda del M. en C. Armando Gómez Campos, en el laboratorio de etnobotánica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, y un ejemplar fue depositado (Fig. 8) en el Herbario de la Facultad de Ciencias, número de baucher 160645.



**Figura 8.** Ejemplar de *Phyllanoma laticuspis* (Turcz) Eng. Depositado en la colección del herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.



## **6.2 Obtención de extractos**

Una vez seca la planta, se siguieron dos procedimientos distintos con el material vegetal para la obtención de los extractos. El primer procedimiento se realizó para la obtención de los extractos orgánicos, en donde el material se separó en tallos y hojas, debido a que se quería observar si existían diferencias en cuanto al contenido de metabolitos en ambas estructuras. Una vez separado, el material vegetal fue pesado en balanza y triturado en un molino para disminuir su volumen y aumentar la superficie de contacto al macerar (Macías *et al.*, 2009).

El segundo procedimiento se realizó para la obtención del extracto acuoso siguiendo el método tradicional de la comunidad reportado etnobotánicamente, por ello se mantuvieron juntos hojas y tallos al preparar la infusión (Vega, 2002; Alcántara, 2006).

### **6.2.1 Extractos orgánicos**

Los extractos se obtuvieron a partir de 186 g de tallos y 330 g de hojas que se colocaron en frascos de vidrio de 1L, se agregó disolvente hasta cubrir el material vegetal y se taparon los frascos con papel aluminio. Se emplearon disolventes de polaridad ascendente: hexano, AcOEt y MeOH, de manera consecutiva, tres veces con cada disolvente, dejando macerar el material por tres días en cada ocasión, se separó el material vegetal del disolvente por medio de filtración por gravedad usando un embudo de vidrio y filtros de papel. El material vegetal se regresó a los frascos de vidrio y se les agregó nuevamente disolvente para dejar macerar otros tres días.

Por otra parte, el filtrado se colectó en un matraz bola y se eliminó el disolvente con vacío en un rotavapor (Fig. 9). Los extractos se colectaron en frascos de vidrio etiquetados y

los restos de disolvente se eliminaron en una campana de humos. Posteriormente los extractos se pesaron y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Se calculó el porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos empleando la ecuación 1.



**Figura 9.** Evaporación al vacío de los disolventes en rotavapor.

$$\frac{100 * \textit{gramos de extracto obtenido}}{\textit{gramos de material vegetal usado}} = \% \textit{ de rendimiento} \quad \textbf{(Ecuación 1)}$$

### 6.2.2 Extracto acuoso

La obtención del extracto acuoso se realizó emulando el método tradicional de uso de la planta en la comunidad. A 1 L de agua destilada hirviendo se le adicionaron 29.38 g de material vegetal seco (hojas y tallos juntos), se dejaron reposar por 10 minutos y después se separó el material por medio de filtración por gravedad usando un embudo de vidrio y filtros de papel.

La infusión obtenida se colectó en cuatro matraces bola de 500 mL, con 250 mL de la infusión cada uno, se congeló y se eliminó el agua en una liofilizadora (Fig. 10).



**Figura 10.** Proceso de obtención del extracto acuoso: **1)** Infusión de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz); **2)** Filtrado; **3)** Congelado de la; **4)** Eliminación del agua en liofilizadora; **5)** Extracto acuoso seco.

El extracto obtenido se colectó en un frasco de vidrio, se etiquetó, se pesó, y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso. Posteriormente se calculó el porcentaje de rendimiento obtenido del extracto usando la ecuación 1.

### **6.3 Análisis del perfil Cromatográfico en Capa Fina de los extractos**

Para conocer el perfil cromatográfico de los extractos de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. obtenidos, se realizó un análisis por Cromatografía de Capa Fina (CCF) en fase normal.

La CCF fase normal, se realizó utilizando cromatoplasmas de Sílica Gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> MACHEREY-NAGEL) como fase estacionaria, y usando como fase móvil mezclas de disolventes a distintas polaridades. Se aplicaron en las cromatoplasmas 2 µl de una solución de cada uno de los extractos por separado, a una concentración de 50 mg/mL.

Las cromatoplasmas se observaron bajo luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (366 nm) y posteriormente fueron roseadas con sulfato cérico (Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) y revelados sobre una placa de calentamiento.

### **6.4 Ensayos biológicos**

#### **6.4.1 Cultivo celular de fibroblastos**

Los fibroblastos usados en los ensayos biológicos fueron obtenidos en el proyecto INR-11/12, en el año 2012 a partir de remanentes de piel de prepucio de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría, bajo consentimiento informado de los padres, y se mantuvieron en criopreservación en una solución de Suero Fetal Bovino 1X (SFB) (Gibco) al 90% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%.

Se usaron fibroblastos en cultivo primario, para los experimentos de citotoxicidad y del potencial cicatrizante *in vitro* de los extractos obtenidos.

Las células se cultivaron a una densidad de 10,000 células/cm<sup>2</sup>, en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con medio DMEM/F-12 (Gibco) complementado con SFB al 10% y 1% de

antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina, Anti/Anti) (Gibco). Las cajas de cultivo se mantuvieron en una incubadora celular (Thermo Scientific) a 37°C, 0.5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día hasta obtener una confluencia celular del 90% (Ávila, 2015; Unger *et al.*, 2008).

Al alcanzar la confluencia las células se expandieron nuevamente en cajas de cultivo por medio de pases y posteriormente resembradas en placas de 24 pozos para los ensayos de citotoxicidad y de 12 pozos para el ensayo de la herida.

Todos los ensayos biológicos se realizaron en campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

#### **6.4.2 Pase de fibroblastos y cuantificación celular**

Se retiró el medio de cultivo de las cajas y se realizaron dos lavados con 2 mL de Buffer Salino de Fosfatos 1X (PBS) (Gibco) cada uno.

Posteriormente se retiró el PBS y las células fueron tratadas con 1 mL de Tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco) durante 6 minutos en incubación a 37°C. Pasado el tiempo se inactivó la tripsina agregando 1 mL de medio DMEM/F-12 más SFB al 10%.

Se obtuvo una suspensión celular que fue colectada en un tubo para centrifuga de 15 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón celular obtenido se resuspendió en 1 mL de medio DMEM/F-12 nuevo, las células obtenidas fueron contadas en cámara de Neubauer. Para los ensayos biológicos *in vitro* se mantuvo constante la densidad celular sembrada (células/cm<sup>2</sup>), por ello fue necesario contar el número de células sembradas en cada experimento.

Para ello, se tomaron con micropipeta 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular centrifugada y 10  $\mu\text{L}$  de colorante azul tripano, se mezclaron homogéneamente y se llenaron las dos gradillas de la cámara de Neubauer. Se observó la cámara en un microscopio vertical invertido (Axio Lab, Carl Zeiss) y se realizó el conteo de células por cuadrante de ambas gradillas (Ávila, 2015).

El azul tripano agregado durante el conteo celular permitió distinguir las células vivas de las muertas ya que las células muertas se tiñeron de azul por la permeabilidad de sus membranas. De este modo, en el conteo celular únicamente fueron contadas las células viables, es decir, las que no se tiñeron de azul (Ávila, 2015). El número total de células en suspensión se obtuvo mediante la ecuación 2.

$$X * 2 * 10,000 * 1 = \textit{Total de células en suspensión} \quad \textbf{(Ecuación 2)}$$

En donde:

**X:** Número total de células observadas por cuadrante de la cámara de Neubauer

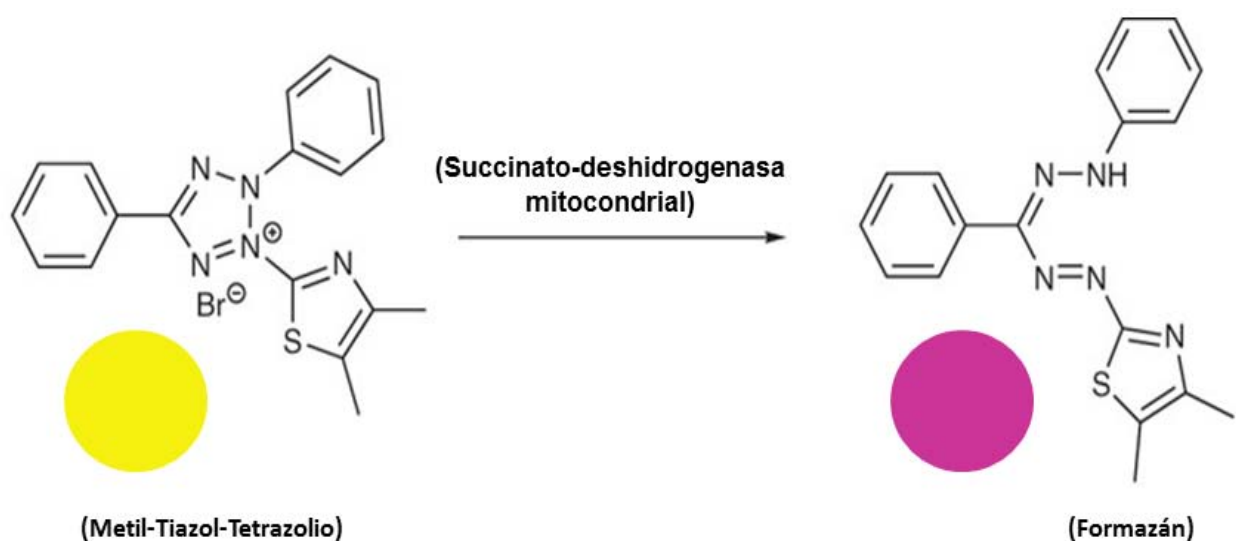
**2:** Factor incluido por la disolución 1:1 con azul tripano.

**10,000:** Constante de la cámara de Neubauer.

**1:** Volumen de medio en el que se resuspendió el botón celular.

### 6.4.3 Ensayo de MTT

El ensayo de MTT o método de reducción de la sal de Metil-Tiazol-Tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio), es una medida del metabolismo celular basada en la reducción del compuesto por acción de las enzimas succinato-deshidrogenasas mitocondriales, con la consecuente formación de cristales de formazán de color azul-violeta (Fig. 11). Al solubilizar dichos cristales y medir su absorbancia reflejan una lectura proporcional al número de células metabólicamente activas en los cultivos (Cordero y Aristizábal, 2002).



**Figura 11.** Transformación metabólica de la sal Metil-Tiazol-Tetrazolio (MTT), que por acción de la enzima mitocondrial Succinato-deshidrogenasa es reducida a sales de formazán insolubles en medio acuosos, de color azul-violeta (Cordero y Aristizábal, 2002).

Para la aplicación de este método se siguió el procedimiento establecido por Mosmann (1983) y modificado por Cordero y Aristizábal (2002). Los cristales obtenidos después de cuatro horas de incubación de las células tratadas con MTT fueron solubilizados en una

solución 1:1 de DMSO-isopropanol y se midió la absorbancia de la disolución de los cristales a 560 nm.

Con este método fue posible estudiar la proliferación celular en los cultivos y la posible citotoxicidad producida por los extractos, al realizar una curva de calibración para establecer la correlación existente entre la absorbancia obtenida y el número de células metabólicamente activas a diferentes días de cultivo (León *et al.*, 2006).

#### **6.4.4 Curva de proliferación de fibroblastos**

Se realizó una curva de proliferación que permitió observar y caracterizar el comportamiento de los fibroblastos en cultivo, además de conocer su tiempo de replicación celular en condiciones de laboratorio.

Para ello, al alcanzar una confluencia de 90%, las células se tripsinizaron siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad y se sembraron en cajas de cultivo de 24 pozos, a una densidad de 5,000 células/pozo, manteniéndolas en incubadora a 37°C con medio de cultivo DMEM/F12 + SFB 10% + Anti/Anti 1%.

Posteriormente, durante una semana, se realizó diariamente una prueba de MTT por triplicado para observar la proliferación celular a diferentes días de cultivo.

#### **6.4.5 Curva de calibración de MTT**

La curva de calibración de MTT se realizó para conocer la relación existente entre el número de fibroblastos en cultivo y la cantidad de formazán producido, lo cual sirvió de base para la curva de proliferación y para los ensayos de citotoxicidad y del potencial efecto cicatrizante que se realizaron.



Para ello se sembró por triplicado en cajas de cultivo de 24 pozos, un número creciente de células por pozo: 0, 5,000, 10,000, 20,000, 40,000, 60,000 y 80,000, en un volumen constante de 150  $\mu$ L de medio de cultivo. Al cabo de 24 horas de incubación a 37°C se determinó la absorbancia empleando el ensayo de MTT.

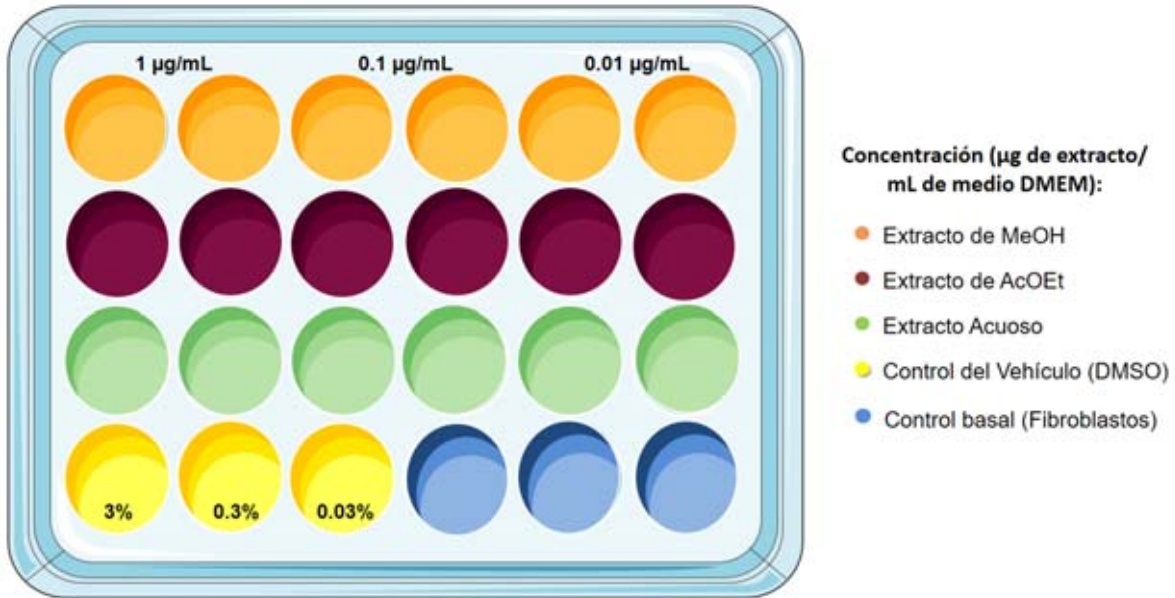
#### **6.4.6 Ensayo de citotoxicidad de los extractos por medio de MTT**

Para este ensayo fue sembrada una placa de 24 pozos a una densidad de 10,500 células/cm<sup>2</sup>, se mantuvieron con medio DMEM/F12 + SFB 10% + Anti/Anti 1% en incubación a 37°C por una semana, hasta alcanzar 90% de confluencia.

Al alcanzar la confluencia requerida, las células se trataron por 24 horas con los extractos, dejando pozos con células sin tratar como controles de la actividad normal de los fibroblastos, y células tratadas con DMSO como control del vehículo en el que se aplicaron los extractos.

Los extractos se evaluaron por duplicado en cuatro experimentos independientes pero simultáneos con el mismo lote de fibroblastos, se evaluaron las concentraciones de 1, 0.1 y 0.01  $\mu$ g/mL, usando como vehículo DMSO al 3, 0.3 y 0.03 % respectivamente para solubilizar los extractos orgánicos (Fig.12).

Después del tratamiento se determinó la cantidad o proporción de células metabólicamente activas (viables) por medio del ensayo de MTT. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de supervivencia celular de los fibroblastos tomando como base las células sin tratamiento (control) y con respecto a la curva de calibración de MTT.



**Figura 12.** Esquema de tratamientos aplicados a las células en cultivo para evaluar el posible efecto citotóxico de los extractos de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz). Engl.

#### 6.4.7 Estandarización del ensayo de cierre de la herida *in vitro*

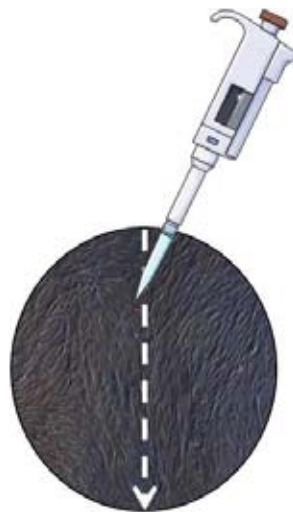
El ensayo de cierre de herida *in vitro* tiene como objetivo el estudio de la migración celular y puede ser usado para evaluar el potencial efecto cicatrizante de extractos y compuestos. Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a las que previamente se le ha realizado una brecha o “herida”.

Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la “herida”. El ensayo implica la creación de una “herida” o área libre de células en la monocapa celular, la captura de imágenes de manera periódica durante la duración del experimento y la comparación de todas las imágenes para observar la migración/proliferación de las células hacia el lecho de la herida (Ghayempour *et al.* 2016 y Göback *et al.*, 2009).

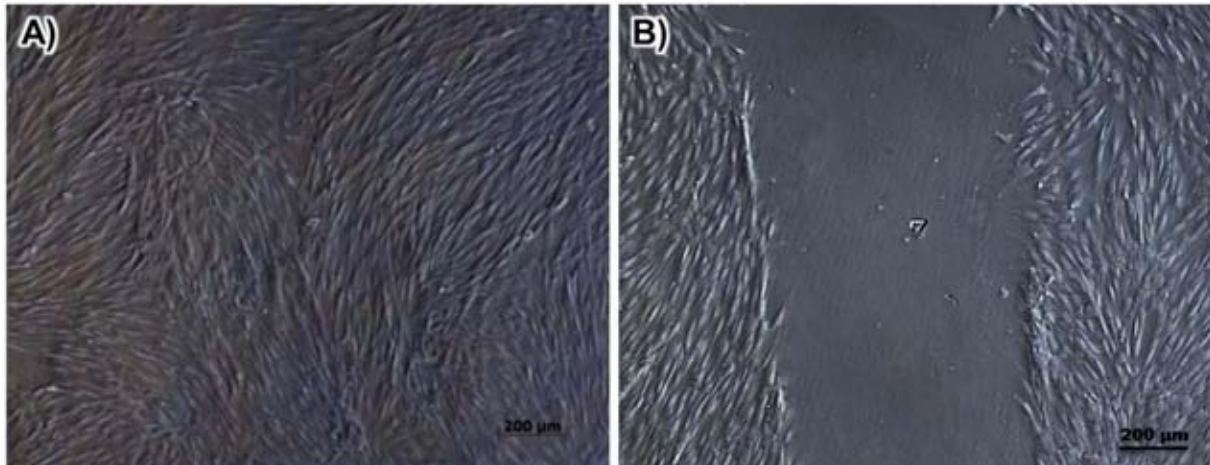
Para este modelo se sembraron fibroblastos en una placa de cultivo de 12 pozos a una densidad de 7,895 células/cm<sup>2</sup>, se incubaron a 37°C con medio DMEM/F12 + SFB 10% + Anti/Anti 1% por una semana, hasta alcanzar aproximadamente el 90% de confluencia celular, es decir, hasta obtener una monocapa celular.

Al obtener la confluencia requerida, se retiró el medio de cultivo de los pozos y se realizó un raspado de forma vertical con la punta de una micropipeta de 1,000 µL a una inclinación de 30° sobre el fondo del pozo (Fig. 13), para obtener una “herida” que nos permita observar la migración/proliferación celular (Fig. 14).

Una vez obtenidas las heridas, se lavaron los pozos con PBS para eliminar los restos celulares y las células desprendidas de la monocapa, las heridas se mantuvieron con PBS y se tomaron fotos en un microscopio vertical invertido (AxioLab, Carl Zeiss), estas fotos fueron consideradas como tiempo 0.



**Figura 13.** Raspado vertical con punta de micropipeta de 1,000 µL sobre monocapa celular para obtener las “heridas”.



**Figura 14. A)** Monocapa celular de fibroblastos en cultivo, **B)** “Herida” obtenida por raspado vertical con punta de micropipeta.

El campo en donde se tomó cada fotografía fue marcado para que las siguientes fotografías se tomaran en la misma zona y de esta forma poder observar la migración/proliferación de las células hacia el lecho de la herida.

Después de obtener las fotografías, el PBS se retiró y a cada pozo se le adicionó medio de cultivo y un extracto de prueba disuelto en DMSO, con excepción del extracto acuoso que se disolvió solo con medio de cultivo, cada extracto de prueba por triplicado.

Con base en los resultados de los experimentos de citotoxicidad, se evaluó el extracto acuoso a las concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 µg/mL; en cambio los extractos de AcOEt y MeOH se evaluaron a las concentraciones de 0.1 y 0.01 µg/mL. Cada placa tenía tres pozos sin tratamiento como controles de la migración/proliferación normal de los fibroblastos y tres pozos con DMSO como control del vehículo a una concentración final máxima del 3%.

Las células se mantuvieron en incubación a 37°C con los extractos y se tomaron fotos a las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos, tomando siempre como referencia el punto marcado en el tiempo 0.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas por medio del programa Tscratch (Göbbeck *et al.*, 2009), el cual permite medir el área sin células de cada imagen. Posteriormente se comparó el porcentaje de área cerrada con cada tratamiento y los controles, a los dos tiempos de lectura, para determinar si hubo diferencia entre ellos utilizando el programa Graph Pad Prism5.

#### **6.4.8 Ensayo de cierre de herida con fibroblastos tratados con mitomicina-C**

La mitomicina-C (C<sub>15</sub> H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) es un antibiótico-antitumoral aislado del hongo *Streptomyces caespitosus*. Posee actividad antimitótica que inhibe la migración de fibroblastos al inhibir la síntesis de ADN, ARN y proteínas, reduciendo así la producción de colágeno por los fibroblastos e impidiendo la duplicación celular (Hernández-Galilea *et al.*, 2000; Casanueva-Cabeza *et al.*, 2009).

En este ensayo se evaluó el efecto de los extractos orgánico, AcOEt y MeOH acuoso sobre la migración de los fibroblastos después de ser tratados con mitomicina-C, esto para observar el efecto que provoca la inhibición de la mitosis en el cierre de heridas *in vitro*.

Para ello, se sembraron fibroblastos en una placa de cultivo de 12 pozos a una densidad de 7,895 células/cm<sup>2</sup>, se incubaron a 37°C con medio DMEM/F12 + SFB 10% + Anti/Anti 1% por una semana hasta alcanzar el 90% de confluencia celular. Una vez

alcanzada esta confluencia se retiró el medio de cultivo y se agregaron 456  $\mu\text{L}$  de mitomicina-C a concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en cada pozo, y se incubaron las células por 4 horas a 37°C.

Pasado el tiempo, se retiró la mitomicina-C, se realizaron 3 lavados con PBS y se realizaron heridas siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los tratamientos evaluados también fueron los mismos que en el punto anterior.

#### **6.4.9 Ensayo de citotoxicidad en células Vero**

Este ensayo se realizó bajo la dirección de la Dra. Mayra Silva Miranda, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Fue utilizada la línea celular Vero de riñón de mono verde africano. El ensayo se realizó con 10,000 células por pozo, en una placa de 96 pozos. El compuesto se adicionó disuelto en DMSO, cada concentración se evaluó por triplicado, la placa fue incubada por 48 horas. El revelado se hizo con 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5  $\text{mg}/\text{mL}$ ), posteriormente los cristales de formazán obtenidos se disolvieron con DMSO y se leyó la absorbancia a 570 nm.

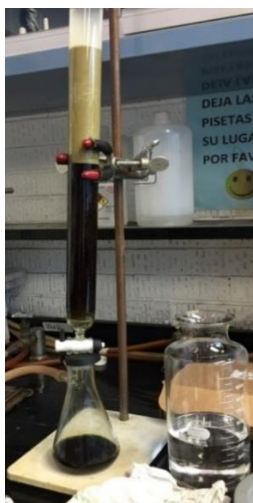
#### **6.5 Fraccionamiento del extracto con mayor actividad por medio de Cromatografía en Columna**

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos biológicos, se realizó una Cromatografía en Columna (CC) con el extracto metanólico que fue el de mayor actividad (Fig. 15). Se obtuvieron dos fracciones de polaridad diferente y se evaluó nuevamente la actividad biológica para determinar así si los metabolitos secundarios responsables de la actividad se agruparon en alguna de esas fracciones.

Para realizar la cromatografía, 24.97 g del extracto metanólico se resuspendieron en metanol y se agregó 250 g de celita, posteriormente se dejó secar la mezcla y fue colocada en una columna cromatográfica previamente empacada con sílica gel como fase estacionaria, y empleando como fase móvil una mezcla 70% acetato de etilo + 30% hexano (AcOEt+H), posteriormente se continuó la elusión con metanol (100%), obteniéndose así las dos fracciones con diferente polaridad.

Las fracciones fueron concentradas al vacío en un rotavapor y depositadas en frascos para terminar de evaporar el disolvente a temperatura ambiente en una campana de extracción de humos. Cada fracción fue analizada por CCF fase normal, en cromatoplasmas de sílica gel y usando como fase móvil mezclas de disolventes a distintas polaridades para observar el perfil cromatográfico de los extractos y compararlo con el extracto metanólico del que se obtuvieron las fracciones.

Las placas fueron observadas bajo luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (366 nm), y posteriormente fueron roseadas con sulfato cérico y reveladas por calentamiento.



**Figura 15.** Cromatografía en Columna para el fraccionamiento del extracto metanólico.

## **6.6 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados con el Software Prisma (Graph Pad Prism5 Software Inc., USA). Los resultados obtenidos fueron expresados como la media  $\pm$  EEM (error estándar medio) de cuatro experimentos independientes (n=4) para la evaluación de la citotoxicidad de los extractos y tres experimentos (n=3) para los ensayos de cierre de herida. El valor  $p$  fue analizado por ANOVA y posteriormente por la prueba Tukey para medir la significancia estadística ( $p < 0.05$ ).



## VII. Resultados

### 7.1 Rendimiento de los extractos

Los rendimientos obtenidos de los extractos orgánicos: Hexano, AcOEt y MeOH, y del extracto Acuoso de *Phyllonoma laticuspis* se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Rendimiento obtenido del material vegetal de *P. laticuspis*.

Extracto	Peso (g) obtenido de tallos	Peso (g) obtenido de hojas	Rendimiento de tallos (%)	Rendimiento de hojas (%)
Hexano	3.21	5.79	1.73	1.75
AcOEt	9.93	30.03	5.79	9.1
MeOH	11.12	29.48	5.98	8.91
Acuoso	3.6		12.25	

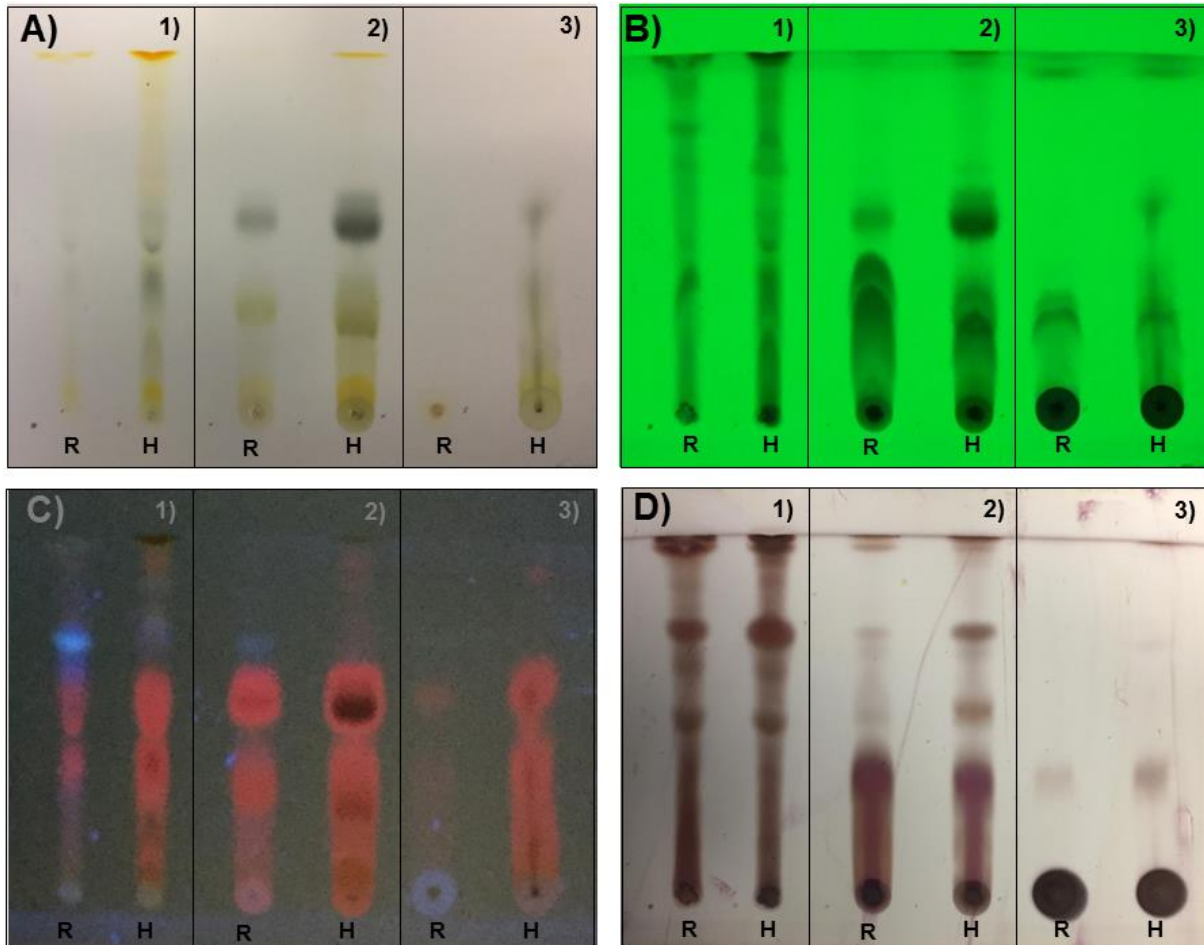
### 7.2 Perfil cromatográfico de los extractos

La composición química de los extractos obtenidos se observó por medio de una Cromatografía de Capa Fina (Fig. 16).

En las cromatoplas se observa que la composición química no varía entre hojas y tallos, aunque se observa una mayor concentración de los de metabolitos en los extractos obtenidos a partir de hojas.

En las cromatoplácas, cada franja horizontal indica la presencia de un metabolito diferente. Bajo luz UV a 254 nm se observan compuestos que no son visibles a simple vista en la cromatografía, mientras que bajo luz UV a 366 nm es posible observar franjas de color rojo que indican la presencia de clorofilas, es por ello que en las bandas “H” hay

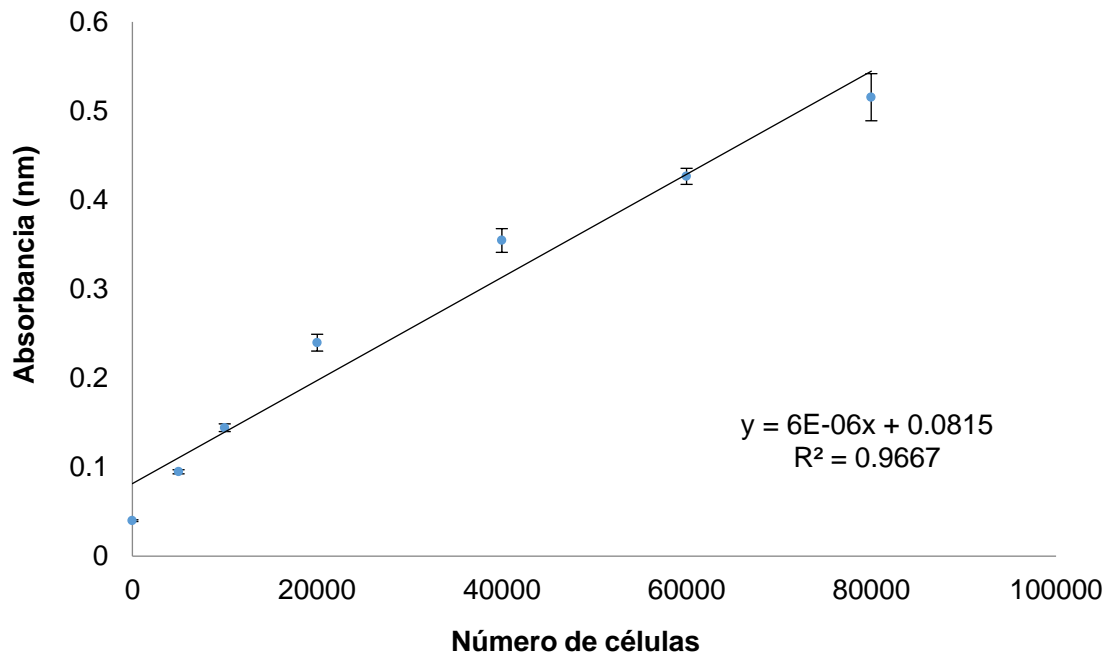
una mayor presencia del color rojo, puesto que son los extractos obtenidos a partir de hojas.



**Figura 16.** Perfil cromatográfico de los extractos obtenidos de *P. laticuspis*. en donde: A) Cromatoplaaca fase normal a base de Sílica gel, eluída con 80% hexano + 20% AcOEt, B) Cromatoplaaca observada bajo luz UV 254 nm, C) Cromatoplaaca observada bajo luz UV 366 nm, D) Cromatoplaaca revelada con sulfato cérico en placa de calentamiento. En las cuatro imágenes: 1) Extracto hexánico, 2) Extracto de AcOEt y 3) extracto de MeOH. R) extractos obtenidos a partir de tallos y H) extractos obtenidos a partir de hojas.

### 7.3 Curva de calibración de MTT

La curva de calibración de MTT (Fig. 17) muestra que existe una relación proporcional entre el número de fibroblastos en cultivo y la cantidad de cristales de formazán producidos, a través de la absorbancia a 560 nm una vez que han sido disueltos los cristales obtenidos.



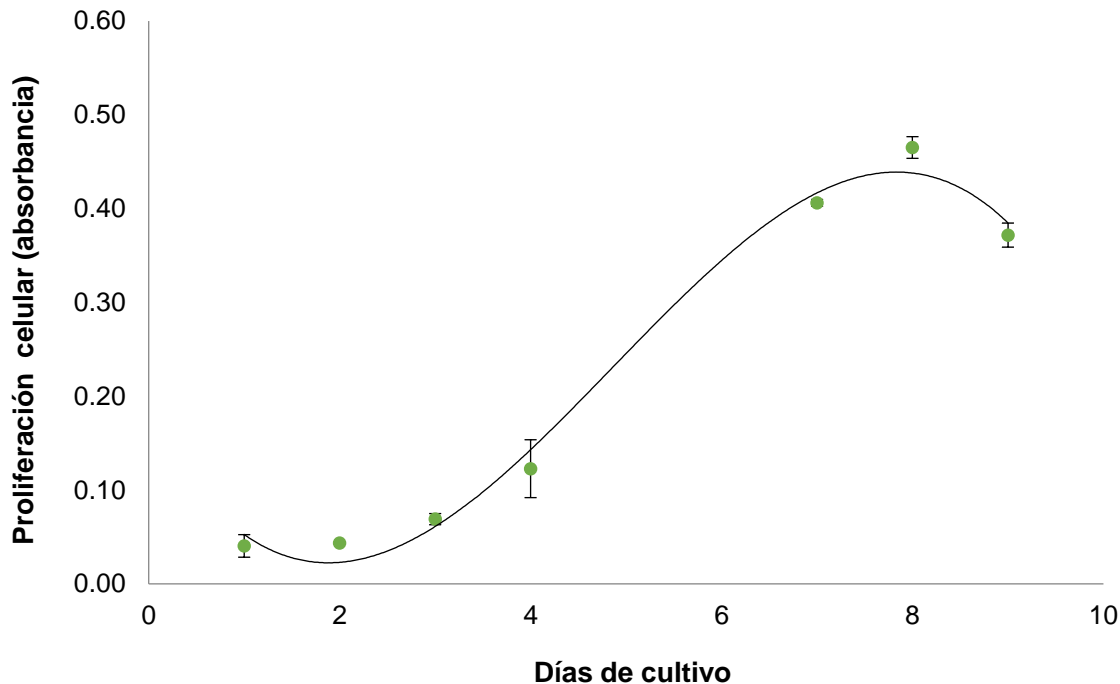
**Figura 17.** Curva de calibración de ensayo de MTT. Muestra la relación lineal entre la absorbancia (560 nm)  $\pm$  EEM de cristales de formazán producidos y el número de fibroblastos en cultivo.

Se observa que la curva presenta una relación lineal entre el aumento en la cantidad de células en cultivo y el incremento en la cantidad de cristales de formazán formados por las células, lo cual concuerda con Cordero y Aristizábal (2002) pues la absorbancia es proporcional al número de células metabólicamente activas en los cultivos.

La curva se ajusta al modelo lineal  $Y = 6 \times 10^{-6} * X + 0.0815$  con una correlación  $R^2$  de 0.96, en donde  $6 \times 10^{-6}$  es el cambio medio que se produce en la absorbancia por cada unidad de cambio que hay en el número de células en cultivo. Mientras que 0.0815 es la absorbancia que corresponde a 0 células en cultivo (el blanco). A partir de esta ecuación, al conocer la absorbancia (Y) y despejando X es posible conocer el número de células metabólicamente activas que existen en los cultivos.

#### 7.4 Curva de proliferación de fibroblastos

Caracterización del comportamiento normal de los fibroblastos en cultivo, se observa la curva de proliferación celular (Fig. 18) obtenida mediante el método de MTT a diferentes días de cultivo celular.



**Figura 18.** Curva de proliferación de fibroblastos humanos en cultivo, medida en absorbancia (560 nm)  $\pm$  EEM de los cristales en solución, producidos a diferentes días de cultivo.

En la gráfica se observa que a la semana de cultivo (8 días) se alcanza una confluencia celular del 100% en los pozos de cultivo, lo cual se ve reflejado en el pico más alto de la curva, posteriormente la curva decrece conforme siguen avanzan los días de cultivo.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos e interpolándolos en la curva de calibración de MTT, obtenemos el número aproximado de células en los cultivos a los diferentes días de cultivo (Tabla 3). En donde observamos que partiendo de 5,000 células/pozo sembradas el día uno, la población comienza su crecimiento al segundo día y se va duplicando cada dos días aproximadamente, siendo a la semana de cultivo (8 días) cuando se alcanza la población máxima de 65,437 células, posterior a este número, la población comienza a decrecer debido a que al alcanzar la confluencia del 100% en los pozos de cultivo, las células comienzan a morir debido a que sufren inhibición por contacto célula-célula.

**Tabla 3.** Número calculado de células a diferentes días de cultivo, obtenido a partir de la extrapolación de las lecturas de absorbancia en la curva de calibración de MTT.

Días de cultivo	Número calculado de células
1	5,000
2	5,230
3	8,639
4	10,331
7	57,146
8	65,437
9	41,955
10	34,433

## 7.5 Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos

Los resultados de la actividad citotóxica producida por los extractos, evaluada por el método de MTT, se muestran en la Tabla 4, en donde se observa el porcentaje de viabilidad de fibroblastos tratados por 24 horas con cada extracto a las concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 µg/mL.

**Tabla 4.** Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos tratados con los extractos de *Phyllonoma laticuspis*, evaluado por medio de MTT.

Tratamiento	Porcentaje de viabilidad
Control	100
MeOH 0.01 µg/mL	82
MeOH 0.1 µg/mL	74
MeOH 1.0 µg/mL	15 *
AcOEt 0.01 µg/mL	68 *
AcOEt 0.1 µg/mL	52 *
AcOEt 1.0 µg/mL	15 *
Acuoso 0.01 µg/mL	94
Acuoso 0.1 µg/mL	90
Acuoso 1.0 µg/mL	82
DMSO 0.01 µg/mL	94
DMSO 0.1 µg/mL	88
DMSO 1.0 µg/mL	73

En la tabla se observa el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con los extractos, comparado con el porcentaje de viabilidad de los fibroblastos sin tratar (control), en donde se muestra que los extractos evaluados no producen un efecto citotóxico mayor al 30 %, con excepción del extracto MeOH a la concentración de 1.0 µg/mL y del extracto de AcOEt en todas las concentraciones evaluadas, que producen una citotoxicidad significativa de  $p < 0.05$  con respecto al control.

Se observa que los demás extractos no producen una citotoxicidad significativa con respecto a los fibroblastos control, lo cual nos indica que los extractos pueden ser evaluados en el ensayo de cierre de herida, en el cual se descartó la evaluación de los extractos orgánicos a la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

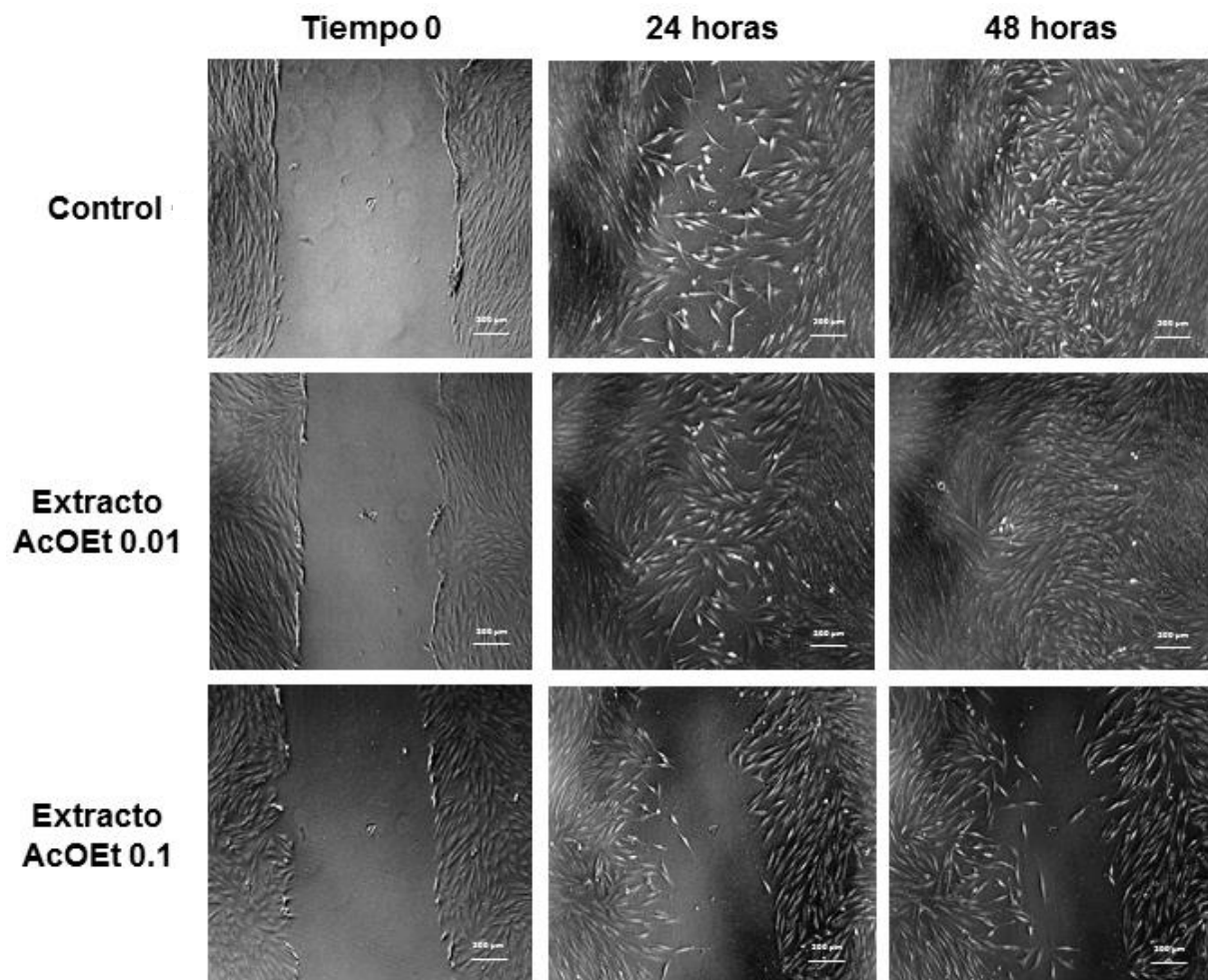
No se evaluó el efecto citotóxico del extracto hexánico porque no se disolvió en el vehículo de aplicación, por lo tanto, tampoco se evaluó en el ensayo de cierre de herida.

### **7.6 Evaluación del potencial efecto cicatrizante *in vitro*: ensayo de cierre de herida**

La evaluación del potencial efecto cicatrizante *in vitro* de los extractos se llevó a cabo por medio del ensayo de herida, el cual incluye la toma de fotos a las 0, 24 y 48 horas, en las que se pudo observar la migración/proliferación celular promovida por los extractos hacia el lecho de herida y realizar el análisis cuantitativo de dicha actividad.

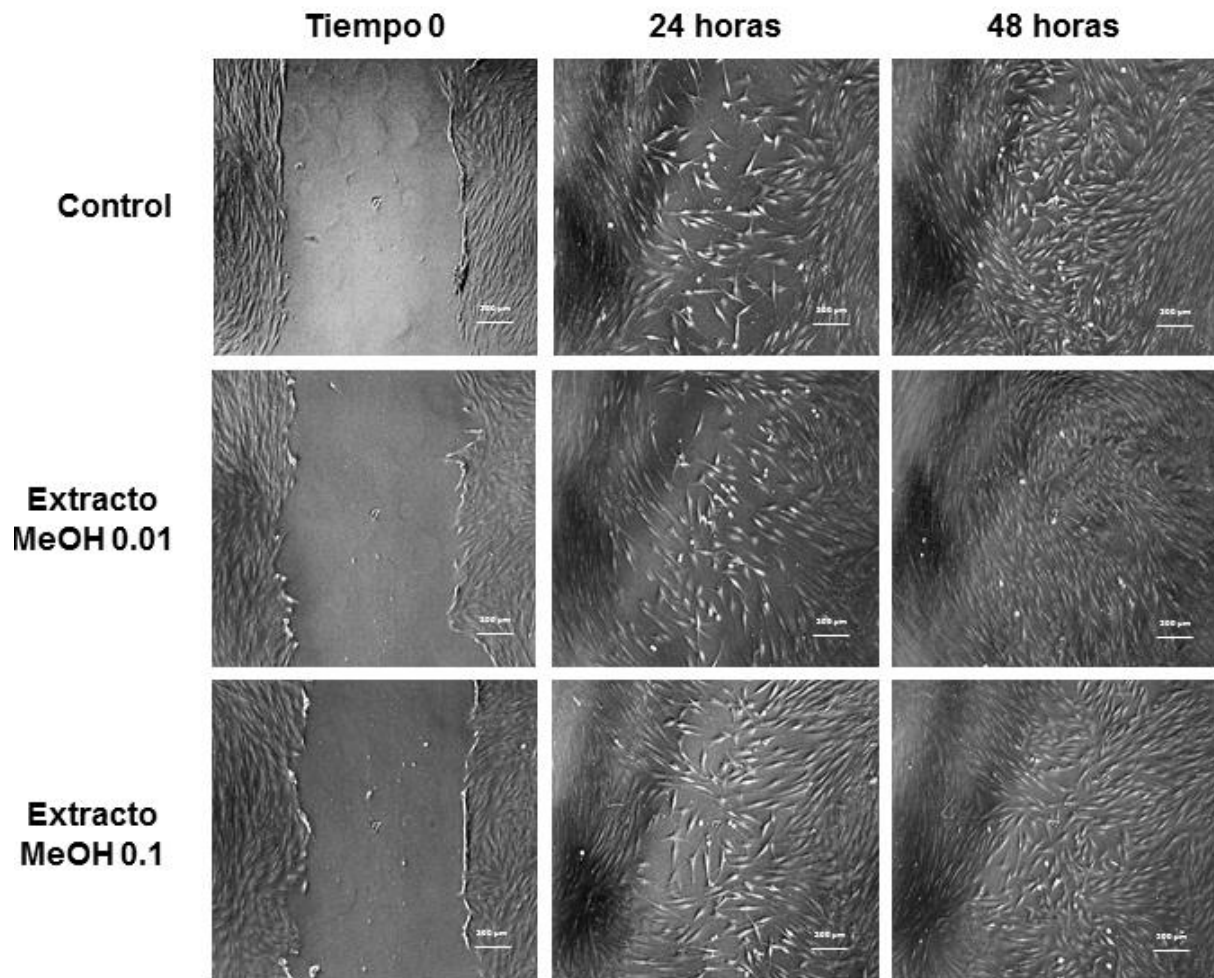
En la figura 19 se observan imágenes de células tratadas con el extracto de AcOEt y en la figura 20 células tratadas con el extracto de MeOH, en ambos casos a las concentraciones de 0.1 y 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , también se muestran los fibroblastos sin tratamiento (control).

Del mismo modo, en la figura 21 se observan las imágenes de las células tratadas con el extracto acuoso a las concentraciones de 1, 0.1 y 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , comparadas con el control.

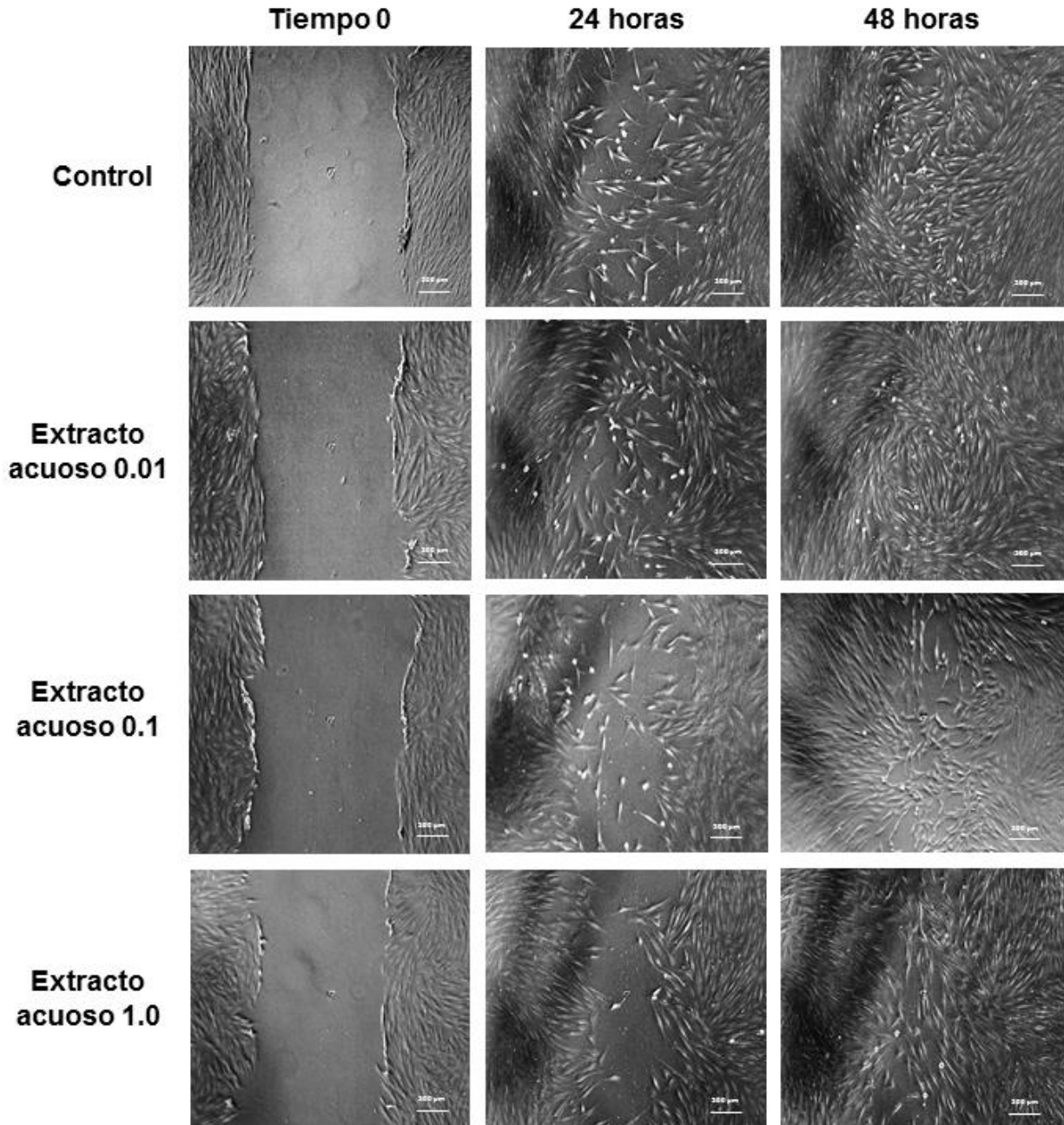


**Figura 19.** Fotografías de las heridas a las 0, 24 y 48 horas, de una de las tres evaluaciones realizadas del extracto de AcOEt ( $\mu\text{g/mL}$ ), comparadas con el control.





**Figura 20.** Fotografías de las heridas a las 0, 24 y 48 horas, de una de las tres evaluaciones realizadas del extracto de MeOH ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), comparadas con el control.



**Figura 21.** Fotografías de las heridas a las 0, 24 y 48 horas de uno de los tratamientos con el extracto acuoso ( $\mu\text{g/mL}$ ), comparadas con el control.

Las imágenes anteriores se analizaron de manera individual por medio del programa T-scratch, con el que se cuantificó el porcentaje del área sin células de cada imagen, lo cual corresponde al porcentaje que aún falta por cerrar en cada herida (Gëback *et al*;

2009). Estos valores se compararon por extracto a las 24 (Fig. 22) y 48 (Fig. 23) horas posteriores a la aplicación de los tratamientos.

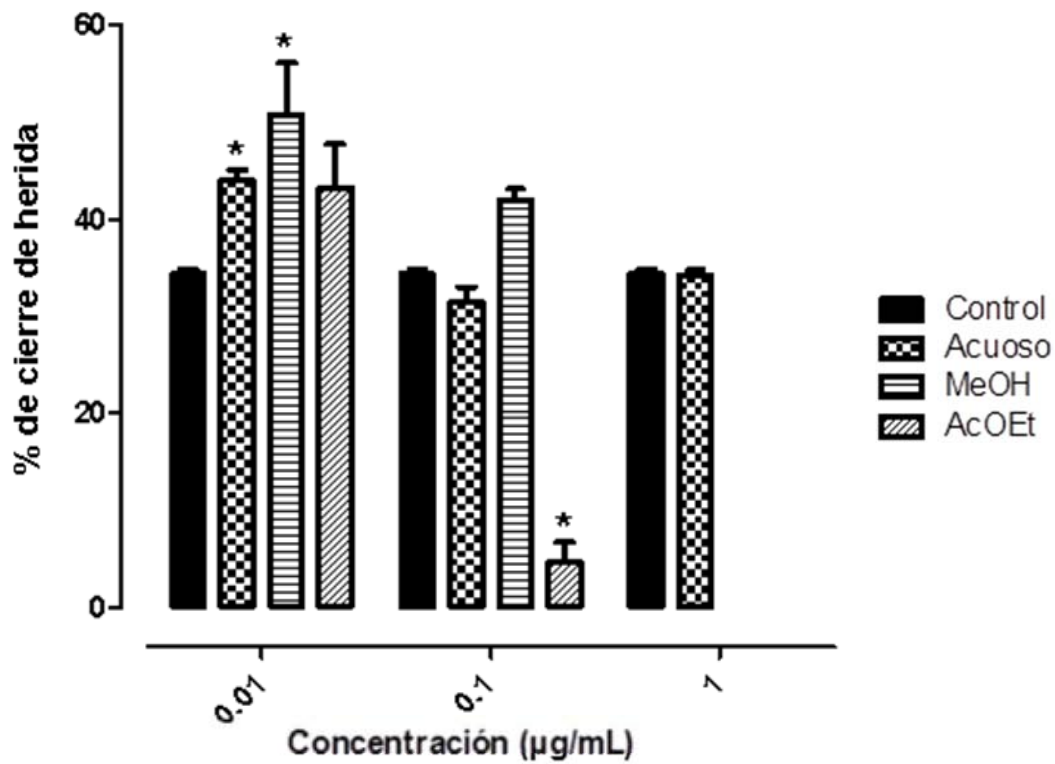
Una vez obtenidos los valores, se calcularon a partir de la ecuación 3, los porcentajes de cierre de herida (“efecto cicatrizante”).

$$\% \text{ cierre de herida} = (A_i - A_f) * \frac{100\%}{A_i} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

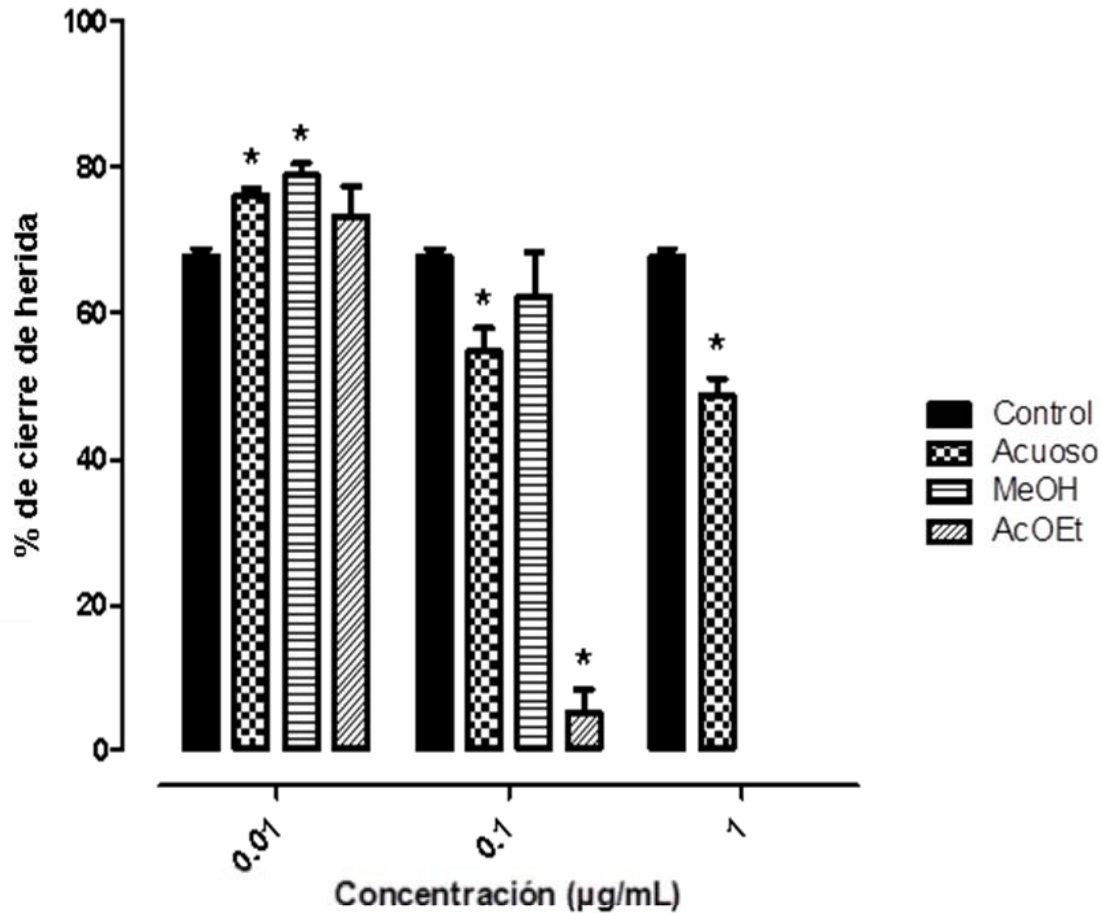
En donde:

$A_i$ : área inicial al tiempo 0.

$A_f$ : área final (24 o 48 horas).



**Figura 22.** Gráfica que representa el porcentaje de cierre de herida a las 24 horas de tratamiento de las heridas con los extractos de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. Cada barra representa la media de  $n=3 \pm \text{EEM}$ . \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.



**Figura 23.** Gráfica que representa el porcentaje de cierre de herida a las 48 horas de tratamiento de las heridas con los extractos de *Phyllonoma laticuspis*. Cada barra representa la media de  $n=3 \pm$  EEM. \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

En las gráficas anteriores se observa que a las 24 horas de tratamiento los extractos acuoso y MeOH a la concentración de 0.01 µg/mL poseen un efecto significativamente mayor a la migración de los fibroblastos control. De igual forma se observa que el extracto de acetato de etilo a la concentración de 0.1 µg/mL no promueve la migración de los fibroblastos, por el contrario, presenta un efecto citotóxico en las células.

A las 48 horas de tratamiento se observa que los extractos acuoso y MeOH a la concentración 0.01 µg/mL presentan un efecto de migración/proliferación significativamente por encima del efecto producido por los fibroblastos control.

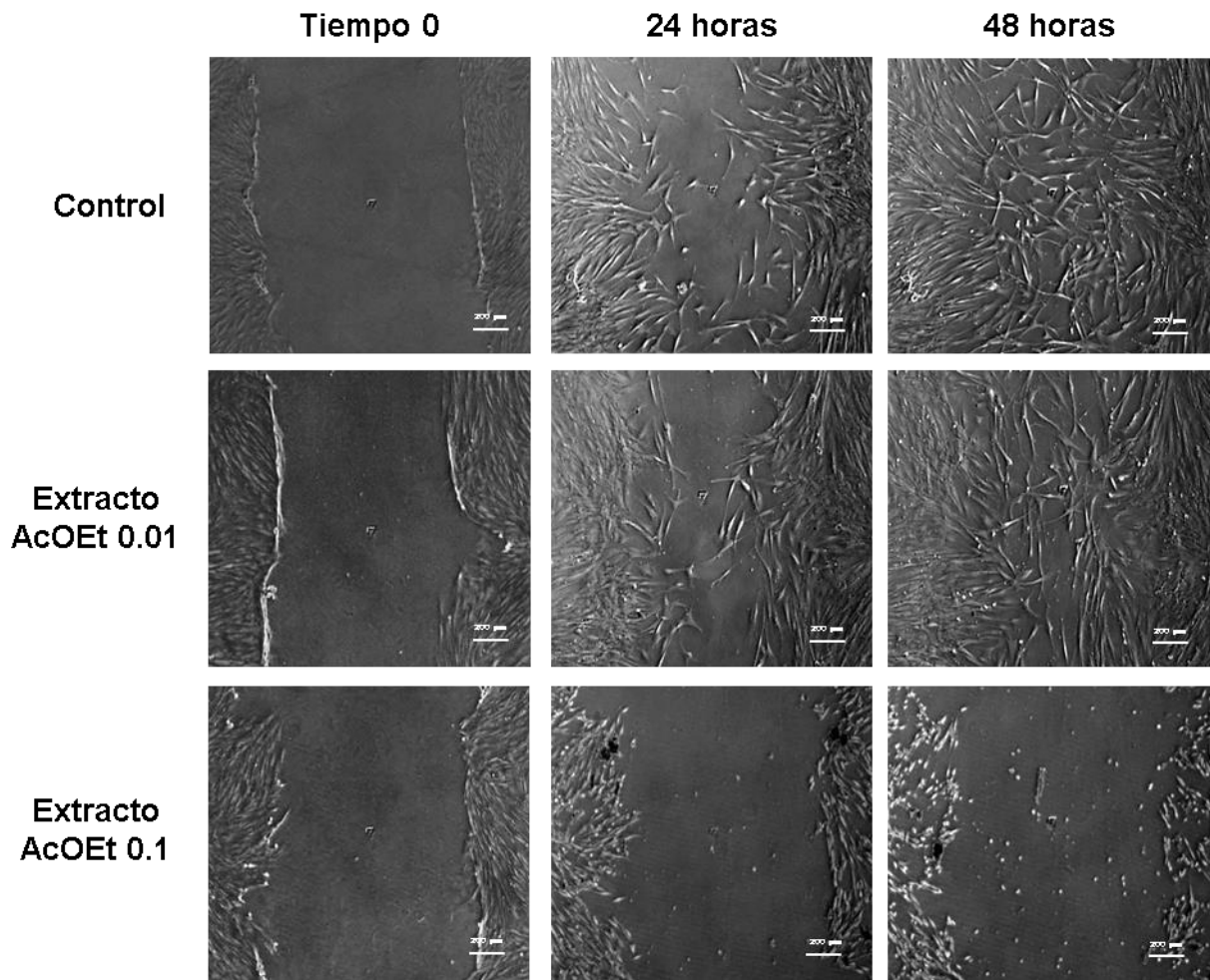
Con ello, se determinó que el extracto que presenta el mayor potencial cicatrizante es el extracto MeOH.

### **7.7 Evaluación del efecto de la mitomicina-C sobre el potencial cicatrizante de los extractos**

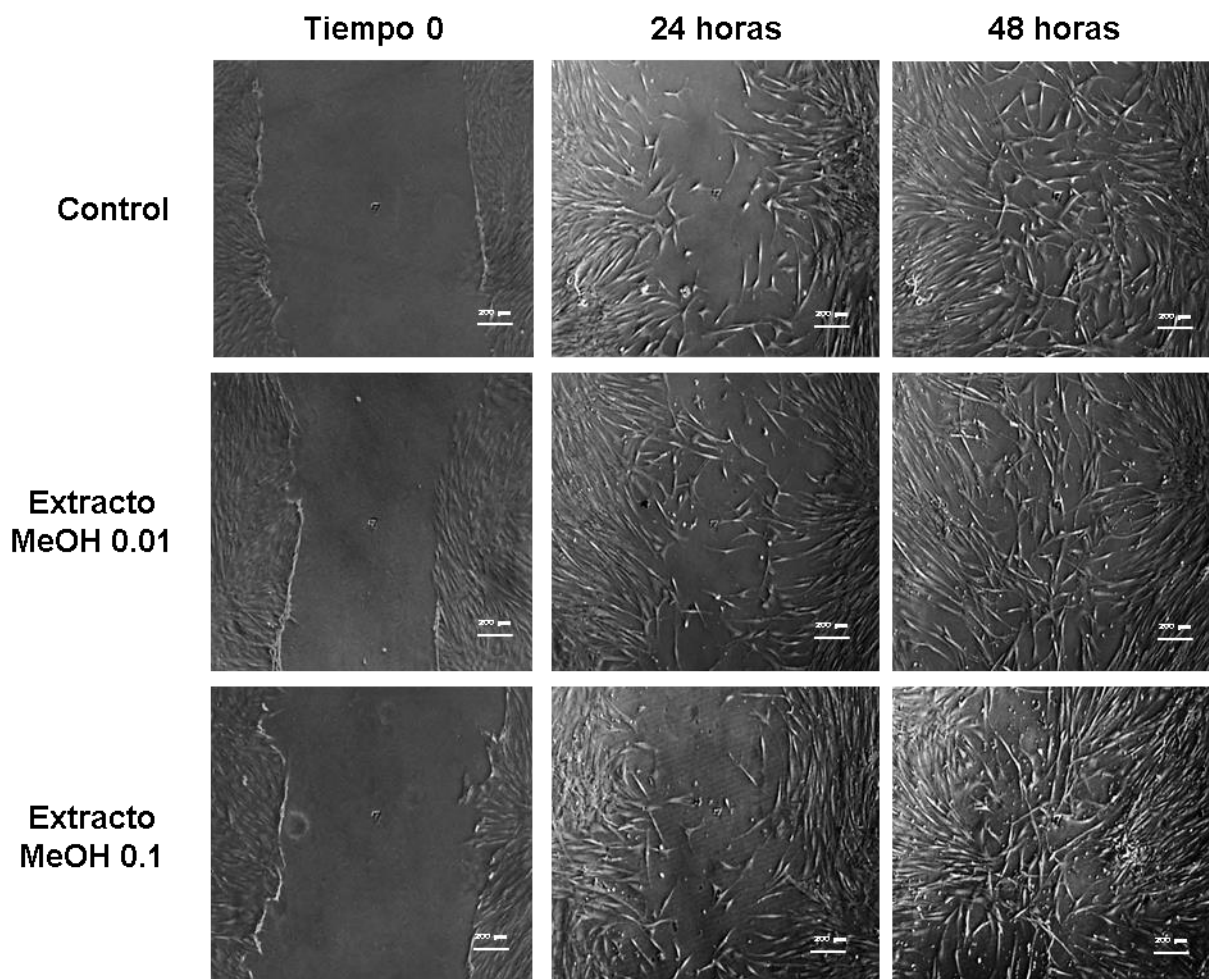
El estudio de la migración de los fibroblastos tratados con mitomicina-C en el cierre de heridas *in vitro*, para evaluar el potencial efecto cicatrizante *in vitro* de los extractos, se llevó a cabo por medio del ensayo de cierre de herida.

En la figura 24 se observan imágenes de células mitomizadas tratadas con el extracto de AcOEt y en la figura 25 células mitomizadas tratadas con el extracto de MeOH, en ambos casos a las concentraciones de 0.1 y 0.01 µg/mL, también se muestran los fibroblastos sin tratamiento (control).

Del mismo modo, en la figura 26 se observan las imágenes de las células mitomizadas tratadas con el extracto acuoso a las concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 µg/mL, comparadas con el control.

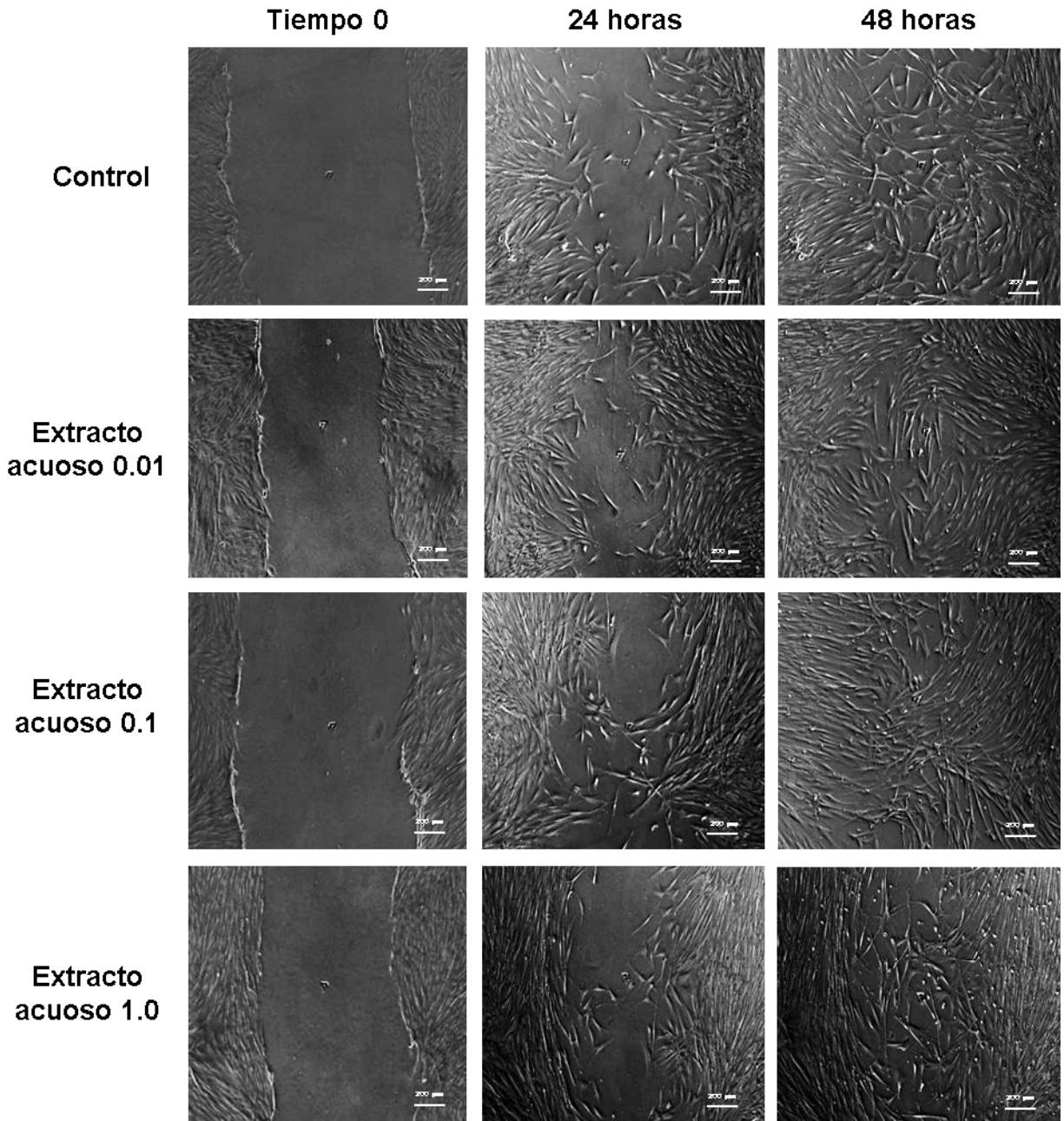


**Figura 24.** Fotografías de las heridas tratadas con mitomicina-C, a las 0, 24 y 48 horas, de una de las tres evaluaciones realizadas del extracto de AcOEt ( $\mu\text{g/mL}$ ), comparadas con el control.



**Figura 25.** Fotografías de las heridas tratadas con mitomicina-C, a las 0, 24 y 48 horas, de una de las tres evaluaciones realizadas del extracto de MeOH ( $\mu\text{g/mL}$ ), comparadas con el control.



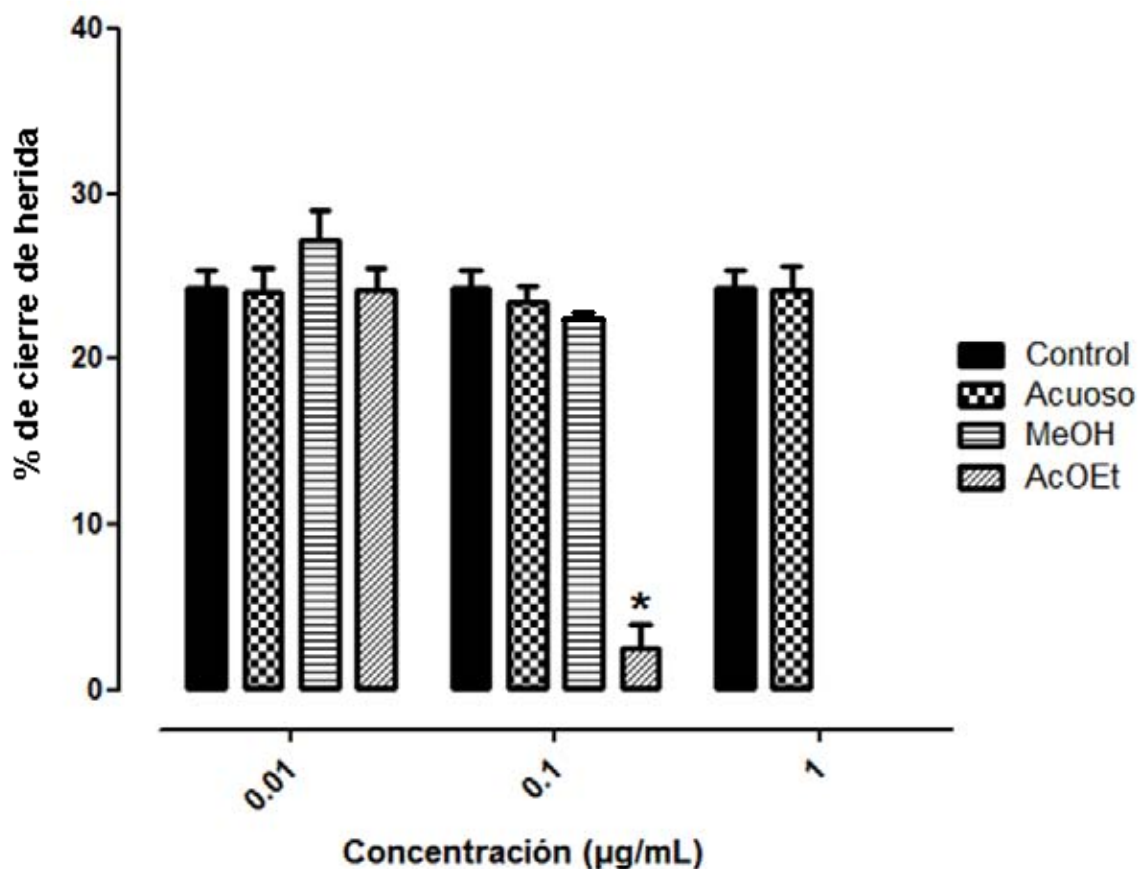


**Figura 26.** Fotografías de las heridas tratadas con mitomicina-C, a las 0, 24 y 48 horas de uno de los tratamientos con el extracto acuoso ( $\mu\text{g/mL}$ ), comparadas con el control.

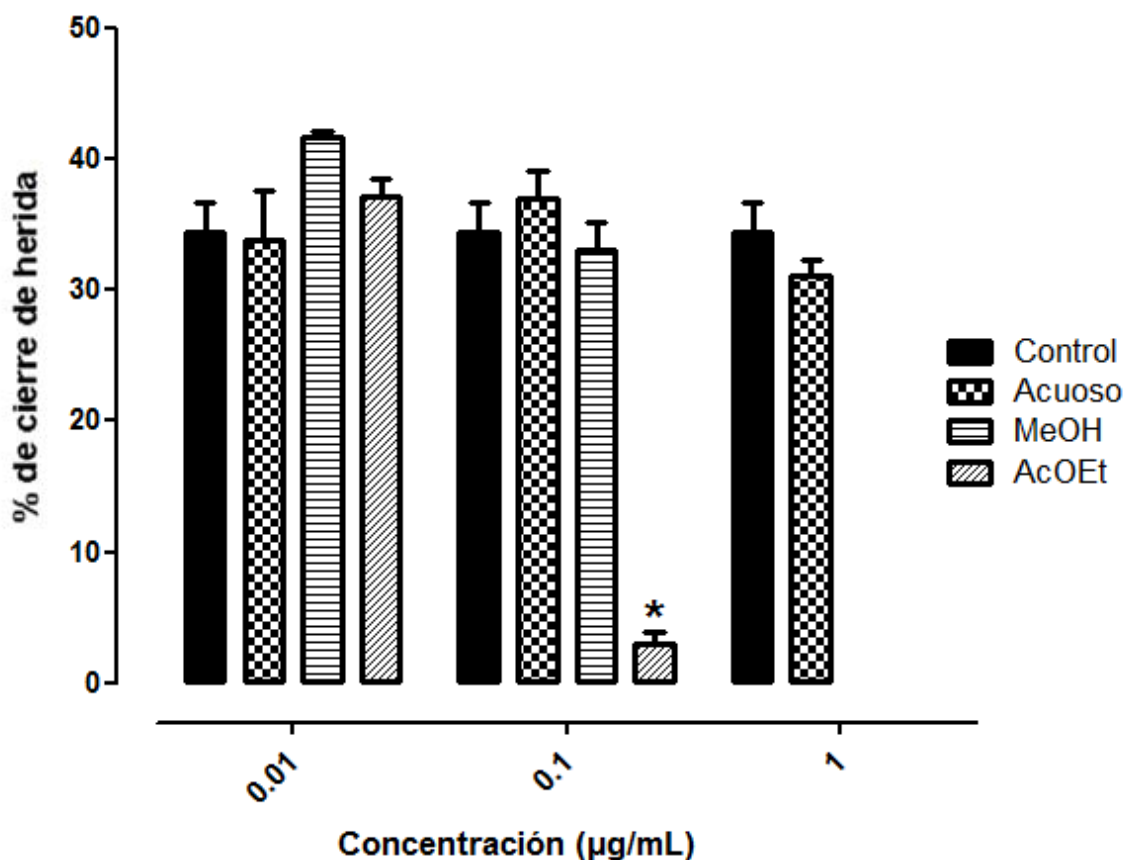
Las imágenes anteriores se analizaron de manera individual por medio del programa T-scratch, con el que se cuantificó el porcentaje del área sin células de cada imagen, lo

cual corresponde al porcentaje que aún falta por cerrar en cada herida (Gëback *et al*; 2009). Estos valores se compararon por extracto a las 24 (Fig. 27) y 48 (Fig. 28) horas posteriores a la aplicación de los tratamientos.

Una vez obtenidos los valores, se calcularon a partir de la ecuación 3, los porcentajes de cierre de herida (“efecto cicatrizante”).



**Figura 27.** Gráfica que representa el porcentaje de cierre de heridas mitomizadas a las 24 horas de tratamiento de las heridas con los extractos de *Phyllonoma laticuspis*. Cada barra representa la media de  $n=3 \pm$  EEM. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.



**Figura 28.** Gráfica que representa el porcentaje de cierre de heridas mitomizadas a las 48 horas de tratamiento de las heridas con los extractos de *Phyllonoma laticuspis*. Cada barra representa la media de  $n=3 \pm$  EEM.  
 \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

En las gráficas anteriores se puede observar que ninguna condición supera el 40% de cierre de herida a las 24, ni a las 48 horas de tratamiento con los extractos. Se observa que la migración producida por el extracto MeOH a la concentración de 0.01 µg/mL es mayor a las 24 y 48 horas, con respecto al control, sin embargo no es significativo estadísticamente.

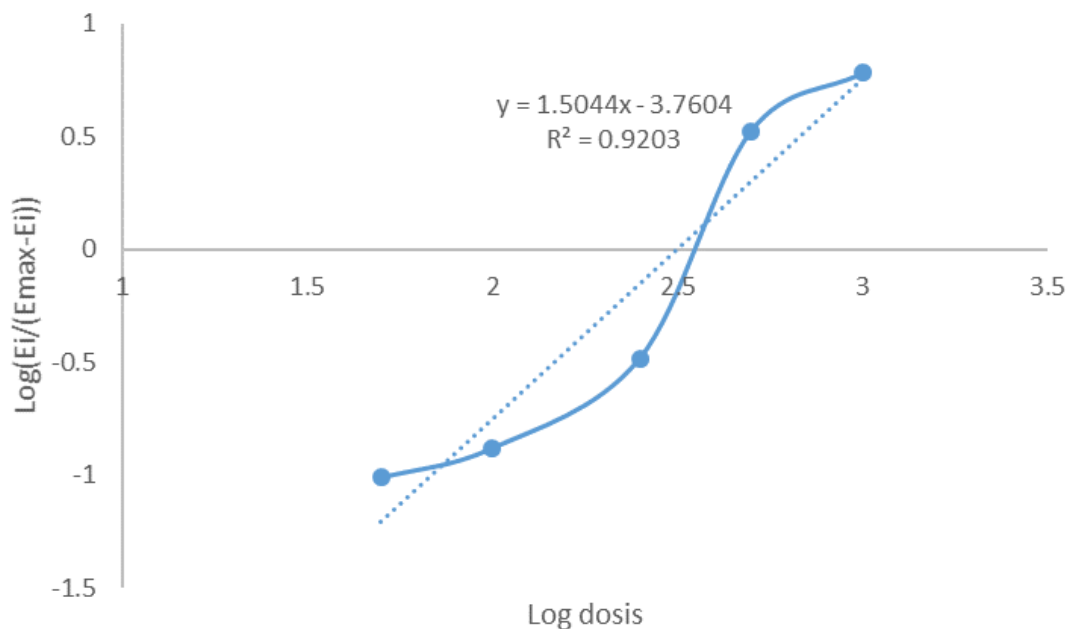
También se observa que a las 48 horas la migración producida por extracto de AcOEt a la concentración de 0.01 µg/mL es ligeramente mayor que la del control, al igual

que la producida por el extracto acuoso a la concentración de 0.1 µg/mL, sin embargo ninguna es significativa.

El extracto de AcOEt a la concentración de 0.1 µg/mL presenta un efecto citotóxico en las células.

### 7.8 Concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) del extracto metanólico en células Vero

Mediante un ajuste de la curva concentración-respuesta utilizando la ecuación de Hill (Fig. 29), se obtuvo una IC<sub>50</sub> = 316.22 µg/mL que nos indica que el extracto MeOH es poco tóxico.



**Figura 29.** Curva concentración-respuesta de la actividad inhibitoria del extracto MeOH en células Vero.

### 7.9 Fraccionamiento del extracto metanólico: Cromatografía en Columna

A partir del extracto MeOH se obtuvieron dos fracciones por medio de CC, una de 70% Acetato de Etilo-30% Hexano (AcOEt+H), la otra de 100% metanol (MeOH-F). El rendimiento obtenido en las fracciones se muestra en la Tabla 5:

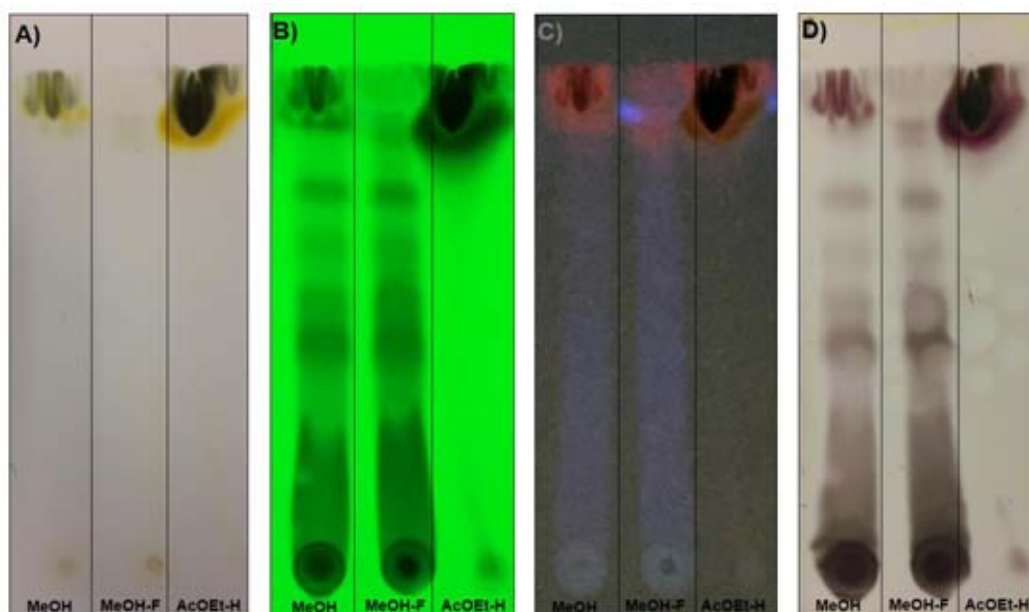
**Tabla 5.** Rendimiento obtenido en las fracciones del extracto metanólico.

<b>Fracción</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>AcOEt+H</b>	1.48	5.93
<b>MeOH-F</b>	19.25	77.09

Se observa que los posibles metabolitos responsables de la actividad son de naturaleza polar, pues se obtuvo un mayor rendimiento en la fracción de metanol, que es la fracción más polar.

### 7.10 Perfil cromatográfico de las fracciones metanólicas

Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas por medio de su perfil cromatográfico mediante CCF (Fig. 30), y comparadas con el extracto MeOH del que fueron obtenidas.



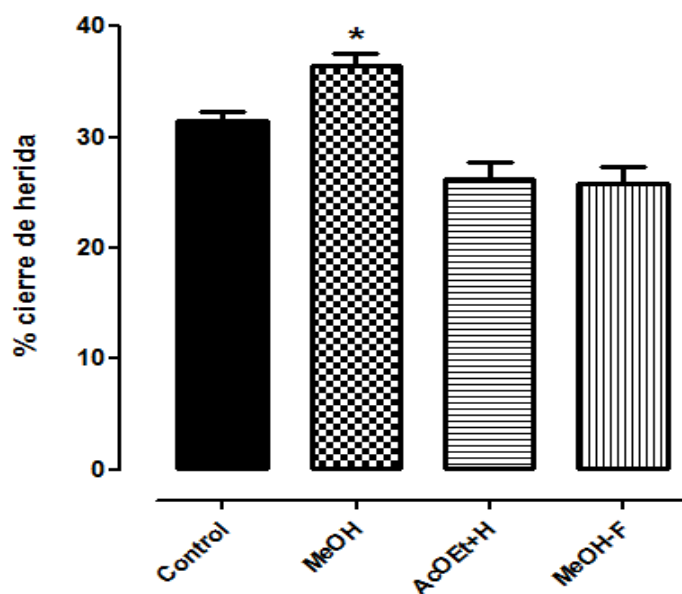
**Figura 30.** Perfil cromatográfico del extracto MeOH comparado con las fracciones obtenidas a partir de dicho extracto. A) Cromatoplaque fase normal a base de Sílica gel, eluyente 80% Hexano + 20% Acetato de etilo, B) Cromatoplaque observada bajo luz UV 254 nm, C) Cromatoplaque observada bajo luz UV 366 nm, D) Cromatoplaque revelada con sulfato cérico y calor.

En las cromatoplaques se muestran los extractos eluidos con una mezcla de 20 % AcOEt-80% Hexano, que fue la mezcla de disolventes que mejor separó a los metabolitos presentes en los extractos. Se observa que el perfil cromatográfico de la MeOH-F y el del extracto MeOH son iguales, con lo cual sabemos que los metabolitos responsables del potencial efecto cicatrizante se encuentran en esta fracción.

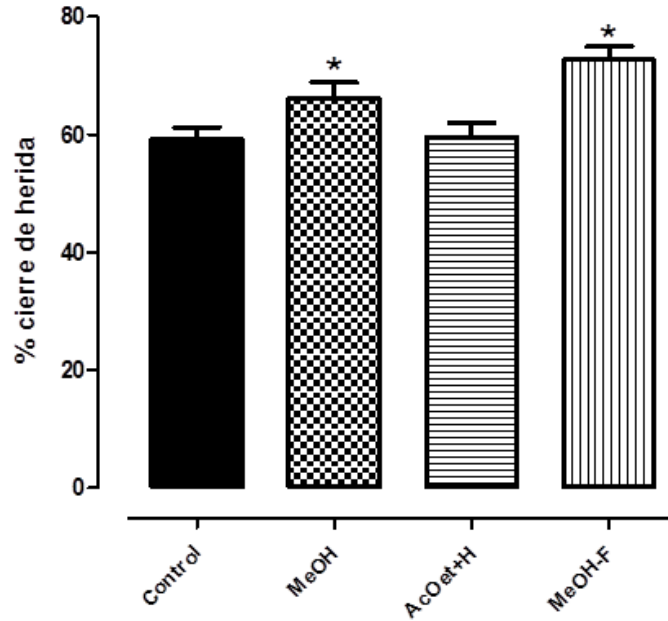
### 7.11 Evaluación de la cicatrización *in vitro*: fracciones metanólicas

Para observar el efecto en la migración/proliferación *in vitro* producido por las fracciones obtenidas, se realizó un ensayo de cierre herida en donde se probaron ambas fracciones a la concentración de 0.01 µg/mL que resulto ser la más activa, comparando el efecto de éstas con el control y con el efecto producido por el extracto MeOH sin fraccionar.

Todos los tratamientos se evaluaron a la concentración de 0.01 µg/mL, a las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos, Los porcentajes de cierre de herida se obtuvieron con el programa T-scratch y por medio de la Ecuación 3 (Fig. 31 y 32).



**Figura 31.** Gráfica del porcentaje de cierre de herida a las 24 horas de tratamiento con las fracciones del extracto metanólico de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. comparado con el porcentaje de cierre de herida promovido por el control y por el extracto metanólico sin fraccionar. Cada barra representa la media de  $n=3 \pm$  EEM ( $p < 0.5$ ).



**Figura 32.** Gráfica del porcentaje de cierre de herida a las 48 horas de tratamiento con las fracciones del extracto metanólico de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. comparado con el porcentaje de cierre de herida promovido por el control y por el extracto metanólico sin fraccionar. Cada barra representa la media de  $n=3 \pm$  EEM. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

En las gráficas se puede observar que a las 24 horas de tratamiento las fracciones no presentan un efecto estadísticamente significativo con respecto al control.

A las 48 horas de tratamiento se observa que el extracto MeOH y la MeOH-F presentan un efecto estadísticamente significativo por encima del control, observando que la MeOH-F presenta un porcentaje de cierre de herida mayor al del extracto MeOH sin fraccionar, con lo cual se comprueba que los metabolitos responsables de la posible actividad cicatrizante se encuentran en esta fracción.



## VIII. Discusión de resultados

La cicatrización es un proceso muy complejo que ocurre normalmente en todos los órganos y tejidos dañados, involucra la participación de diversos eventos celulares y bioquímicos cuya finalidad es recuperar la integridad del tejido dañado, permitiendo su regeneración y restaurando sus funciones (Salem *et al.*; 2000; Ramírez, 2010). De las células involucradas en el proceso, los fibroblastos son las principales células que intervienen en la reparación del tejido dañado, entre sus funciones se encuentran la migración, la proliferación, la adhesión, diferenciación fenotípica, entre otras (Ramírez, 2010; Guarín-Corredor *et al.*, 2013).

En la cicatrización cutánea, las heridas epidérmicas sanan por migración y proliferación de las celulares no dañadas que se encuentran en las capas inferiores de la epidermis, en el tejido de los folículos pilosos y en las glándulas anexas; sin embargo, cuando la herida llega a la zona de la dermis, el proceso de cicatrización se vuelve más lento y complicado, conduciendo a la regeneración del epitelio y el reemplazamiento de la dermis por un tejido fibroso constituido por colágeno con características diferentes al normal. Las nuevas fibras son más cortas y desorganizadas, por lo que la cicatriz nunca presenta el mismo aspecto que la piel normal (Ramírez, 2010).

El tiempo de cicatrización de las heridas dérmicas es más lento y puede sufrir complicaciones debido principalmente a infecciones, siendo por ello que se buscan alternativas que ayuden a promover el proceso de cicatrización (Guarín-Corredor *et al.*, 2013). Los remedios naturales son una de las alternativas más usadas por la población cuando se sufre una herida de este tipo, siendo ampliamente conocido el uso de plantas medicinales con propiedades desinfectantes, antiinflamatorias, antibacterianas,

anestésicas y/o regenerativas de la piel (González *et al.*, 2004). Un ejemplo de ello es el Tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.), planta que tiene un reconocido efecto de regeneración celular que promueve la cicatrización de las heridas por medio de la estimulación de la actividad mitocondrial y la proliferación de fibroblastos dérmicos (Zippel *et al.* 2009; Gómez y Ávila, 2011). En este trabajo se evaluó la citotoxicidad y el potencial efecto cicatrizante de los extractos orgánicos y acuoso de la planta *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl., la cual es conocida en Guerrero como “encarnadora” o “la hierba del venado”, la planta es reportada etnobotánicamente para cicatrizar heridas en la piel (Vega, 2002; Alcántara, 2006 y Alcántara *et al.* 2017); es una planta poco conocida por lo cual se realizó una amplia revisión bibliográfica y de herbario para conocer su distribución actual en México, encontrando que de los 14 estados en los que se reporta su presencia (Villaseñor, 2016), únicamente se tienen muestras de herbario de los estados de Chiapas, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Veracruz. Por otra parte, las propiedades cicatrizantes solo se reportan en el estado de Guerrero (Vega, 2002;).

Existen estudios que evalúan la actividad antimicrobiana de los extractos de hexano, AcOEt, MeOH, EtOH y acuoso de *P. laticuspis* (Vega, 2002; Patrón, 2014), sin embargo, no existen reportes previos que validen su actividad cicatrizante, por lo que para abarcar esta área de investigación, se decidió trabajar en colaboración con la Dra. Phaedra Silva Silva del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR-LGII), quién es experta en biomateriales y cultivo celular.

Para este estudio se colectó material vegetal de *P. laticuspis* y se prepararon extractos orgánicos de Hexano, AcOEt y MeOH, además de un extracto Acuoso, con el objetivo de obtener mezclas de compuestos de diferente polaridad.

Para realizar un análisis general de la composición de los diferentes extractos, se compararon sus perfiles cromatográficos de cada extracto por CCF, determinando que las hojas y los tallos poseen el mismo tipo de metabolitos secundarios, sin embargo, hay una mayor concentración en los extractos obtenidos a partir de hojas.

Los reportes etnobotánicos que señalan el uso de *Phyllonoma laticuspis* en la cicatrización de heridas en la piel, constituyen una posible evidencia de que alguno o algunos de los metabolitos presentes en los extractos obtenidos a partir de dicha planta presenten un potencial efecto cicatrizante.

Existen varios modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* que permiten evaluar la acción cicatrizante de una sustancia, profundizando en los eventos específicos de la cicatrización. Estos ensayos posibilitan el estudio de múltiples elementos histológicos, bioquímicos, celulares y clínicos, característicos del proceso de cicatrización (González, 2002).

Los modelos *in vitro* más comunes son los ensayos de proliferación celular que permiten determinar si el número de células en un cultivo está aumentando con la presencia (o ausencia) de una sustancia de prueba (por ejemplo extractos, sustancias químicas o fármacos) y los ensayos de citotoxicidad que determinan el número de células metabólicamente activas (viables) en los cultivos, en presencia de una sustancia de ensayo a una concentración determinada (Cordero y Aristizábal, 2002). Estos modelos permiten evaluar un gran número de extractos en poco tiempo y bajo condiciones

controladas (Wilhelm *et al.*, 2016), además, en nuestros experimentos se emplearon cultivos primarios provenientes de muestras de piel humana, lo cual hace más representativo los resultados obtenidos. Otro punto muy importante que actualmente se busca es que al trabajar con células brinda la ventaja de reemplazar y reducir el uso de modelos *in vivo* en el cernimiento de sustancias con potencial actividad biológica, en las etapas iniciales de la investigación preclínica (Eder *et al.*, 2006).

Un ensayo que engloba proliferación y citotoxicidad es el ensayo de cierre de herida, el cual es un modelo *in vitro* que permite estudiar la migración/proliferación de cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos humanos hacia el lecho de herida (Ghayempour *et al.* 2016). Este ensayo brinda la ventaja de poder realizarse en una placa multipozos y con material de laboratorio convencional, al ser un ensayo *in vitro* permite la evaluación de un gran número de extractos en poco tiempo, además, para la adquisición de las imágenes se necesita de objetivos con poco aumento (4X, 10X) con los que se obtiene un campo que cubre toda la herida. Otra ventaja que ofrece es que las células se mueven hacia una dirección definida para cerrar la herida, lo cual facilita el posterior análisis de cierre de herida. Además, el análisis del cierre de la herida se analiza en un software que se descarga de manera libre, lo cual hace que no se incremente el costo de los experimentos (Gëback *et al.* 2009).

El ensayo también permite estudiar con detalle la migración de los fibroblastos al detener la mitosis de éstos con el uso de mitomicina-C, lo cual facilita la observación del efecto único producido por la migración de las células en el cierre de las heridas (Casanueva-Cabeza *et al.*, 2009).

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos sobre cultivos de fibroblastos, por medio de MTT, demostró que el extracto AcOEt a las concentraciones 1, 0.1 y 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el extracto MeOH a la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  producen un efecto citotóxico significativo con respecto al control sobre los cultivos celulares de fibroblastos. En cuanto a la citotoxicidad del extracto MeOH en células Vero, se obtuvo una  $\text{IC}_{50}$  de 316.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual indica que el extracto es poco tóxico. Dichos resultados indican que en experimentos futuros valdría la pena evaluar el efecto del extracto metanólico a concentraciones más pequeñas que 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Resultados similares están reportados en la literatura, en donde el extracto hidroalcohólico (etanol-agua 1:1) de *Plinia peruviana* también presenta efecto citotóxico a altas concentraciones (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sin embargo a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estimula el crecimiento celular (Pitz *et al.*, 2016). Por otra parte, se observó que el DMSO empleado como vehículo de aplicación no produce efectos citotóxicos significativos sobre los cultivos.

En cuanto a la evaluación del potencial efecto cicatrizante de los extractos por medio del modelo de cierre de herida, se observó que los extractos Acuoso y MeOH a la concentración de 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contienen metabolitos que estimulan el cierre de la herida (la migración/proliferación celular de los fibroblastos hacia el sitio de la herida), ya que su efecto fue significativamente mayor con respecto al control a las 24 y 48 horas de tratamiento. En comparación, se reporta que un extracto hidroalcohólico (etanol-agua 1:1) de la especie *Calendula officinalis* a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tuvo actividad significativa empleando el mismo modelo de cierre de herida (Dinda *et al.*, 2016).

Por otro lado, se observó que el extracto acuoso a las concentraciones 1 y 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estimulan la migración celular de los fibroblastos a las 24 horas de tratamiento,

sin embargo, horas después se detiene este estímulo a las 48 horas, lo que puede estar indicando que se requiere de reemplazamiento del tratamiento, pues talvez algunas sustancias activas se agotan; estos resultados avalan el uso tradicional de la planta, pues es importante recordar que la gente lo usa en forma de infusión para lavar cotidianamente las heridas, con lo cual acelera el proceso de cicatrización (Vega, 2002).

En las heridas tratadas con mitomicina-C se observó que ninguna condición experimental superó el 40% de cierre de herida a las 24 y 48 horas de tratamiento con los extractos. Sin embargo, la migración promovida por el extracto MeOH a la concentración de 0.01  $\mu\text{g/mL}$  a las 24 y 48 horas es ligeramente mayor que la del control, al igual que la migración promovida a las 48 horas por el extracto de AcOEt a la concentración de 0.01  $\mu\text{g/mL}$  y la del extracto acuoso a la concentración de 0.1  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo ninguna es significativa.

Con estos resultados podemos observar que la migración de los fibroblastos por sí sola no logra cerrar ni el 50% de las heridas, lo cual, comparado con el porcentaje de cierre de herida máximo obtenido en el ensayo anterior (80% del extracto metanólico a la concentración de 0.01  $\mu\text{g/mL}$ ) nos indica claramente que la proliferación celular en los cultivos es necesaria para el cierre de las heridas.

Debido a los resultados anteriores, se determinó que el extracto de MeOH presenta un mejor efecto cicatrizante (proliferación/migración) y puede contener los metabolitos responsables de la actividad. Para tener un mayor acercamiento de la naturaleza de los metabolitos responsables de la actividad, se realizó un fraccionamiento del extracto MeOH, por medio de Cromatografía en Columna, para saber si una fracción menos polar o una de mayor polaridad contiene los metabolitos.

Las dos fracciones obtenidas fueron evaluadas por medio del porcentaje de cierre de herida, con lo que se observó que a las 48 horas de tratamiento el extracto MeOH y la MeOH-F presentan un efecto significativo por encima del control. Observándose que la MeOH-F presenta un porcentaje de cierre de herida mayor al del extracto MeOH sin fraccionar, con lo cual se comprueba que los metabolitos responsables de la potencial actividad cicatrizante del extracto se encuentran en esta fracción y son muy polares, ya que se extrajeron de un disolvente polar (metanol) y lo más activo de esta fracción fue nuevamente lo más polar.

Estos resultados arrojan las primeras evidencias de que el extracto MeOH de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. contiene algún o algunos metabolitos que estimulan a los fibroblastos en las primeras fases de la cicatrización ya que promueven la adhesión, migración y proliferación, eventos importantes en la reparación de las heridas; corroborándose así el potencial efecto cicatrizante del extracto MeOH de la planta *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.); sin embargo, aún faltan más estudios que ayuden a dar mayor evidencia del potencial efecto cicatrizante producido por la planta y a identificar los metabolitos responsables de dicho efecto y su mecanismo de acción.

## IX. Conclusiones

- El extracto acuoso no produce efectos citotóxicos sobre los cultivos celulares.
- El extracto de AcOEt a las tres concentraciones evaluadas (1, 0.1 y 0.01  $\mu\text{g/mL}$ ) produce un efecto citotóxico significativo sobre los cultivos celulares de fibroblastos, al igual que el extracto MeOH a la concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- La evaluación de la citotoxicidad en células Vero del extracto MeOH indica que es poco tóxico ( $\text{IC}_{50} = 316.22 \mu\text{g/mL}$ ).
- Los extractos MeOH y acuoso a la concentración de 0.01  $\mu\text{g/mL}$  contienen metabolitos que estimulan la migración/proliferación celular de los fibroblastos hacia el lecho de la herida y producen un efecto significativo con respecto al control positivo a las 24 y 48 horas de tratamiento.
- El extracto acuoso a las concentraciones 1 y 0.1  $\mu\text{g/mL}$  estimulan la migración celular de los fibroblastos a las 24 horas de tratamiento, sin embargo, a las 48 horas presentan un efecto significativo por debajo del control.
- La MeOH-F a la concentración de 0.01  $\mu\text{g/mL}$  posee un efecto estadísticamente significativo con respecto al control positivo a las 48 horas de tratamiento.
- Es necesaria la división de las células para cerrar las heridas, pues con la inhibición de la mitosis en los fibroblastos por el uso de mitomicina-C las heridas no logran cerrarse más del 40%.
- El extracto MeOH es el que posee el mayor potencial cicatrizante, de acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos de cierre de la herida con cultivos celulares de fibroblastos humanos.



## X. Perspectivas

- Realizar ensayos de herida con el extracto acuoso, reemplazando el tratamiento cada 24 h de cultivo para determinar si sigue aumentando el cierre de la herida, esto ya que el extracto presentó actividad a las 24 h de tratamiento y tiene la ventaja que a ninguna de las concentraciones evaluadas resultó citotóxico.
- Evaluar el efecto cicatrizante del extracto MeOH a concentraciones menores que 0.01  $\mu\text{L}/\text{mg}$  y/o en un modelo animal *in vivo*.
- Realizar la caracterización fitoquímica del extracto MeOH y/o del extracto acuoso por medio de Cromatografía en Columna y aislar por lo menos uno de los metabolitos responsables de la actividad.
- Evaluar la proliferación celular en los cultivos, promovida por los extractos, por medio de la incorporación de bromodeuxirina (BrdU).
- Evaluar el efecto citotóxico producidos por el extracto de AcOEt en otras líneas celulares, por ejemplo contra HeLa (cáncer cérvico-uterino), SKUL-1 (cáncer de pulmón), SW-620 (cáncer de colon) entre otras.

## XI. Bibliografía

- Alcántara F. E. (2006). *Estructura e histoquímica de la lámina foliar y propagación vegetativa de Phyllonoma laticuspis especie medicinal* (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Alcántara-Flores, E., Brechú-Franco, A.E., Villegas-Monter, A., Laguna-Hernández, G. and Gómez-Campos, A. (2017). Sexual and vegetative propagation of the medicinal Mexican species *Phyllonoma laticuspis* (Phyllonomaceae). *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* 65(1):9-19.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, (181):1-20.
- Ávila V. Y. (2015). *Estandarización del Cultivo de Queratinocitos y Fibroblastos Humanos para el Desarrollo de Sustitutos Biológicos de Piel, Mediante Técnicas de Ingeniería de Tejidos* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Casanueva-Cabeza, H., González-Sotero, J., Albero-Hernández, M., y Rojas-Álvarez, E. (2009). Tendencias actuales del uso de mitomicina C en el tratamiento del pterigión. *Rev Mex Oftalmol* 83 (6):377-380.
- Banco de imagens científicas para apresentações. (2016). fciencias.com Brasil: Servier. <http://www.servier.com/slidekit/?item=42>
- Cordero, C. C., y Aristizábal, G. F. (2002). Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4(1):100-106.
- Dinda, M., Mazumdar, S., Das, S., Ganguly, D., Dasgupta, U.B., Dutta, A., Jana, K. and Karmakar P. (2016). The Water Fraction of *Calendula officinalis* Hydroethanol Extract Stimulates In Vitro and In Vivo Proliferation of Dermal Fibroblasts in Wound Healing. *Phytother Res* 30(10):1696-1707.
- Eder, C. Nehrer, S. Losert, U. y Schoeffl H. (2006). Introducing the concept of the 3Rs into tissue engineering research. *Altex- Alternativen Zu Tierexperimenten*. 23(1):17-23.

- Estrada, E. y Uribe, M.C. (Ed.) (2002). *Atlas de Histología de Vertebrados*. Facultad de Ciencias, UNAM. México. Coordinación de Servicios Editoriales.
- Fitzpatrick, T.B. (2008). *Dermatology in General Medicine*. United States of America. McGraw Hill.
- Gartner L. (2008). *Texto Atlas de Histología*. México. McGraw-Hill.
- Ghayempour, S., Montazer, M. and Mahmoudi R. M. (2016). Encapsulation of *Aloe vera* extract into natural *Tragacanth Gum* as a novel green wound healing product. *International Journal of Biological Macromolecules* (93):344-349.
- Göback, T., Schulz, M.M., Koumoutsakos, P. y Detmar, M. (2009). Tscratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques* 46(4):265-274.
- Gómez, J., y Ávila, A. (2011). Los efectos curativos del tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.). *Tlahui-Medic* (32):10-16.
- González E. R. (2002). Modelos experimentales para la evaluación de la acción cicatrizante de medicamentos. *Rev Cubana Farm* 36(3):189-196.
- Gonzáles T. J; Rodríguez R. R; Machado P. M; González Q. J; y Cabrera S. J. (2004). Heridas, métodos de tratamiento. *MEDISAN* 8(1):33-44.
- Guarín-Corredor, C; Quiroga-Santamaría, P; y Landínez-Parra, N. S. (2013). Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Rev. Fac. Med.* 61(4):441-448.
- Hernández-Galilea, E; Sánchez, F; Guzmán, K; Moro, M. J; Vázquez, R; Barahona, J. M. (2000). Efecto de la mitomicina C sobre el endotelio corneal: estudio in vitro. *Archivos de la Sociedad Española de Oftamología* LXXV(8):515-552.
- Jiménez, C.E. (2008). Curación avanzada de heridas. *Rev. Col. Cirugía* 23 (3):146-155.
- Kurzer, A. (1991). Fisiología de la cicatrización. *Rev. Col. Cirugía* 6 (2):13-21.
- León, C; Gómez, S; Morantes, S; Cordero, C. y Ancizar, F. (2006). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica*26(1):161-168.

- Lucha F. V., Muñoz M. V., y Fornes P. B. (2008). La cicatrización de las heridas. *Enfermería dermatológica* (3):8-15 pp.
- Macías, S. K., Juárez, F. B., Cárdenas, O. N., Aguirre, R. J., y Jasso, P. Y. (2009). Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40 (2):5-10.
- Meruane, M. y Rojas, M. (2012). Desarrollo de la piel y sus anexos en vertebrados. *Int. J. Morphol.* 30(4):1422-1433.
- Mescher A. (2010). Basic Histology. United States of America. McGrawHill.
- Micro Enfoque (2015). Atlas de histología, sistema tegumentario. Argentina: Micro Enfoque. <http://www.Microenfoque.Com/atlas-de-histologia/sistema-tegumentario/>
- Mori, S. A., y Kallunki, J. A. (1977). A revision of the genus *Phyllonoma* (Grossulariaceae). *Brittonia* 29(1):69-84.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2): 55-63.
- Navarrete F.G. (2003). Histología de la piel. *Rev Fac Med UNAM* 46(4):130-133.
- Patrón G. D., Hermenegildo R. H., Flores N. J., y Bello M. J. (2014). Caracterización fitoquímica preliminar y actividad antimicrobiana de *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Paul, A. J., Kolarsick, B. S., Kolarsick, M. A., and Goodwin, G. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *J Dermatol Nurses Assoc* 3(4):203-213.
- Pérez-Calix, E. (2011). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 91. *Phyllonomaceae*. Instituto de Ecología, Departamento de botánica. UNAM. México.
- Pitz, H. da S., Pereira, A., Blasius, M.B., Voytena, A.P., Affonso, R., Fanan, S., Trevisan, A., Ribeiro-do-Valle, R. and Maraschin, M. (2016). *In vitro* evaluation of the antioxidant activity and wound healing properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) fruit peel hydroalcoholic extract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (0):1-6.
- Ramírez H.G. (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista Facultad de Salud. RFS* 2(2):69-78.

- Salem, Z. C., Pérez, P. J. A; Henning, L. E; Uherek, P. F., Schultz, O. C; Butte, B. J. M., y González, F. P. (2000). Heridas, conceptos generales. *Cuad. Cir. (Valdivia)* 14(1):90-99.
- Silva, P.N., de Almeida, O.A.E., y Rocha, I.C. (2014). Terapia tópica en el tratamiento de las heridas crónicas. *Enfermería Global* (33):33-45.
- Tobe, H. (2013). Floral morphology and Structure of *Phyllonoma* (*Phyllonomaceae*): systematic and evolutionary implications. *J Plant Res* (126):709-718.
- Tobe, H. (2015). Embryology of *Phyllonoma* (*Phyllonomaceae*, *Aquifoliales*): characteristics and character evolution. *J Plant Res* (128):633-642.
- Unger, C., Felldin, U., Rodin, S., Nordenskjöld, A., Dilber, S., and Hovatta, O. (2008). Derivation of human skin fibroblast lines for feeder cells of human embryonic stem cells. *Current protocols in stem cell Biology* (5):1C.7.1-10
- Valencia, B. C. (2010). Cicatrización: proceso de reparación tisular, aproximaciones terapéuticas. *Investigaciones Andina* 12(20):85-98.
- Villaseñor, J.L. (2016). Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(3):559-902.
- Vega C. C. (2002). *Análisis de los extractos orgánicos de la lámina foliar de Phyllonoma laticuspis (Phyllonomaceae) una especie empleada en la medicina tradicional* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Velnar, T., Bailey, T., and Smrkoji, V. (2009). The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J Int Med Res* 37(5):1528-1542.
- Wilhelm, K. P., Wilhelm, D., and Bielfeldt, S. (2016). Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Research and Technology* (0):1–10.
- Zippel, J., Deters, A. and Hensel, A. (2009). Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret bark as active principles for wound-healing properties: specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. *Journal of ethnopharmacology* (124):391-396.