



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

ACTIVIDAD CICATRIZANTE Y ANTIMICROBIANA DE *Vismia baccifera* Y *Buddleja cordata*

GRISELDA HERNÁNDEZ PASTEUR

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Criselda Hernández Pasteur, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Marcos Soto Hernández, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

Actividad cicatrizante y antimicrobiana de Vismia baccifera y Buddlejia cordata

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdó a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 16 de marzo de 2018

Criselda H. P.

Firma del
Alumno (a)

Dr. Marcos Soto Hernández

Dr. Marcos Soto Hernández

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Actividad cicatrizante y antimicrobiana de *Vismia baccifera* y *Buddleja cordata*.**

Realizada por la alumna: **Griselda Hernández Pasteur.**

Bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Marcos Soto Hernández

ASESORA

Dra. Phaedra Silva Bermúdez

ASESOR

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

ASESOR

Dr. Israel Castillo Juárez

ASESORA

Dra. Heike Vibrans Lindemann

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2018

ACTIVIDAD CICATRIZANTE Y ANTIMICROBIANA DE *Vismia baccifera* Y *Buddleja cordata*

Griselda Hernández Pasteur, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La piel es el órgano más grande en el ser humano. Cumple diversas funciones, entre otras la de constituir una barrera de protección contra agentes químicos, radiación u organismos patógenos. Se denomina como una herida, a cualquier alteración en la estructura de la piel. Las heridas se pueden ver afectadas por infecciones microbianas, que alteran el proceso de cicatrización.

Dentro de la medicina tradicional, una gran variedad de plantas que son usadas para el tratamiento de heridas, mediante infusiones, decocciones o cataplasmas. Dos de las especies que tienen reportes etnomédicos para dicho fin y se encuentran distribuidas en México, son *Vismia baccifera* (vismia) y *Buddleja cordata* (tepozán). Sin embargo, no hay evidencias que validen su efectividad.

El objetivo del presente trabajo fue, hacer un estudio biodirigido *in vitro* para evaluar el potencial de la actividad cicatrizante y antimicrobiana de *V. baccifera* y *B. cordata*. Se obtuvieron los extractos orgánicos de las hojas de ambas especies. Primero se evaluó la actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente usando fibroblastos humanos, se probó el posible efecto citotóxico de los extractos en el ensayo de MTT y su potencial como agente cicatrizante, en un ensayo de herida *in vitro*. Se estudiaron tres mecanismos celulares presentes en la cicatrización, la producción de colágena I, la migración celular y la proliferación celular.

Ninguna de las especies inhibió a *P. aeruginosa*. Los extractos no presentaron efectos citotóxicos. *Vismia* no presentó potencial como agente cicatrizante. El extracto de diclorometano-metanol de tepozán, resultó efectivo en el modelo de herida a 50 y 10 µg/mL. El extracto de metanol de tepozán, tuvo efecto en la dosis de 10 µg/mL en el modelo de herida *in vitro*. El extracto de tepozán, no incentivó la migración celular, la actividad proliferativa y la producción de colágena I. Se identificó al verbascosido como uno de los compuestos responsables de la actividad cicatrizante.

Palabras clave: *Buddleja cordata*, *Vismia baccifera*, fibroblastos, MTT, herida *in vitro*, antimicrobiana, *Pseudomonas aeruginosa*, RMN y HPLC-UV.

HEALING AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Vismia baccifera* AND *Buddleja cordata*

Griselda Hernández Pasteur, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body. It has diverse functions: among others it forms a protection barrier against chemical agents, radiation or pathogenic organisms. A wound is any alteration in the structure of the skin. Wounds can be may affected by microbial infections, which alter the healing process.

In traditional medicine, a large number of plants are used for the treatment of wounds, through infusions, decoctions or poultices. Two of the species that have ethnomedical reports for that purpose and are distributed in Mexico, are *Vismia baccifera* (vismia) and *Buddleja cordata* (tepozán). However, there is no evidences that validates its effectiveness.

The objective of the this work was conduct a biodirected *in vitro* study to evaluate the healing potential and the antibacterial activity of *V. baccifera* and *B. cordata*. Organic extracts of the leaves of both species were obtained. First, the antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. Then, using human fibroblasts, the possible cytotoxic effect of the extracts were tested in the MTT assay and their potential as a wound healing agent in an *in vitro* wound test. Three cellular mechanisms present in healing were studied, collagen I production, cell migration and cell proliferation.

None of the species inhibited *P. aeruginosa*. The extracts showed no cytotoxic effects. *Vismia* did not have potential as a healing agent. The dichloromethane-methanol extract of tepozán was effective in the wound model at 50 and 10 µg/mL. The methanol extract of tepozán, had an effect at the dose of 10 µg/mL in the *in vitro* wound model. The tepozán extract did not encourage cell migration, the proliferative activity and production collagen I. Verbascoside was identified as one of the compounds responsible for the healing activity.

Key words: *Buddleja cordata*, *Vismia baccifera*, fibroblasts, MTT, wound *in vitro*, antimicrobial, *Pseudomonas aeruginosa*, NMR and HPLC-UV.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Colegio de Postgraduados, campus Montecillo por haberme dado la oportunidad de continuar con mis estudios de Posgrado. Al Posgrado de Botánica, por haberme aceptado dentro su programa. Al CONACyT por otorgarme una beca, gracias a la cual lo pude llevar a cabo.

Así mismo, agradezco a cada uno de los profesores que conocí en el COLPOS y con los que tuve la oportunidad de cursar materias. Por todas sus enseñanzas, consejos y palabras de aliento. Especialmente a los Drs. Edmundo García Moya y Víctor Conde quienes siempre estuvieron alentándome a continuar.

Agradezco a mi consejo particular: Dr. Marcos Soto, Dra. Phaedra Silva, Dr. Reyes Chilpa, Dr. Israel Castillo y Dra. Heike Vibrans, por su apoyo en la realización de este proyecto. Por todas sus enseñanzas, paciencia y aportaciones que enriquecieron este trabajo.

Agradezco al Dr. Marcos Soto por haberme recibido y dado la oportunidad de trabajar con un proyecto propio. Por alentarme a seguir a pesar de las dificultades que se presentaron a lo largo de este recorrido. Muchas gracias por su apoyo.

A la Dra. Phaedra Silva por aceptar se parte de este proyecto, por todas sus enseñanzas, su paciencia, consejos y apoyo en todo momento. Fue un gusto enorme haber trabajado bajo su dirección. Infinitas gracias.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por seguir siendo parte de mi formación y acompañarme en este camino. Por todas sus aportaciones y apoyo. Gracias Doc.

Al Dr. Israel Castillo y a la Dra. Heike Vibrans por sus aportaciones, observaciones, por si disponibilidad y apoyo técnico.

DEDICATORIAS:

A mis amig@s y compañer@s de laboratorio por todos los ratos agradables, sus aportaciones y consejos:

* Fitoquímica del COLPOS: Ara, Alma, Yacky, José Luis, Rosa, Humberto, Mónica, Iván y Agustín. Muchas gracias.

* Chilpa-Lab 2-4 del Instituto de Química (UNAM), Dra. Laura, a Yos, Karlita, Ana, Dulce, Miriam, Pao, Brenda, Jorge, Israel y Félix. También a los que ya se fueron pero siguen siendo parte de él, Dra. Roció, Drs. Ignacio, Edgar y Juan Carlos, a Mishel, Alma y Heidi. Muchas gracias a tod@s.

* A la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación. A todos los investigadores (Valentín, Yuli, Carmina, Carmen, David, Roberto y Carlos) a los compañeros y amig@s (Gina, Adriana, Angélica, Itzel, Barak, Daniela, Ivonne y Misael) y a las técnicas que me apoyaron (Xochitl y Karina). A todos y cada uno de ellos muchas gracias por sus pláticas, enseñanzas, aportaciones, ocurrencias y por hacer más ameno el trabajo.

Hago una dedicatoria muy especial al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por su apoyo desde siempre, sin usted definitivamente nunca lo habría logrado. Gracias, por motivarme y creer en mí, aun cuando muchos no creían que podría lograrlo.

En esta etapa hice nuev@s amig@s, por lo que también les agradezco ser parte de mi vida, por todas las charlas, salidas, comidas, cafés, noches de insomnio y demás. Gracias José Luis, Ale, Reynaldo, Brenda, Vale, Arianne, Yacky, Ara y Alma.

Así mismo, agradezco y dedico esto, a todas las personas que han seguido apoyándome y motivándome a seguir adelante, como lo han sido las Dras.

Josefina Herrera, Eva Aguirre y Verónica Muñoz. Pero principalmente gracias a la Dra. Patricia Guevara....gracias Paty por todo lo que me ha ayudado, motivado y enseñado. Sabe que usted es un gran ejemplo para mí y que la aprecio mucho, espero siga presente en mi vida mucho tiempo más.

A mis amig@s de siempre!!!!...que son como mi segunda familia, Jorge, Laura, Mariana y Viri...gracias por seguir en mi vida, gracias por sus palabras de aliento, por sus pláticas de desestres, por seguir motivándome, aguantándome y por estar aún en mi vida. Los quiero mucho y otra vez...si se pudo!!!

Finalmente, pero no por ello menos importante, agradezco a mi familia... por todo su apoyo, comprensión y tolerancia. Mamá y papá...sin ustedes no habría podido llegar hasta esta etapa de mi vida, ni mucho menos habría podido superarla. Gracias por creer en mí, aunque a veces yo dudara de mi misma. Espero que se sientan muy orgullosos de ustedes, pues gracias a ustedes soy lo que soy y he logrado lo que he logrado....ma´....un éxito más logrado!!!...ya nos faltan menos!!!...

Esto también es para mí Nay...espero que un día te sientas muy orgullosa de mí...todo esto es por ti y para ti...gracias por existir en mi vida y darle el brillo que necesitaba...

*“...Ya lo sabía, lo sospechaba desde el primer día,
Y sabía que de pronto todo cambiaría,
Y otra vida empezaría,
Y ya lo sabía, que por tus ojos yo me perdería,
Y sería, lo más hermoso que me pasaría,
Y una vida
Una vida no me bastaría...”*

F.d.V

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 LA PIEL	3
2.1.1 Heridas	7
2.1.2 Infecciones bacterianas.....	9
2.1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.1.3 Tratamiento de heridas.....	10
2.2 BOTANICA Y ETNOBOTANICA	11
2.2.1 <i>Buddleja cordata</i> (tepozán)	11
2.2.2 <i>Vismia baccifera</i> (vismia)	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1 <u>General:</u>	13
5.2 <u>Particulares:</u>	13
6. MATERIALES Y METODOS	14
6.1 DIAGRAMA GENERAL	14
6.2 RECOLECTA DE PLANTA	15
6.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS	16
6.4 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i>	17
6.5 CITOTOXICIDAD <i>in vitro</i> (MTT)	19
6.6 ACTIVIDAD CICATRIZANTE <i>in vitro</i>	22
6.7 EVALUACION DE LA PRODUCCION DE COLAGENA I	25
6.8 ENSAYO DE MIGRACION CELULAR (MITOMICINA C)	27
6.9 ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR (BrdU)	29
7. ANALISIS QUIMICO DEL EXTRACTO METANOLICO DE TEPOZAN	31
8. RESULTADOS Y DISCUSION	34
8.1 RENDIMIENTO DE EXTRACTOS	34
8.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	34
8.3 CITOTOXICIDAD <i>in vitro</i> DE VISMIA Y TEPOZAN (MTT)	38
8.4 ACTIVIDAD CICATRIZANTE <i>in vitro</i> DE VISMIA Y TEPOZAN	40
8.5 CITOTOXICIDAD <i>in vitro</i> DE EXTRACTOS DE TEPOZAN (MTT)	42
8.6 ACTIVIDAD CICATRIZANTE <i>in vitro</i> DE EXTRACTOS DE TEPOZAN	44
8.7 EVALUACION DE LA PRODUCCION DE COLAGENA I DE LOS EXTRACTOS	47

8.8	ENSAYO DE MITOMICINA C (MIGRACION CELULAR).....	50
8.9	ENSAYO DE BrdU (PROLIFERACION CELULAR)	52
9.	QUIMICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE TEPOZAN	54
10.	<u>CONCLUSIONES</u>	61
11.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	62
12.	<u>ANEXOS</u>	69

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Especies del genero <i>Buddleja</i> que se usan para tratar heridas.	11
Tabla 2. Especies del genero <i>Vismia</i> usadas para el tratamiento de heridas.	12
Tabla 3. Rendimiento de los extractos orgánicos de <i>Vismia</i> y <i>Buddleja</i>	43
Tabla 4. Tiempo de retención por HPLC de estándares.....	56
Tabla 5. Comparación de datos de RMN del verbascosido.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Capas de la piel. Tomada de Wikipedia.	5
Figura 2. Distribución de las capas de la epidermis. Tomada de Wikipedia.	6
Figura 3. Etapas del proceso de cicatrización. El sistema tegumentario. Alda 2015. Derechos de autor 2015. Con modificaciones.	7
Figura 4. Diagrama del método usado en la investigación.	14
Figura 5. Ejemplares de Herbario. Izquierda <i>V. baccifera</i> , derecha <i>B. cordata</i>	15
Figura 6. Proceso de extracción por maceración.	176
Figura 7. Actividad antibacteriana.	17
Figura 8. Fundamento del ensayo de MTT (reacción del MTT a formazan).	20
Figura 9. Placa de 48 pozos con cristales de formazan disueltos.	21
Figura 10. Proceso del análisis de fotografías del cierre de herida.	24
Figura 11. Contenido de colágena I. Núcleos (azúl) y colágena I (verde).	27
Figura 12. Proceso del análisis de fotografías del cierre de herida.	29
Figura 13. Ensayo de BrdU. Fibroblastos en división y normales.	31
Figura 14. Actividad antibacteriana de vismia y tepozán.	35
Figura 15. Citotoxicidad con extractos de vismia y tepozán.	39
Figura 16. Cierre de herida con extractos de vismia y tepozán.	40
Figura 17. Citotoxicidad con extractos de diferente polaridad de tepozán.	43
Figura 18. Cierre de herida con extractos de diferente polaridad de tepozán.	44
Figura 19. Producción de colágena con extractos de vismia y tepozán.	48
Figura 20. Producción de colágena con extractos de tepozán.	49
Figura 21. Evaluación de la actividad migratoria.	51
Figura 22. Actividad proliferativa con extractos de vismia y tepozán.	53
Figura 23. Actividad proliferativa con extractos de tepozán.	54
Figura 24. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico de tepozán.	55
Figura 25. Espectros de UV de estándares.	56
Figura 26. RMN ¹³ C de F3.	58
Figura 27. RMN ¹ H de F3.	58
Figura 28. Análisis de HPLC de F2.	59
Figura 29. Espectro de UV de F2.	60

1. INTRODUCCIÓN

La piel constituye el órgano más grande del cuerpo humano, lo protege contra fuerzas mecánicas, radiaciones, microorganismos, etc. Se puede ver afectada por heridas, que pueden impedir su función, causando incapacidad o muerte celular. Las heridas, pueden ser ocasionadas por hipoxia, agentes físicos o químicos, microorganismos, radiación y respuestas inmunes o inflamatorias (David, 1988).

Existen dos tipos de heridas: las agudas y las crónicas (Andrades *et al.*, 2004; Brunicardi *et al.*, 2006). Las heridas agudas tienen un proceso de reparación ordenado en un tiempo adecuado, restaurando la integridad anatómica y funcional del tejido. Las heridas crónicas no siguen un proceso de reparación ordenado o en dicho proceso no se restaura la integridad anatómica y funcional del tejido en un tiempo determinado (Lazaurus, 1994). Por lo que las heridas que no han cicatrizado en tres meses se consideran crónicas (Brunicardi *et al.*, 2006).

El proceso de cicatrización es complejo y puede ser alterado por factores o procesos que se desencadenan durante la reparación epidérmica, como la presencia de radicales libres y las infecciones microbianas (Houghton *et al.*, 2005). Cuando existen lesiones crónicas o las heridas dañan las capas más profundas de la piel, en una extensión mayor a 1 cm² es necesario usar sustitutos o tratamientos que estimulen la reparación celular en el proceso de cicatrización (Thangavelu *et al.*, 2014). Idealmente, un compuesto cicatrizante debe acelerar la reparación del tejido, controlar el proceso inflamatorio (sin inhibirlo), mantener la estabilidad en la producción de radicales libres (efecto antioxidante) y poseer la capacidad de eliminar microorganismos (hongos y bacterias) que puedan infectar la herida.

En la medicina tradicional se encuentran reportes de una gran variedad de plantas que han sido usadas para el tratamiento de heridas entre ellas *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poirett (Mimosaceae) conocida comúnmente como: tepezcohuite. El extracto acuoso de la corteza de esta planta, ha sido usado ampliamente en México para sanar heridas y quemaduras. La fracción insoluble en etanol de dicho

extracto, estimula significativamente (10 µg/ml) la proliferación de fibroblastos dérmicos y en menor medida (100 µg/ml) de queratinocitos. El fraccionamiento biodirigido permitió identificar dos fracciones ricas en arabinogalactanos como los principios estimulantes de la fracción insoluble en metanol (Zibbel, *et al*, 2012).

En trabajos que evalúan la actividad cicatrizante de especies vegetales, se ha mencionado que los compuestos fenólicos (flavonoides y taninos) alcaloides y triterpenoides poseen propiedades cicatrizantes (Guillermo *et al.*, 2005). En un estudio previo, se encontró que el extracto metanólico de *Vismia mexicana*, contiene flavonoides glicosilados y taninos, que están involucrados en la actividad antirretroviral VIH-1 *in vitro* (Hernández-Pasteur, 2013). Existen evidencias que indican que algunos extractos del género *Vismia* incrementan la proliferación de fibroblastos *in vitro*, esto se muestra en una patente Española denominada “Composición cosmética o farmacéutica, particularmente dermatológica que contiene un extracto de *Vismia*”. Esta patente reporta que el extracto metanólico de la corteza de una especie de *Vismia sp.* (10 µg/mL) estimula en un 105.7% la síntesis de colágeno I secretado por fibroblastos humanos en cultivo celular; mientras que el extracto hidro-etanólico de frutos de una especie de *Vismia sp.* (12.5 µg/mL) estimula la síntesis de colágeno I en un 26% con respecto al control (Bonte y Meybeck, 1995).

Entre las especies del género *Vismia* utilizadas para tratar heridas de la piel se encuentran *V. baccifera* y *V. cayennensis*. La corteza de *Vismia baccifera* es usada por los Yanasha en Perú en las heridas infectadas (Valadeau *et al.*, 2010). Adicionalmente se ha reportado la actividad antibacteriana de *V. baccifera var. dealbata* (Salas *et al.*, 2006).

Otras de las plantas que se emplean en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de lesiones de la piel, son especies del género *Buddleja*, como *B. americana*, *B. cordata* y *B. parviflora* usadas en forma de cataplasma (INI, 1994). En los trabajos de Ávila-Acevedo *et al.*, 2005 y 2014 se demostró que los extractos

metanólicos de *B. cordata* y *B. scordioides* tienen efecto fotoprotector contra la radiación UV y no presentan un efecto genotóxico; esta actividad fue atribuida a la presencia de verbascosido y linarina. De este mismo género, la especie *B. globosa* es usada por la etnia Mapuche de Chile para la curación de heridas. Mensah *et al.*, 2001 encontraron que el extracto acuoso tiene actividad antioxidante, pero no estimula el crecimiento de fibroblastos *in vitro*. Lograron identificar como compuestos responsables de dicha actividad a los flavonoides luteolina, linarina y a los feniletanoides verbascosido y equinacosido. Adicionalmente, Houghton, 2003 encontró que los sesquiterpenos de *B. globosa* presentaron actividad antifúngica y antiinflamatoria.

El uso de especies vegetales del género *Vismia* y *Buddleja* dentro de la medicina tradicional para tratar heridas, así como algunos reportes científicos relacionados con la piel, nos indican que especies de estos géneros tienen potencial para ser usados como agentes cicatrizantes. Ambos géneros tienen especies distribuidas en México, que no han sido estudiadas en este ámbito y que de resultar efectivas, respaldarían su efectividad dentro de la etnomedicina mexicana.

2. ANTECEDENTES

2.1 LA PIEL

La piel se define como un órgano, el de mayor tamaño en el cuerpo humano que cumple con diversas funciones (Castrillon *et al.*, 2008):

- Formación de una barrera entre el medio interno y externo.
- Protección contra agresiones, físicas, químicas o microbiológicas.
- Protección contra la radiación UV.
- Percepción.
- Termorregulación.
- Controla la evaporación.

- Biosíntesis de vitamina D.
- Blanco de señales neuroendocrinas.
- Absorción intercelular y transcélular de sustancias.
- Almacenamiento de grasas.
- Excreción por glándulas sudoríparas.

La piel esta entre la interfase del medio interno y externo de un organismo (Hafttek 2011). Su estructura es variable dependiendo de su localización, llegando a medir 1 mm de grosor en áreas delgadas, como en los parpados y hasta 5 mm en áreas más gruesas, como la espalda (Chaput *et al.*, 2012). De acuerdo a su estructura la piel establece interacciones entre los componentes celulares de la dermis y la epidermis. Tiene células que responden a estímulos endógenos y exógenos. Entre ellos están queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales que son la base para reacciones inmunitarias, produciendo citosinas proinflamatorias y componentes dinámicos, como los leucocitos y las células presentadoras de antígeno, es decir las células de Langerhans, las dendríticas, los macrófagos y los linfocitos T (Castrillon *et al.*, 2008).

Se pueden distinguir tres capas principales en la piel: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Fig. 1. Tomada de wikipedia).

- La **Epidermis** es un epitelio que se encuentra en constante renovación. Está cubierta por una capa proteica formada por queratina que le confiere una estructura impermeable. Se encuentra constituida por cinco capas denominadas estratos. Del interior al exterior los estratos de la piel son: basal, espinoso, granuloso, lucido y corneo (Fig. 2. Tomada de Wikipedia). Su principal tipo celular son los queratinocitos, que migran desde la capa basal hacia la granulosa, donde se transforman en corneocitos. También se pueden encontrar otros tipos celulares como los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans. Otras estructuras presentes son las

glándulas sudoríparas, las sebáceas y los folículos pilosos (Chaput *et al.*, 2012; Le Bitoux *et al.*, 2008).

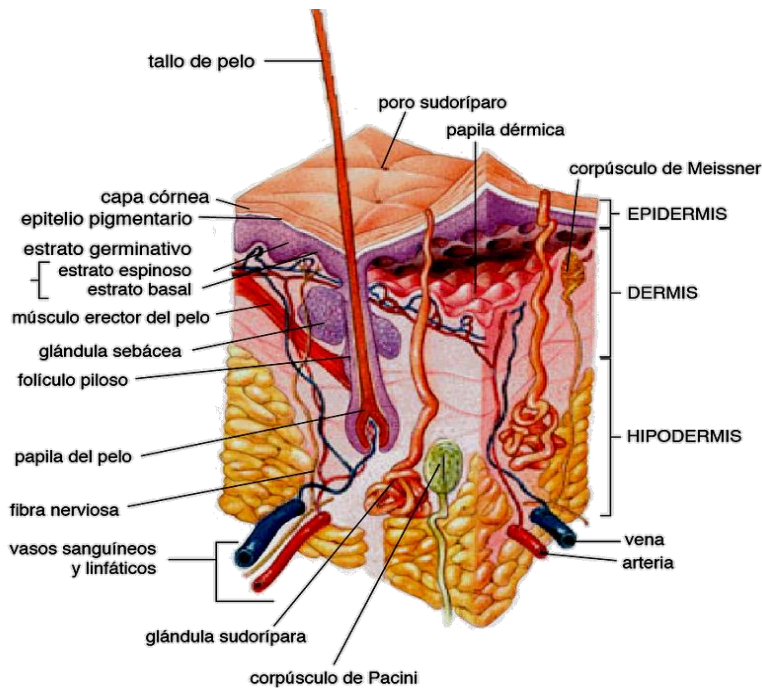


Figura 1. Capas de la piel. Tomada de Wikipedia.

- *Estrato basal*: también llamado estrato germinativo, es el sitio donde ocurre la división mitótica. Donde una célula madre forma a una célula hija, que migra y ayuda a regenerar las células en otras capas.
- *Estrato espinoso*: en esta capa las células de la capa basal se transforman en queratinocitos poliédricos distribuidos en 4 a 8 capas, quienes producen filamentos intermedios de citoqueratina.
- *Estrato granuloso*: aquí los queratinocitos se aplanan, por lo que pierden su núcleo y luego mueren (queratinización).
- *Estrato lucido*: las células tienen vacuola en vez de núcleo y al ocurrir la queratinización son células muertas.
- *Estrato corneo*: es una capa superficial, donde las células presentes se llaman corneocitos y se descaman. Funciona como una barrera contra agresiones externas como los rayos UV (que se absorben en esta capa)

los microorganismos patógenos y controla el flujo de líquidos plasmáticos (Chaput *et al.*, 2012; Le Bitoux *et al.*, 2008; Haftek 2011).

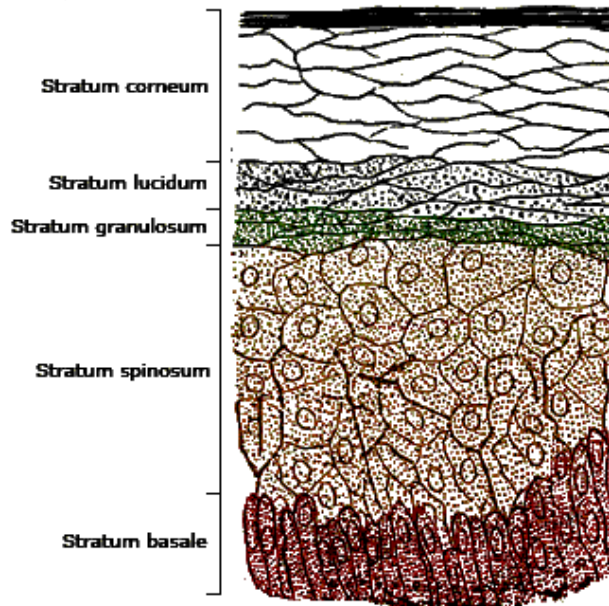


Figura 2. Distribución de las capas de la epidermis. Tomada de Wikipedia.

- La **Dermis** está formada por macromoléculas como los proteoglicanos (sintetizados por los fibroblastos). También, contiene proteínas como el colágeno y la elastina que en conjunto con los proteoglicanos forman la matriz extracelular. Tiene dos capas la dermis papilar y la dermis reticular.
- *Dermis papilar*: se encuentra debajo de la epidermis unida a la membrana basal. En esta capa se pueden encontrar arteriolas, vénulas, vasos sanguíneos y linfáticos así como terminaciones nerviosas o corpúsculos de Meissner.
- *Dermis reticular*: es más gruesa que la dermis papilar y contiene fibras de colágeno y elastina que le permiten tener resistencia ante esfuerzos mecánicos (Chaput *et al.*, 2012).

- La **Hipodermis** o tejido subcutáneo. Está formado por tejido adiposo que funciona como reserva energética, como capa de regulación térmica y protección contra ataques mecánicos y tabiques fibrosos que permiten la unión de la dermis reticular con las fascias profundas (Chaput *et al.*, 2012).

2.1.1 Heridas

Cualquier alteración en la estructura epidérmica se denomina herida. Todas las heridas llevan a cabo un proceso de cicatrización donde se distinguen cuatro etapas (Chaput *et al.*, 2012 y Senet 2008) (Fig. 3. Tomada de Alda 2015 y modificada).

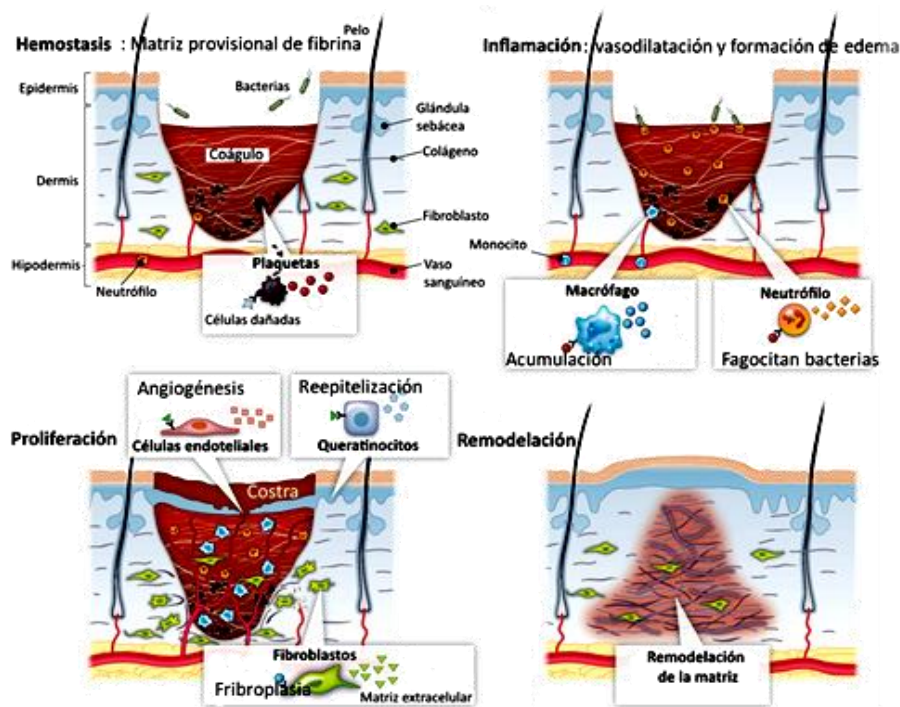


Figura 3. Etapas del proceso de cicatrización. El sistema tegumentario. Alda 2015. Derechos de autor 2015. Con modificaciones.

- **Coagulación:** comienza justo después de ocurrir la lesión. Se forma el coágulo, para evitar pérdida de sangre deteniendo la hemorragia y

protegiendo órganos vitales, así como al sistema vascular cuando las heridas son profundas.

- **Inflamación:** en esta etapa se protege a la herida y se destruye o aísla a los agentes peligrosos, por la activación del sistema inmune innato que conlleva a la liberación de macrófagos y neutrófilos.
- **Proliferación:** en esta fase, se genera una barrera protectora y se comienza a regenerar el tejido. Se llevan a cabo tres procesos importantes:
 - *Angiogénesis:* formación de vasos sanguíneos por parte de las células endoteliales.
 - *Reepitelización:* acumulación de queratinocitos que ayudan a reparar el tejido.
 - *Fibroplasia:* es la acumulación de fibroblastos que dan origen a la matriz extracelular.
- **Maduración:** en esta etapa la herida se contrae y aumenta la resistencia de la cicatriz, aunque un tejido cicatricial no vuelve a tener las condiciones de la piel inicial es un proceso que puede durar hasta dos años (Chaput *et al.*, 2012; Senet 2008 y Guarín-Corredor *et al.*, 2013).

Una herida donde el proceso de cicatrización se lleva a cabo de manera ordenada y en un tiempo menor a 3 meses se considera una herida aguda. Una herida con alteraciones que retardan la cicatrización por más de 3 meses se denomina crónica, las cuales pueden fácilmente desencadenar un tipo de cicatrización patológica llamada queloides (Senet 2008).

Una cicatriz es un tejido fibroso que va reemplazar a la piel cuando no es posible reparar la necrosis de las células parenquimatosas. Cuando son destruidas las células hasta la capa basal de la epidermis o la dermis se forma una cicatriz (Guillermo *et al.*, 2005).

Muchas heridas se curan sin complicaciones lo cual sugiere la existencia de un mecanismo antimicrobiano funcional, las defensinas que inducen la regeneración epidermal en las heridas, pero por sí solo no es suficiente para cumplir la función antimicrobiana (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2005). Se han usado productos con propiedades antisépticas que mantengan un ambiente óptimo, libre de infecciones y que favorezca el proceso de cicatrización (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2005).

2.1.2 Infecciones bacterianas

La relación de los microorganismos con una herida, está dada por tres condiciones: por *contaminación*, cuando están en la superficie de la herida pero no invaden el tejido; por *colonización*, cuando comienzan a invadir la herida y por *infección*, cuando ya invadieron el tejido y por lo tanto se multiplican (Andrades *et al.*, 2004). La contaminación y la colonización, no afectan el proceso de cicatrización pues los microbios se encuentran en la superficie de la herida. Pero en la infección sí afecta el cierre de heridas, pues se invaden tejidos sanos y adyacentes retardando su curación, causando fallas o deterioro en las heridas (Senet 2008; Sánchez-Saldaña *et al.*, 2005).

Los principales microbios causantes de infección en heridas, son bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Malassezia spp*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Thangavelu *et al.*, 2014).

2.1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Esta bacteria, es un bacilo Gram negativo que está considerado dentro de los patógenos oportunistas pues se encuentra en pacientes inmunodeprimidos, por quemaduras o quimioterapias. Tiene requerimientos nutricionales mínimos y tolerancia física (puede crecer a temperaturas mayores de los 42°C). Una de las características físicas de esta bacteria, es su color verde brillante debido a la

producción de pigmentos fluorescentes (Lujan 2014; Gómez *et al.*, 2002 y Vilar-Compte *et al.*, 2003). Existen pocos antibióticos activos contra *Pseudomonas* ya que es resistente de forma natural (disminución de la permeabilidad de su membrana) y adquirida (mediante mutaciones) contra antibióticos de primera y segunda generación. La manifestación cutánea por infección de *P. aeruginosa* es la presencia de gangrena (Lujan 2014).

2.1.3 Tratamiento de heridas

Como ya se ha venido mencionando, la curación de una herida es aquella que favorece el tejido de cicatrización hasta lograr su regeneración y que tiene como objetivo el cierre completo de la herida (Andrades *et al.*, 2004). Por ello el objetivo primario del cuidado de una herida es la creación de un medio ambiente óptimo libre de infecciones (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2005). Esto es cada vez más difícil, pues las bacterias ya presentan resistencia a antibióticos. Por ello se ha recurrido al uso de algunos productos de uso común que tienen propiedades cicatrizantes y antisépticas, como el azúcar granulado (sacarosa) y la miel. La sacarosa actúa en la herida atrayendo macrófagos, que fagocitan el tejido necrótico o gangrenoso además forma una capa protectora. La miel favorece la cicatrización al actuar en la división celular, la síntesis y la maduración del colágeno, así como la contracción y reepitelización de la herida (González *et al.*, 2004).

Las plantas han estado presentes a lo largo de la historia en la vida cotidiana de los humanos. Existen numerosas plantas usadas para el tratamiento de diferentes padecimientos (etnomedicina) específicamente y para fines de este proyecto para el tratamiento de heridas. De aquí el interés por investigar plantas que contengan nuevas moléculas (compuestos activos) que presenten dos de las actividades primordiales para el tratamiento de heridas, mantener un ambiente séptico (actividad antibacteriana) y regenerar el tejido (cierre de heridas).

2.2 BOTANICA Y ETNOBOTANICA

2.2.1 *Buddleja cordata* (tepozán)

La familia Buddlejaceae cuenta con 8 géneros y aproximadamente 125 especies, distribuidas en áreas tropicales y subtropicales de América, África y Asia. *Buddleja cordata* Kunth es un árbol o arbusto dioico de hasta 15 m de alto. La hoja es lanceolada, ovada u oblonga, con ápice agudo acuminado y margen entero. Las hojas con el haz tomentoso a glabro. Su inflorescencia es paniculada, con flores de color blanco, crema o amarillo. Tiene semillas elipsoides a ovoides. Esta especie es ampliamente distribuida en el territorio nacional, principalmente en el altiplano (Guanajuato, Querétaro y Michoacán) y hasta Guatemala. Se encuentra en bosque de oyamel, bosque de pino-encino, bosque de encino, bosque mesófilo de montaña, bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, pastizales y también en sitios con vegetación secundaria, como parcelas de cultivo y ambientes urbanos (Ocampo-Acosta, 2003).

Dentro de la medicina tradicional, se menciona el uso de algunas especies del género *Buddleja* para el tratamiento de lesiones de la piel (Tabla 1):

Tabla 1. Especies del genero *Buddleja* que se usan para tratar heridas.

Especie	Uso medicinal y administración	Autores
<i>B. cordata</i> , <i>B. parviflora</i> y <i>B. americana</i>	Se usan en el tratamiento de heridas e inflamación de la piel. Las hojas se calientan sobre cenizas y se aplican. Las hojas en cocción, se aplican en fomentos. Se mezclan hojas con grasa de cerdo o sebo y se usan en ungüento.	INI, 1994 Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana
<i>B. globosa</i>	Etnia Mapuche de Chile, usan hojas molidas en el tratamiento de heridas.	Mensah <i>et al.</i> , 2001

2.2.2 *Vismia baccifera* (vismia)

El género *Vismia* pertenece a la Familia Hypericaceae, se distribuye en zonas tropicales y templadas del mundo. Incluye aproximadamente 560 especies. *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch es un árbol o arbusto de 2–12 m de alto. La corteza tiene un exudado amarillo, las hojas son opuestas con haz pardo verdusco y envés pardo-rojizo a blanquecino. La lámina es ovada, oblongo-lanceolada y entera. La inflorescencia es terminal y cimosa con flores hermafroditas. El fruto es una baya pardo-rojiza. En México se distribuye en Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz, también se puede encontrar en Sudamérica (Colombia y Venezuela). La vegetación donde se presenta es selva alta perennifolia, selva mediana subperennifolia, bosque de pino-encino, bosque de encino, bosque caducifolio y en vegetación secundaria (Martínez y Castillo, 2008).

Dentro de la medicina tradicional, se menciona el uso de algunas especies del género *Vismia* para el tratamiento de lesiones cutáneas (Tabla 2).

Tabla 2. Especies del genero *Vismia* usadas para el tratamiento de heridas.

Especie	Uso medicinal y administración	Autores
<i>V. baccifera</i> , <i>V. pozuzoensis</i> , <i>V. sp</i>	Grupo Yanasha de Perú, usan el látex y las hojas en heridas infectadas, favoreciendo la cicatrización.	Valadeau <i>et al.</i> , 2009
<i>V. baccifera</i> , <i>V. confertiflora</i> y <i>V. sp</i>	Yanasha, usan el látex para cicatrizar y las hojas molidas en cataplasma para tratar dermatosis.	Valadeau <i>et al.</i> , 2008
<i>V. macrophylla</i>	En Colombia, se usa la corteza para bañar perros con sarna.	Pino-Benítez <i>et al.</i> , 2007
<i>V. baccifera</i> y <i>V. macrophylla</i>	En Nicaragua, el látex es usado para curar granos de la piel.	Grijalva 2006
<i>V. baccifera</i> , <i>V. cayennensis</i> , <i>V. guianensis</i> , <i>V. macrophylla</i> , <i>V. latifolia</i> , <i>V. sandwithii</i> , <i>V. sessilifolia</i> , <i>V. angusta</i> , <i>V. confertiflora</i> , <i>V. amazónica</i> , <i>V. dealbata</i> , <i>V. ferruginea</i> , <i>V. tomentosa</i> , <i>V. lindeniama</i> , <i>V. japurensi</i>	El extracto de metanol de corteza (10 µg/mL) estimula 105.7 % la síntesis de colágeno I. El extracto hidro-etanólico de frutos de <i>Vismia</i> (12.5 µg/mL) estimula 26% más la producción de colágeno I. Para ambos casos, se usaron fibroblastos humanos.	Bonte & Meybeck 1995

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la fecha no existen trabajos científicos que corroboren el uso etnomédico de *Vismia baccifera* y *Buddleja cordata* para el tratamiento de heridas. Sin embargo, de acuerdo a sus reportes medicinales, pueden ser consideradas como plantas potenciales para ser usadas en el tratamiento de lesiones cutáneas. Además no se conoce la identidad de los compuestos que pudiesen ser los responsables de la actividad cicatrizante atribuida a estas especies.

4. HIPÓTESIS

Al menos una de las especies seleccionadas mostrará potencial como agente cicatrizante, ayudando al cierre de heridas e incentivando mecanismos involucrados en el proceso de la cicatrización.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Estudiar el potencial de la actividad cicatrizante y antibacteriana de *Vismia baccifera* y *Buddleja cordata* en un ensayo biodirigido.

5.2 Particulares:

- Determinar el potencial de la actividad cicatrizante y antibacteriana de los extractos orgánicos de diclorometano-metanol de ambas especies (*vismia* y *tepozán*) en modelos celulares *in vitro*.
- Determinar el potencial de la actividad cicatrizante y antibacteriana de los extractos orgánicos de diferente polaridad, de la planta que presente mayor actividad (*vismia* o *tepozán*) en modelos celulares *in vitro*.
- Evaluar el posible mecanismo de acción del extracto con mayor potencial cicatrizante (actividad celular migratoria, proliferativa y contenido de colágeno I) en modelos celulares *in vitro*.
- Análisis fitoquímico del extracto más activo para determinar su composición química.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 DIAGRAMA GENERAL

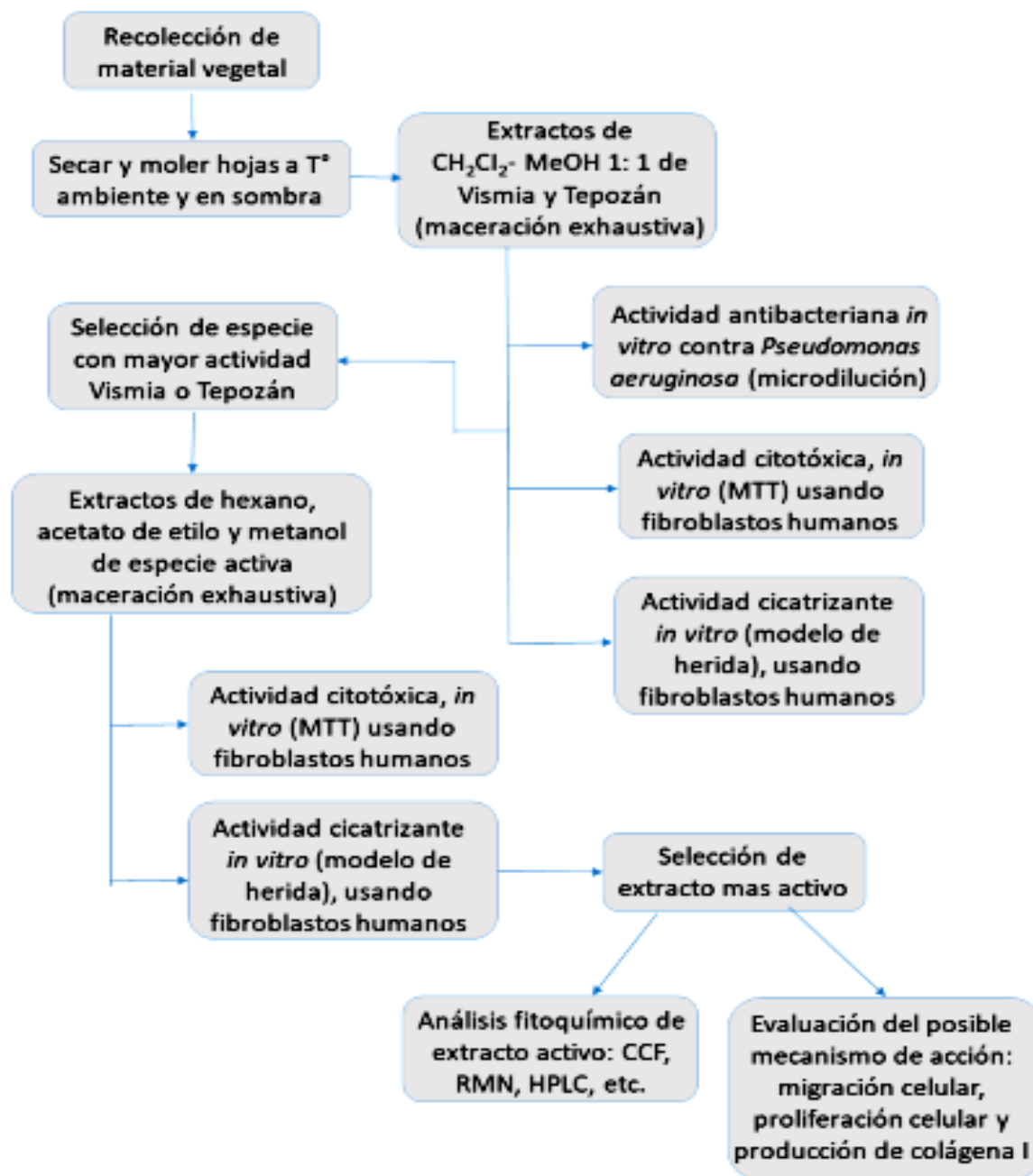


Figura 4. Diagrama del método usado en la investigación.

6.2 RECOLECTA DE PLANTA

Las hojas de la planta *Vismia baccifera* (L) Triana & Planch, fueron colectadas el 13 de septiembre del 2011, en el estado de Oaxaca, en el municipio de Santiago Comaltepec (localidad de La Esperanza) a 5 km en el tramo carretero de La Esperanza y Metates, Carretera Oaxaca-Tuxtepec. N17°42'43.0" O96°19'57.8" a 1531 m. Se depositó un ejemplar de *Vismia baccifera*, en el herbario de la Facultad de Ciencias UNAM (FCME) con el número de registro 134792 (Fig.5).

Para el caso de *Buddleja cordata* Kunth las hojas se colectaron dentro de las instalaciones del Instituto de Química y alrededores (Ciudad Universitaria UNAM) en noviembre del 2015. Se depositó un ejemplar de tepozán, en el herbario FCM con el número de registro 160639 (Fig.5).



Figura 5. Ejemplares de Herbario. Izquierda *V. baccifera*, derecha *B. cordata*.

En ambos casos, las hojas se dejaron secar a temperatura ambiente y en sombra. Una vez que estuvieron completamente secas, se separó la hoja del peciolo y de

la inflorescencia para el caso de tepozán. Las hojas se molieron y todo se almacenó (en sombra y a temperatura ambiente) por separado en bolsas de plástico hasta el momento de su uso.

6.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Esta parte de la investigación se hizo en el Laboratorio 2-4 del Instituto de Química de la UNAM y en el laboratorio de Fitoquímica del COLPOS-Montecillo, bajo la dirección de los Drs. Ricardo Reyes Chilpa y Marcos Soto Hernández respectivamente.

Los extractos se obtuvieron de acuerdo al método de maceración exhaustiva descrito por Domínguez (1973) que consiste en obtener un extracto a partir de disolventes orgánicos, puestos en contacto con un material vegetal molido.

Primero se obtuvo el extracto de diclorometano-metanol (1:1) con la finalidad de extraer compuestos de baja, mediana y alta polaridad. Para ello de cada planta se pesaron 118 g de hojas molidas. Se colocó el material vegetal dentro de un matraz Erlenmeyer de 3 L, se cubrió el material con la mezcla de DCM-MeOH (1:1) y cada tercer día se obtuvo el extracto filtrándolo con papel Whatman No. 2. El exceso de disolvente se evaporó mediante presión reducida en un rotaevaporador (Fig.6). Este proceso se repitió hasta agotar los componentes de las plantas (cuando el extracto obtenido fuera incoloro). El extracto seco fue colocado en un frasco, previamente pesado con el fin de obtener el rendimiento. Estos extractos fueron denominados tepozán y vismia.

Los extractos de diferente polaridad de ambas especies se obtuvieron con base en el método de maceración descrito en el párrafo anterior. Se pesaron 470 g de hojas secas y molidas para el caso de vismia y 156 g de material seco y molido para el caso de tepozán. Primero se extrajo cada material de forma exhaustiva con hexano (Hex) 100%. Posteriormente se secó el material se volvió a colocar dentro

del matraz y se le agregó acetato de etilo (AcOEt) 100%. Nuevamente se hicieron las extracciones del material de forma exhaustiva hasta agotar los componentes de la planta extraídos con este disolvente. Se secó la hoja y finalmente se hicieron las extracciones correspondientes con metanol (MeOH) 100% de la misma forma. Todos los rendimientos se muestran en gramos y en porcentaje. Estos extractos se denominaron VHex, VAcOEt y VMeOH para el caso de vismia y THex, TAcOEt y TMeOH para el caso de tepozán.



Figura 6. Izq. extracción por maceración; der. rotaevaporador; abajo: extracto seco.

6.4 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro*

La evaluación de la actividad antibacteriana, se hizo en el laboratorio de Fitoquímica y Cuarto de Experimentación animal del COLPOS, Campus Montecillo bajo la dirección del Dr. Israel Castillo Juárez. Es importante destacar que el manejo de la cepa se hizo bajo condiciones estériles. La bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* línea PA14 fue proporcionada por el Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Para evaluar la actividad antibacteriana, se hicieron tres experimentos independientes con 6 réplicas en cada caso. La bacteria *P. aeruginosa* se sembró en medio Luria Bertani (LB) sólido, se colocó dentro de una estufa a 28°C con una agitación de 200 rpm durante 24 h (Fig.7). Transcurrido este tiempo se preparó un inóculo con la bacteria antes sembrada en 10 mL de medio LB líquido, nuevamente se colocó dentro de la estufa bajo las condiciones antes mencionadas por 8 h. Posteriormente se ajustó el inóculo en placas de 96 pozos a una densidad óptica de 0.025 (absorbancia medida a 600 nm) en un espectrofotómetro.

Una vez que se ajustó el inóculo de *P. aeruginosa*, se colocaron 200 µL de este a cada pozo de la placa de 96 pozos (Fig.7). Nuevamente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (al que llamamos tiempo cero T00). Después se agregaron 2 µL de cada tratamiento con seis réplicas y se leyó nuevamente la absorbancia, para determinar si los tratamientos tenían un efecto en la absorbancia (tiempo con tratamiento T0C). Posteriormente se colocó la placa en una estufa bajo las condiciones arriba descritas y se hicieron lecturas en cuatro tiempos 3, 6, 9 y 12 h (tiempo T1, T2, T3 y T4 respectivamente).

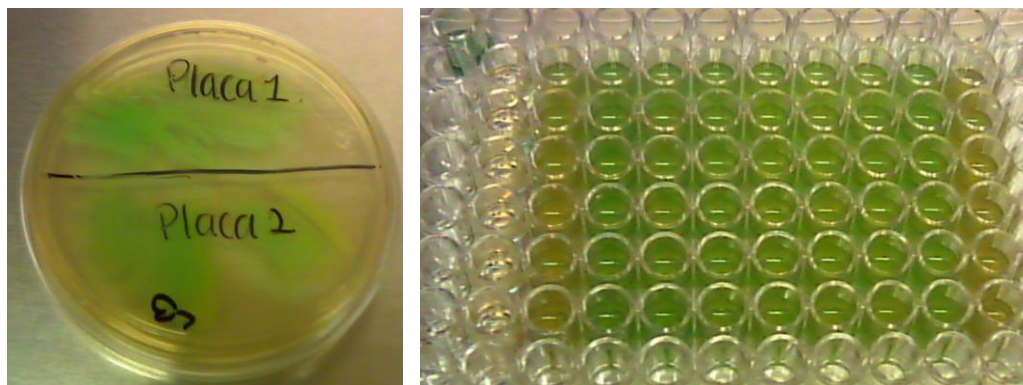


Figura 7. Derecha: *P. aeruginosa*, izquierda: método de microdilución en placa de 96 pozos.

Los tratamientos evaluados fueron los extractos de diclorometano-metanol 1:1 de vismia y tepozán, en concentraciones hechas por dilución seriada 1000, 100, 10 y 1 µg/mL. Como vehículo se usó DMSO, como control positivo se utilizó colistina en

una concentración de 500 µg/mL y como control negativo se usó medio LB sin bacterias.

Se hizo la cuenta viable para conocer el número de unidades formadoras de colonia (UFC) que se depositaron en la placa de 96 pozos, mediante el método de dilución decimal de una muestra. Para hacer una dilución 10^{-1} se requieren 0.5 mL del inoculo en 4.5 mL de medio LB líquido. Para una dilución 10^{-2} se toman 0.05 mL del inoculo en 4.95 mL de medio LB. Una vez obtenidas las diluciones se tomaron 10 µL del medio+bacteria y se sembraron en una caja Petri con medio LB solido mediante la técnica de estriado. Se dejó crecer la bacteria durante 24 h. Una vez pasado este lapso de tiempo se contaron las UFC.

6.5 CITOTOXICIDAD *in vitro* (MTT)

La evaluación del posible efecto citotóxico de los extractos, se hizo en el cuarto de cultivo número dos de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (UITTC-INR) bajo la dirección de la Dra. Phaedra Silva Bermúdez. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones estériles, trabajando dentro de una campana de flujo laminar previamente esterilizada con radiación UV. En todo momento se usaron guantes y bata azul, así como alcohol al 70% para limpiar las zonas de trabajo.

El ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es una medida indirecta que nos permite conocer el número de células metabólicamente activas de una muestra dada. Se basa en la reducción del MTT (sal de color amarillo y soluble en medios acuosos) en formazán (compuesto de color violeta e insoluble en medios acuosos). Esta reducción se lleva a cabo mediante la actividad de la enzima succinato mitocondrial (que se encuentra en células vivas y metabólicamente activas) (Fig.8). El formazán que se forma, se encuentra en forma de cristales extracelulares que son solubilizados en una mezcla de

propanol-DMSO (1:1) para que después, se puedan leer en un espectrofotómetro, obteniendo valores de absorbancia.

Los ensayos de citotoxicidad se evaluaron en dos tiempos de incubación diferentes (24 y 48 h) para tener un resultado con respecto al tiempo.

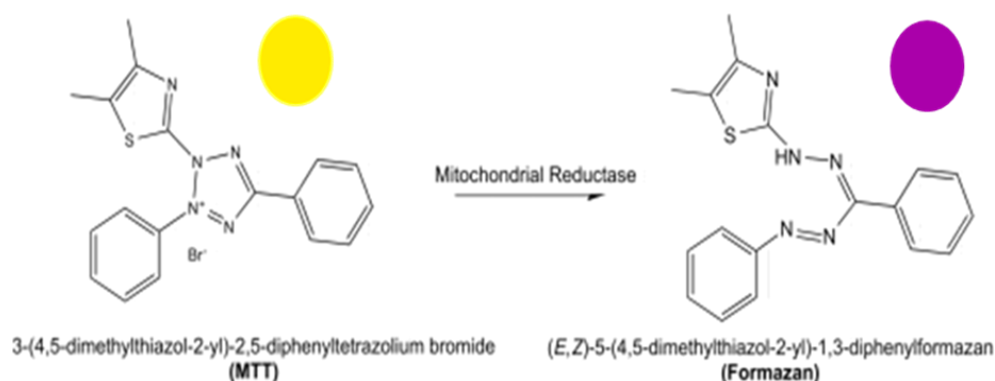


Figura 8. Fundamento del ensayo de MTT (reacción del MTT a formazan)

Para llevar a cabo estos experimentos, se usó medio esencial mínimo (DMEM) complementado con antibiótico-antimicótico ya que además de contener 27 factores esenciales para el crecimiento celular, también tiene mayor contenido de vitaminas y aminoácidos. La presencia de antibiótico-antimicótico es para favorecer las condiciones estériles y evitar la contaminación de los cultivos. Los cultivos celulares de fibroblastos humanos, se mantuvieron en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂. También, fue necesario descongelar un cultivo primario de fibroblastos humanos de prepucio de neonato, congelados en el 2012. Primero se contaron los fibroblastos, luego se sembraron las células en cajas de cultivo celular T25, agregando 5 mL de DMEM complementado y cambiando cada tercer día el medio DMEM hasta alcanzar la confluencia celular. Después de cada experimento se resembraron las células restantes para posteriores experimentos (para mayor detalle, ver Anexo).

Para este ensayo se hicieron cuatro experimentos independientes con tres repeticiones por tratamiento. En cada ensayo, se usó una caja T25 de fibroblastos humanos confluyente y en pase 3 que fueron despegados con la ayuda de tripsina

(para más detalle, ver Anexo). La viabilidad celular, fue determinada con azul tripano (tiñe de azul las células muertas) haciendo un conteo celular en una cámara de Neubauer. Una vez conocido el número de células que se tenía, se sembraron 7000 células por pozo (usando placas de 48 pozos) las células restantes se sembraron en cajas T25 para su uso en experimentos posteriores.

Las células sembradas en las placas de 48 pozos se incubaron hasta alcanzar el 80% de confluencia celular, cambiando el medio de cultivo DMEM cada tercer día. Después de alcanzar dicha confluencia (5-6 días) se agregaron 200 μ L del tratamiento correspondiente a cada pozo (por triplicado). Se dejó incubar por 24 o 48 h (según sea el caso) a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se agregó MTT y se incubo por 3 h bajo las condiciones antes mencionadas. Después de este tiempo, los cristales de formazan que se formaron fueron disueltos con una mezcla de propanol-DMSO 1:1 (Fig.9). Luego se colocaron 100 μ L de cada pozo en una placa de 96 pozos para poder tomar la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 620 nm (para más detalle ver Anexo). Los datos se analizaron mediante un análisis de ANOVA de una vía, con comparación de Dunnett's.

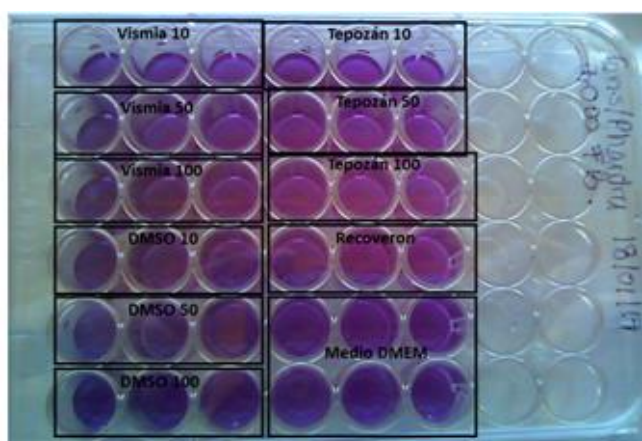


Figura 9. Placa de 48 pozos con cristales de formazan disueltos.

Primero se evaluaron los extractos orgánicos de diclorometano-metanol de vismia y tepozán, en las concentraciones de 10, 50 y 100 μ g/mL. Como control positivo

se usó el medio DMEM complementado y el fármaco Recoveron (1000 µg/mL). Como control negativo se usó el vehículo en el que se disolvieron los extractos, para ello se usaron tres concentraciones de DMSO (la más baja concentración, una dosis intermedia y la más alta) 0.3, 1.5 y 3 µL/mL respectivamente. Los datos fueron analizados mediante análisis de ANOVA de una vía, con comparación de Dunnett's.

Posteriormente se evaluó el potencial cicatrizante de ambas especies (vismia y tepozán) mediante el ensayo de herida *in vitro* (el método se describirá más adelante) para determinar cuál de ellas presentaba mayor actividad y continuar con el estudio biodirigido planteado. Una vez conociendo la especie con mayor actividad cicatrizante, se hicieron los ensayos de MTT (como se describió con anterioridad) de los extractos de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) para determinar su posible citotoxicidad. Los extractos fueron evaluados en diferentes concentraciones (5, 10 y 50 µg/mL).

6.6 ACTIVIDAD CICATRIZANTE *in vitro*

La evaluación *in vitro* del potencial cicatrizante de los extractos orgánicos, se hizo en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (UITTC-INR) bajo la dirección de la Dra. Phaedra Silva Bermúdez. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones estériles, trabajando dentro de una campana de flujo laminar previamente esterilizada con radiación UV. En todo momento se usaron guantes y bata azul, así como alcohol al 70% para limpiar las zonas de trabajo.

El ensayo de herida *in vitro* es un método que nos permite conocer el posible efecto cicatrizante por parte de los extractos orgánicos con respecto al tiempo. En este ensayo se usan monocapas de células, en este caso de fibroblastos humanos, donde se simula una herida (con una punta estéril de micropipeta) y se toman fotografías en tres tiempos (0, 24 y 48 h) de la misma zona para evaluar el

porcentaje de cierre de la herida en función del tiempo y del tratamiento usado. Cada fotografía es analizada con el software Tscratch y tras aplicar una fórmula, podemos determinar el porcentaje de herida cerrado.

Es importante mencionar que en este ensayo existen dos eventos principales que contribuyen al cierre de las heridas (tanto *in vitro* como *in vivo*). El primero de ellos es la migración celular, la cual permite el movimiento de los fibroblastos para ocupar sitios vacíos del pozo en la zona de la herida. El segundo evento importante es la proliferación celular, que permite la división celular ocupando espacios libres en el pozo en la zona de la herida.

Para llevar a cabo estos experimentos, se mantuvieron los cultivos celulares en las mismas condiciones mencionadas para los ensayos de MTT.

Para este ensayo, se hicieron cinco experimentos con una repetición por tratamiento en cada experimento. Una vez que el cultivo celular T25 llegó a la confluencia, fue necesario tratarlas con tripsina para despegarlas y conocer el número de células presentes, mediante su viabilidad con azul tripano (tiñe de azul células muertas). Posteriormente, se sembraron 45,500 células por pozo (usando placas de 12 pozos) las cuales se cultivaron hasta alcanzar 80% de confluencia (5-6 días) y cambiando el medio DMEM cada tercer día. Una vez alcanzada dicha confluencia se simuló una herida con la punta de una micropipeta de 1 mL en cada pozo, luego a cada uno se le agregaron 800 μ L del tratamiento correspondiente (se evaluó un pozo por cada tratamiento). Se tomaron fotografías de la misma zona (con el objetivo de 5X) en un microscopio invertido, con el programa AxioVision en tres tiempos (T0, T24 y T48 h) para conocer el cierre de las heridas de 0-24 h y de 0-48 h. Posteriormente, las fotografías, se analizaron usando el programa Paint y PowerPoint, para corroborar que las fotografías en los tres tiempos, correspondieran en todas sus áreas y en tamaño. Finalmente las fotografías fueron analizadas con el software Tscratch, para conocer el porcentaje del área de la herida abierta. Aplicando una fórmula (Fig.10) se obtuvo el

porcentaje de herida cerrado (para mayor detalle del método, ver Anexo). Los datos fueron analizados mediante análisis de ANOVA de una vía, con comparación de Dunnett's.

Los tratamientos de los extractos de diclorometano-metanol de vismia y tepozán, fueron evaluados en cuatro concentraciones crecientes (5, 10, 50 y 100 µg/mL). Como control positivo, se usó el medio DMEM complementado, el fármaco Recoveron (1000 µg/mL) y un Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FCF) en la concentración de 10 ng/mL. Como control negativo se usó el vehículo en el que se disolvieron los extractos, para ello se usaron tres concentraciones de DMSO (la más baja concentración, una dosis intermedia y la más alta) 0.3, 1.5 y 3 µL/mL respectivamente. Los datos fueron analizados mediante análisis de ANOVA de una vía, con comparación de Dunnett's.

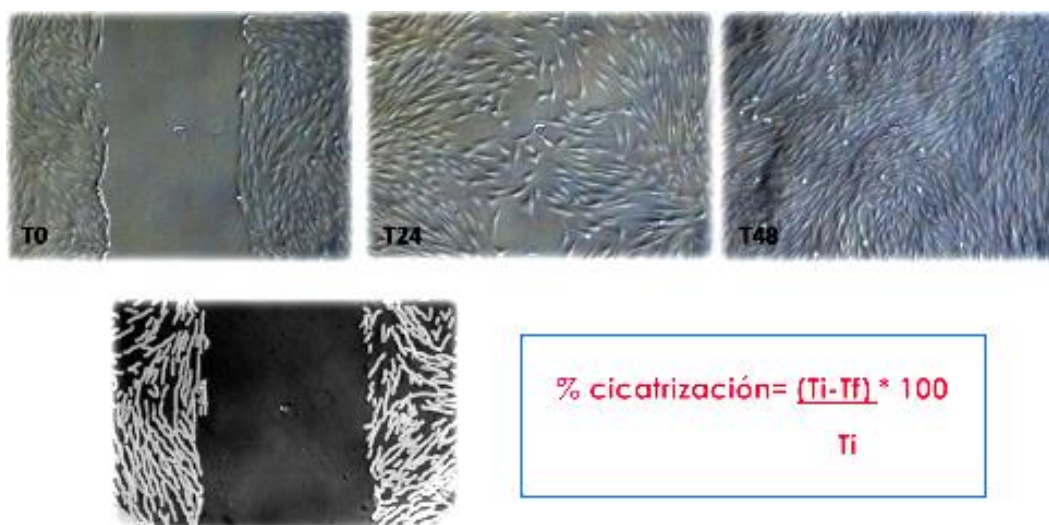


Figura 10. Arriba: proceso de cierre de herida, en tres tiempos; abajo: fotografía analizada con Tscratch (izquierda) y fórmula para obtener el porcentaje de cierre de herida (derecha).

Una vez conocido a partir de los extractos de diclorometano-metanol, cuál de las dos especies presentaba el mayor efecto cicatrizante *in vitro*, se procedió a evaluar los extractos de diferente polaridad del tepozán (hexano, acetato de etilo y metanol). Las concentraciones a las que se evaluaron los extractos orgánicos fueron 5, 10 y 50 µg/mL. Como controles positivos se usó el medio DMEM

complementado, el fármaco Recoveron (1000 µg/mL) y el FCF (10 ng/mL). Como control negativo se usó el vehículo en el que se disolvieron los extractos, para ello se usaron tres concentraciones de DMSO (la más baja concentración, una dosis intermedia y la más alta) 0.55, 1.1 y 5.5 µg/mL respectivamente. El método, fue igual al antes descrito, con una repetición de cada tratamiento por experimento. Los datos también fueron analizados mediante análisis de ANOVA de una vía, con comparación de Dunnett's.

6.7 EVALUACION DE LA PRODUCCION DE COLAGENA I

El análisis de la producción de colágena I en presencia de los extractos orgánicos, se hizo en el cuarto de cultivo número dos de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (UITTC-INR) bajo la dirección de la Dra. Phaedra Silva Bermúdez. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones estériles, trabajando dentro de una campana de flujo laminar previamente esterilizada con radiación UV. En todo momento se usaron guantes y bata azul, así como alcohol al 70% para limpiar las zonas de trabajo.

Se distinguen diferentes tipos de colágena, la más importante es la colágena I. La colágena I es una proteína que forma fibras y un componente abundante en la dermis (piel) su principal función es presentar resistencia al estiramiento. Durante la reparación de una herida, los fibroblastos permiten la formación de la matriz dérmica, depositando una primera matriz de fibronectina y ácido hialurónico para después sintetizar una matriz de colágeno hasta lograr la maduración y remodelación de la herida (Bustamante *et al.*, 2015). De ahí la importancia de conocer el efecto que tienen los extractos orgánicos de plantas en la producción de colágena I por parte de los fibroblastos.

Los ensayos para determinar la producción de colágena I fueron mediante inmunocitoquímicas. El fundamento de una inmunocitoquímica es localizar moléculas, usando anticuerpos de gran especificidad y afinidad, que logran unirse a la molécula de interés en este caso la colágena I.

Para estos experimentos se usaron fibroblastos humanos, medio DMEM complementado y las mismas condiciones presentadas anteriormente (en incubación a 37°C y 5% de CO₂). Las células restantes se sembraron en cajas T25 para su uso en experimentos posteriores.

En cada experimento fue necesario tratar con tripsina una caja T25 de fibroblastos humanos confluyente. Luego del conteo celular con azul tripano, se sembraron 7000 células por pozo (en placas de 48 pozos) se cultivaron hasta el 80% confluencia (5-6 días) cambiando el medio DMEM regularmente. Transcurrido este tiempo, se colocaron 200 µL del tratamiento correspondiente a cada pozo y se dejaron incubar durante 48 h. Después las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% y se dejaron en refrigeración hasta su uso (no más de un mes).

En la inmunocitoquímica se usaron dos anticuerpos, el anticuerpo primario que reconoce y se une a la colágena I y el anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario y produce una fluorescencia de color verde (colágena I). El anticuerpo primario fue Anti-collagenI de ratón, en una concentración 1/600, mientras que el anticuerpo secundario fue goat anti-mouse IgG, en una concentración de 1/800. Al final se hizo una contratinción con Hoechst, para teñir los núcleos de azul. Se tomaron fotografías, en un microscopio invertido de fluorescencia (10 y 20X) con el programa AxioVision (Fig.11). Se analizaron las fotografías para conocer el contenido de colágena I cualitativamente.

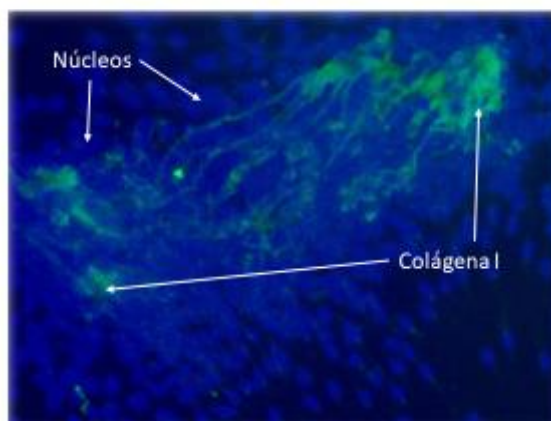


Figura 11. Contenido de colagena I. Núcleos (azúl) y colagena I (verde).

En estos ensayos, se decidió evaluar los extractos de diclorometano–metanol de vismia y tepozán en todas las concentraciones evaluadas en los otros ensayos (5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). También, se analizaron los extractos de diferente polaridad de tepozán (Hex, AcOEt y MeOH) en las dosis de 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se hicieron dos experimentos, cada uno con una repetición por tratamiento. Como control positivo se usó medio DMEM complementado y el fármaco Recoveron (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como control negativo se usaron dosis evaluadas en otros ensayos de DMSO (para mayor detalle, ver Anexo). Las fotografías fueron analizadas cualitativamente.

6.8 ENSAYO DE MIGRACION CELULAR (MITOMICINA C)

El análisis para evaluar la migración celular, en presencia de los extractos orgánicos de plantas, se hizo en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (UITTC-INR) bajo la dirección de la Dra. Phaedra Silva Bermúdez. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones estériles como se ha mencionado anteriormente.

En cualquier herida, se llevan a cabo procesos importantes que permiten la regeneración de la misma. Uno de ellos es la migración de los fibroblastos hacia la zona de la herida para ayudar a reparar el o la herida simulada dentro del pozo. Este proceso puede actuar en conjunto con otros eventos (como la proliferación celular) o de manera independiente bloqueando el proceso de proliferación. Para ello se usó Mitomicina C por su efecto de bloqueo en el proceso de división celular (Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012).

Para llevar a cabo estos experimentos se usó medio DMEM complementado. Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones normales (incubación a 37 °C y 5% de CO₂). Las células restantes se sembraron en cajas T25 para su posterior uso en otros experimentos (para mayor detalle, ver Anexo).

Para bloquear la proliferación celular se usó el fármaco Mitomicina C usado en la terapia contra el cáncer que impide la división de células cancerosas. De esta manera se impidió la división celular, pero se mantuvo el efecto migratorio de los fibroblastos, para que al ser tratados con los extractos orgánicos se pudiera evaluar su efecto en la actividad migratoria.

Se hicieron ensayos de herida *in vitro* de la manera antes descrita, con una modificación. En este caso los fibroblastos humanos al alcanzar el 80% de confluencia, fueron incubados por 3 h con mitomicina C, posteriormente se hicieron las heridas y se colocaron los tratamientos correspondientes. Después se tomaron fotografías en tres tiempos (0, 24 y 48 h) de la misma zona y cada fotografía fue analizada con el software Tscratch, para finalmente aplicar la fórmula antes mencionada y obtener el porcentaje del cierre de la herida (Fig.12) (para más detalle, ver Anexo).

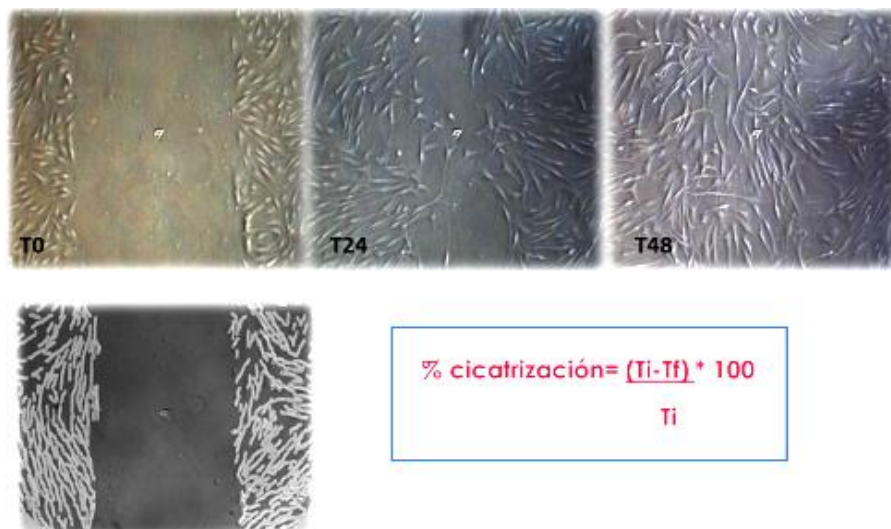


Figura 12. Arriba: cierre de herida por migración celular, en tres tiempos. Abajo: análisis de fotografía con Tscratch (izq.) fórmula para obtener % de cierre de herida (der.).

Con este modelo se hicieron tres experimentos independientes, con una repetición por tratamiento en cada experimento. Se decidió probar la mayoría de los extractos orgánicos, para obtener un resultado más comparativo. Por ello los extractos se evaluaron en las concentraciones que resultaron activas, tanto de los de diclorometano–metanol de vismia y tepozán, como los extractos de diferente polaridad de tepozán (hexano, acetato de etilo y metanol). Como controles positivos, se usó el medio DMEM complementado, el fármaco Recoveron (1000 µg/mL) y el FCC (factor de crecimiento de fibroblastos) en la concentración de 10 ng/mL. Como controles negativos se usaron tres concentraciones de DMSO que previamente fueron evaluadas en ensayos anteriores (0.3, 1.5 y 1.1 µg/mL). Los datos fueron analizados mediante análisis de ANOVA de una vía, con comparación de Dunnett's.

6.9 ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR (BrdU)

Los experimentos correspondientes para evaluar la actividad proliferativa de fibroblastos tratados con extractos orgánicos de plantas, se hizo en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto

Nacional de Rehabilitación (UITTC-INR) bajo la dirección de la Dra. Phaedra Silva Bermúdez. Los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones estériles.

Como ya se ha mencionado antes, en cualquier herida se llevan a cabo procesos importantes que permiten la regeneración de la misma. Entre ellos está la proliferación celular. Este proceso puede actuar en conjunto con otros eventos (como la migración celular) o de manera independiente de acuerdo al tratamiento asignado. Para evaluar el efecto de los extractos sobre este proceso se usó un marcaje celular con BrdU. El BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora a la nueva cadena de ADN en células que se encuentran en fase S o de división celular (Zheng *et al.*, 1997; Rahirant *et al.*, 2000; Mead & Lefebvre 2014). Con este método podemos conocer el número de células que se encuentran en división celular con respecto a un número total de células y con ello determinar si alguno de los tratamientos de extractos orgánicos evaluados incentiva la proliferación de los fibroblastos.

Para llevar a cabo estos experimentos se usó medio DMEM complementado y los cultivos celulares de fibroblastos humanos, se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. Las células restantes se siembran y cultivaron en cajas T25 para posteriores experimentos (para mayor detalle, ver Anexo).

Se hicieron dos experimentos independientes, uno a 24 h y otro a 48 h. Los tratamientos evaluados se hicieron por duplicado. El método usado fue similar al que se hizo para los ensayos de citotoxicidad (MTT). Se sembraron 7000 células por pozo (en placas de 48 pozos) y se cultivaron hasta alcanzar el 80% de confluencia. Transcurrido este tiempo se colocaron los tratamientos correspondientes a cada pozo y se dejaron incubar durante 24 o 48 h según sea el caso. Pasado este tiempo a cada pozo se agregó BrdU y se dejó incubar durante 3 h. Después se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% y se dejaron en refrigeración hasta su uso (no más de un mes).

Posteriormente se hizo una inmunocitoquímica, usando el kit AntiBrdU FLUOS, el cual detecta al BrdU previamente incorporado en el núcleo de las células. Luego mediante una contratiñación con Hoechst se tiñeron los núcleos de los fibroblastos (Fig.13) y se tomaron fotografías en un microscopio invertido de fluorescencia (10 y 20X) con el programa AxioVision. Las fotografías fueron analizadas cualitativamente para conocer el número de células que se encontraban en división celular, con respecto al total de células por cada fotografía y por tratamiento.

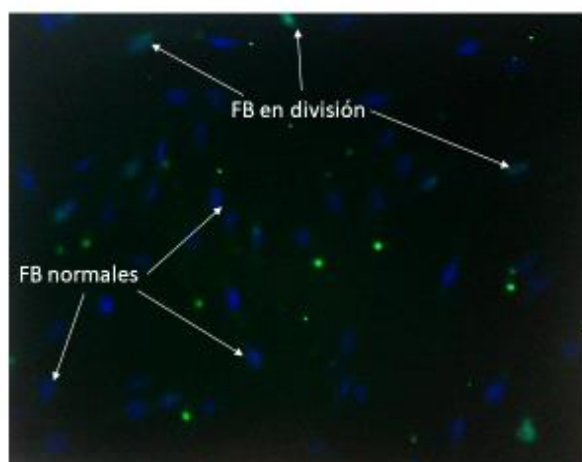


Figura 13. Ensayo de BrdU. Fibroblastos en división (turquesa) y normales (azul).

Para este ensayo se decidió evaluar solo aquellas dosis que tuvieron un efecto positivo en el modelo de herida *in vitro* por ello los extractos de diclorometano–metanol de vismia y tepozán se analizaron a 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras que los extractos de diferente polaridad de tepozán (Hex, AcOEt y MeOH) solo se evaluaron a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7. ANALISIS QUIMICO DEL EXTRACTO METANOLICO DE TEPOZAN

Esta etapa del proyecto se desarrolló en el Laboratorio 2-4 del Departamento de Productos Naturales, del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ricardo Reyes Chilpa. El extracto metanólico de tepozán, fue analizado mediante CCF y Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H). También se hizo un

estudio por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector de radiación UV (HPLC-UV) usando una λ 334 nm y una columna Zorbax XDB Phenyl de 150 X 4.5 mm estas condiciones fueron previamente reportadas por Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009. Finalmente se hizo una CCF preparativa (Silica Gel C-18) para aislar el compuesto mayoritario, su identidad se estableció por RMN.

Los extractos orgánicos de diclorometano–metanol (CH_2Cl_2 -MeOH) de *Vismia* y tepozán, así como los extractos de diferente polaridad de tepozán, fueron analizados mediante cromatografía en capa fina (CCF) para conocer la complejidad química de los mismos. Se usaron diferentes fases móviles con el fin de encontrar el mejor sistema de separación de los extractos. Dependiendo de la complejidad que presentaron fueron analizados en CCF fase normal o en fase reversa (C-18). Los disolventes usados fueron mezclas de hexano, acetato de etilo, metanol, diclorometano y cloroformo (Hex-AcOEt; AcOEt-MeOH, CH_2Cl_2 -MeOH, CHCl_3 -MeOH) en diferentes proporciones. Como revelador específico se usó Cloruro Férrico (FeCl_3) ya que de acuerdo a la literatura, se sabe que los compuestos responsables de la actividad cicatrizante en otras especies vegetales son de tipo fenólico.

Para llevar a cabo los análisis de CCF se adquirieron cuatro ácidos (ferúlico, sinápico, cumárico y cafeíco) reportados anteriormente por Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009, estos compuestos fueron proporcionados por el Dr. Arturo Navarro de la Facultad de Química de la UNAM. También se adquirió linarina que fue donada por la M. en C. Amira Arciniegas Arciniegas del Instituto de Química de la UNAM. Todos los compuestos fueron usados como estándares.

Para el análisis por HPLC-UV del extracto metanólico de *B. cordata* se emplearon como estándares los cuatro ácidos (ferúlico, sinápico, cumárico y cafeíco) previamente reportados por Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009. El análisis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones mencionadas por dichos autores. Los espectros de

UV y los tiempos de retención fueron tomados en cuenta para ser comparados con la literatura.

Dado que en el extracto metanólico de *B. cordata* no se encontró ninguno de los compuestos usados como estándares, entonces fue sometido a una CCF preparativa para separar sus componentes. Para este análisis se pesaron 100 mg del extracto seco, el cual se disolvió en la menor cantidad de MeOH. La placa preparativa fue C-18, con detector de UV y de 1 mm de espesor. La fase móvil que se uso fue CHCl_3 -MeOH en proporción 1:1.

Se obtuvieron 10 fracciones (F1-F10) que fueron raspadas y eluidas con la misma mezcla de la fase móvil (cloroformo-metanol). Todas las fracciones se analizaron con CCF y se revelaron con FeCl_3 (cloruro ferrico) un revelador para compuestos fenólicos. En el análisis de CCF de las fracciones se encontró que solo las fracciones 2 y 3 dieron reacción positiva con FeCl_3 mientras que el resto de las fracciones dieron negativo. Aunque se encontró similitud entre algunas de ellas (2 y 3, 4 y 5, 6 y 7) se decidió trabajarlas de manera independiente. Tomando en consideración el rendimiento de las fracciones, se decidió analizar algunas de ellas (2, 3, 5, 6 y 9) mediante RMN a 300 MHz.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 RENDIMIENTO DE EXTRACTOS

Los rendimientos de los extractos orgánicos de *Vismia* y tepozán se expresan en gramos y en porcentajes como se observa en la siguiente Tabla.

En los extractos de diclorometano-metanol de vismia y tepozán se obtuvieron rendimientos muy similares, lo cual sugiere un método de extracción eficiente y similar. Para los extractos de diferente polaridad, se observa que el de hexano y el de acetato de etilo, tuvieron un rendimiento muy similar en ambas especies. No así para los extractos de metanol, pues se obtuvo más extracto a partir de las hojas de tepozán.

Tabla 3. Rendimiento de los extractos orgánicos de *Vismia* y *Buddleja*.

Extractos de Vismia	Peso (g)	Rendimiento %
CH ₂ Cl ₂ - MeOH (118 g)	30.191	25.58
Hexano (470 g)	9.03	1.92
AcOEt	16.095	3.42
MeOH	75	15.96
Extractos de Tepozán	Peso (g)	Rendimiento %
CH ₂ Cl ₂ (118 g)	27.359	23.18
Hexano (156 g)	3.39	2.17
AcOEt	2.853	1.83
MeOH	31.865	20.43

8.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

A pesar que se evaluaron los extractos de vismia y tepozán en concentraciones en un amplio rango (1–1000 µg/mL) no se observó en ninguno de los casos un efecto inhibitorio contra la bacteria *P. aeruginosa* (Fig.14).

En este modelo se logro apreciar que los extractos de diclorometano–metanol de vismia y tepozán afectan la produccion de pigmentos por parte de la bacteria. Dado que esto no formo parte de los objetivos del presente trabajo, no se evaluó con mayor detalle este aspecto. Ya que los extractos de ambas especies (vismia y tepozán) no tuvieron un efecto inhibitorio contra esta bacteria bajo las diferentes concentraciones usadas, ni se observo una tendencia dosis respuesta, se decidio no seguir evaluando mas extractos en este modelo ni con otras bacterias.

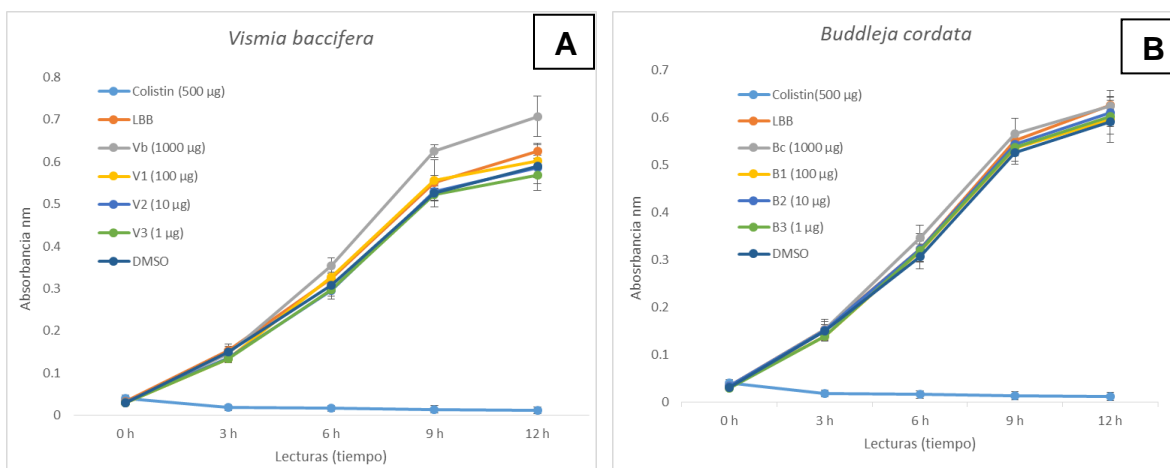


Figura 14. Actividad antibacteriana de vismia (A) y tepozán (B) a diferentes concentraciones (1 a 1000 µg/mL) contra *P. aeruginosa* graficado con respecto al tiempo (0, 3, 6, 9 y 12 h). Como control + se uso colistina, como controles negativos el vehiculo DMSO y el medio LB con bacteria (LBB). DO= 0.025 y UFC= 2.38 X 10⁹ en 10µL. Ninguna de las especies en las concentraciones evaluadas tuvo un efecto inhibitorio contra la bacteria. N= 6, datos graficados, promedio de absorbancias con ± DE.

Estos resultados no fueron los esperados, ya que existen estudios sobre la actividad antimicrobiana del genero *Vismia*. Entre ellos Lopez *et al.*, 2001 demostraron que el extracto de la corteza de *Vismia macrophylla* presentó actividad contra *Mycobacterium phlei* mientras que Gómez-Cansino *et al.*, 2015 reportaron que el extracto de hojas de *V. baccifera* tuvo actividad contra *M. tuberculosis*. Se ha evaluado la actividad antibacteriana de compuestos aislados de este genero como en el trabajo de Salas *et al.*, 2006 donde la sesamina, friedelina y vismiaquinona aislados de *V. baccifera*, tuvieron efectividad contra *S. aureus* y *E. faecalis*. De acuerdo con Kuete *et al.*, 2007 una de las especies con

mayor actividad antibacteriana es *V. laurentii* al resultar efectivos los extractos metanólicos contra varias bacterias Gram negativas y positivas, así como dos levaduras (*Critobacter freundii*, *Enterobacter aerogens*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *Salmonella tphi*, *Strptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. steareothermophilus*, *B. subtilis*, *Candida albicans* y *C. gabrata*). Por su parte Nuñez *et al.*, 2013 evaluaron los extratos y fracciones de *V. guianensis* contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*, resultando efectivos. Por su parte Zacaria *et al.*, 2004 demostraron la actividad de los extractos etanólicos de los frutos de *V. orientalis* contra protozoarios, como *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*. Menán *et al.*, 2006 evaluaron la Vismiona H aislada de *V. guianensis* resultando efectiva contra la malaria. Mientras que Valadeau *et al.*, 2009 evaluaron la infusión de hojas de *V. pozuzoensis* y *V. baccifera* encontrando un efecto citotóxico de estas contra la malaria y leishmania. Otras especies efectivas contra *Leshmania amazonensis* fueron *V. tomentosa*, la corteza de *V. baccifera* y la infusión de hojas de *V. pozuzoensis* reportadas por Vizcaya *et al.*, 2012, Salas *et al.*, 2007 y Nuñez *et al.*, 2013 respectivamente. Estos reportes sugieren que dentro del género *Vismia* existen compuestos con un amplio espectro de inhibición contra diversos microbios (protozoarios, bacterias y hongos).

En el trabajo de Salas *et al.*, 2007 se reportó la actividad inhibitoria del extracto etanólico de *V. baccifera* contra *P. aeruginosa* en un ensayo de difusión en agar, donde se encontró que inhibe 8 mm el crecimiento de la bacteria y tuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de 4 mg/mL. Para el caso de *V. guianensis* Nuñez *et al.*, 2013 obtuvieron una MIC de 4 y 7 µg/mL en el mismo modelo y con la misma bacteria. Nosotros evaluamos concentraciones por debajo de estos valores, quizá por ello no se obtuvo un efecto inhibitorio contra esta bacteria. Además, el modelo que usaron fue de difusión en agar, mientras que el nuestro fue por microdilución por lo que sugerimos para posteriores estudios,

evaluar concentraciones mas altas a las que se probaron y determinar si con nuestro modelo se obtienen MIC similares a las reportadas. A pesar de que nosotros no encontramos una actividad inhibitoria contra esta bacteria, la literatura sugiere que el genero *Vismia* contiene compuestos potencialmente utiles para el tratamiento de heridas infectadas o para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Igualmente existen antecedentes de la actividad antimicrobiana del genero *Buddleja*. Farman *et al.*, 2011 mencionan que *B. asiatica* tuvo actividad inhibitoria contra once bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Stemostoma boydi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. maltophilia*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium leprae*) y actividad antifungica contra seis cepas (*Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *C. glaberata*, *Microsporium canis* y *Trichophyton longifusus*). Houghton *et al.*, 2003 demostro la actividad antifungica de la buddledina A y de los extractos de cloroformo de *B. cordata* y *B. davidii* contra *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton interdigitale*, *Fusarium culmorum* y *Sordaria fimicola*. Ademas Mohammed *et al.*, 2016 demostraron que *B. polystachya* tuvo actividad antiplasmodium, esta actividad tambien fue reportada para *B. saligna* por Chukwujekwu *et al.*, 2014. De acuerdo a la literatura podemos decir que el genero *Buddleja* tambien cuenta con un amplio espectro de inhibición contra microbios como el que presenta el genero *Vismia*. Sin embargo, existen pocos trabajos que evaluan la actividad antibacteriana, por lo que se sugiere para proximos estudios evaluar otras bacterias y en concentraciones mayores.

Como ya se mencionó Farman *et al.*, 2011 demostraron la efectividad del extracto metanólico de *B. asiatica* contra *P. aeruginosa* a una dosis de 1 mg/mL en el modelo de difusion en agar. Nosotros evaluamos la misma dosis del extracto de diclorometano-metanol de *B. cordata* en el modelo de microdilucion encontrando un efecto contrario al reportado en el 2011. La contradiccion entre los resultados posiblemente se deba a que fueron evaluados extractos de diferente polaridad, lo

cual conlleva a una diferencia en la composición química entre ellos. También es importante recordar que aunque ambas plantas están incluidas en el mismo género, son especies diferentes. Otro aspecto es la diferencia entre los métodos usados (uno por difusión y el nuestro por microdilución) lo cual puede arrojar variación en los resultados.

Como ya se había mencionado antes, dado que se obtuvieron resultados negativos en este modelo se decidió no evaluar más extractos orgánicos de ninguna de las dos especies.

8.3 CITOTOXICIDAD *in vitro* DE VISMIA Y TEPOZAN (MTT)

Ninguno de los tratamientos a diferentes dosis con los extractos de vismia y de tepozán tuvo un efecto citotóxico sobre fibroblastos humanos (Fig.15).

Para estos experimentos se consideró un efecto estadísticamente significativo positivo, aquel tratamiento que incentivara la actividad mitocondrial de los fibroblastos, más allá de lo producido con respecto al control de medio DMEM. Se considerara alguno de los tratamientos citotóxico, aquel que afecte más del 50% de los fibroblastos metabólicamente activos con respecto al control con medio DMEM (Riss *et al.*, 2016).

En los gráficos A y B podemos observar que los controles usados no tuvieron efectos positivos estadísticamente significativos y tampoco presentaron un efecto citotóxico. A pesar de que el Recoveron sí presentó un efecto significativo negativo, no es citotóxico pues no afectó a más del 50% de las células.

Se encontró que solo a las 48 h hubo diferencias positivas estadísticamente significativas por parte del extracto de vismia en dos de sus concentraciones (50 y 100 µg/mL). Aunque el extracto de tepozán (a las 24 h) presentó un efecto

negativo estadísticamente significativo a 100 µg/mL no es citotóxico, pues tampoco produce la muerte celular más allá del 50 % de los fibroblastos.

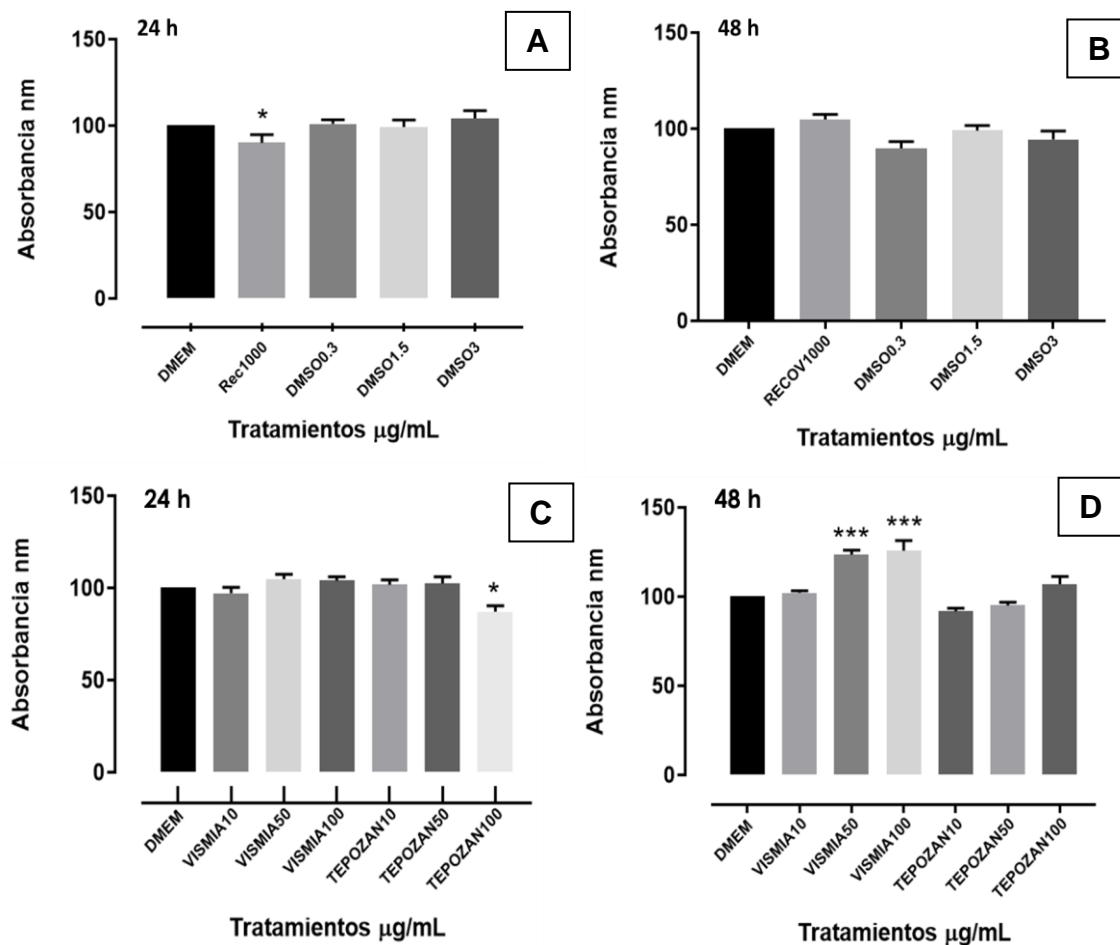


Figura 15. Citotoxicidad con extractos de vismia y tepozán. A y B corresponden a los datos de los controles DMEM, Recoveron y DMSO. Dado que no hubo diferencias significativas positivas entre los controles, se decidió analizar estadísticamente los tratamientos de vismia y tepozán con respecto al medio DMEM. **C y D** datos de los tratamientos de vismia y tepozán a diferentes concentraciones. Todos los datos fueron normalizados con respecto al DMEM. N= 6, datos de absorbancia promedio y ± EE. Datos analizados con GraphPad Prism 7.03 con ANOVA de una vía y comparación de Dunnett's. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Ningún tratamiento es tóxico.

8.4 ACTIVIDAD CICATRIZANTE *in vitro* DE VISMIA Y TEPOZAN

El extracto de tepozán (*B. cordata*) presentó un efecto cicatrizante a 24 y 48 h en las concentraciones de 50 y 10 µg/mL respectivamente (Fig.16).

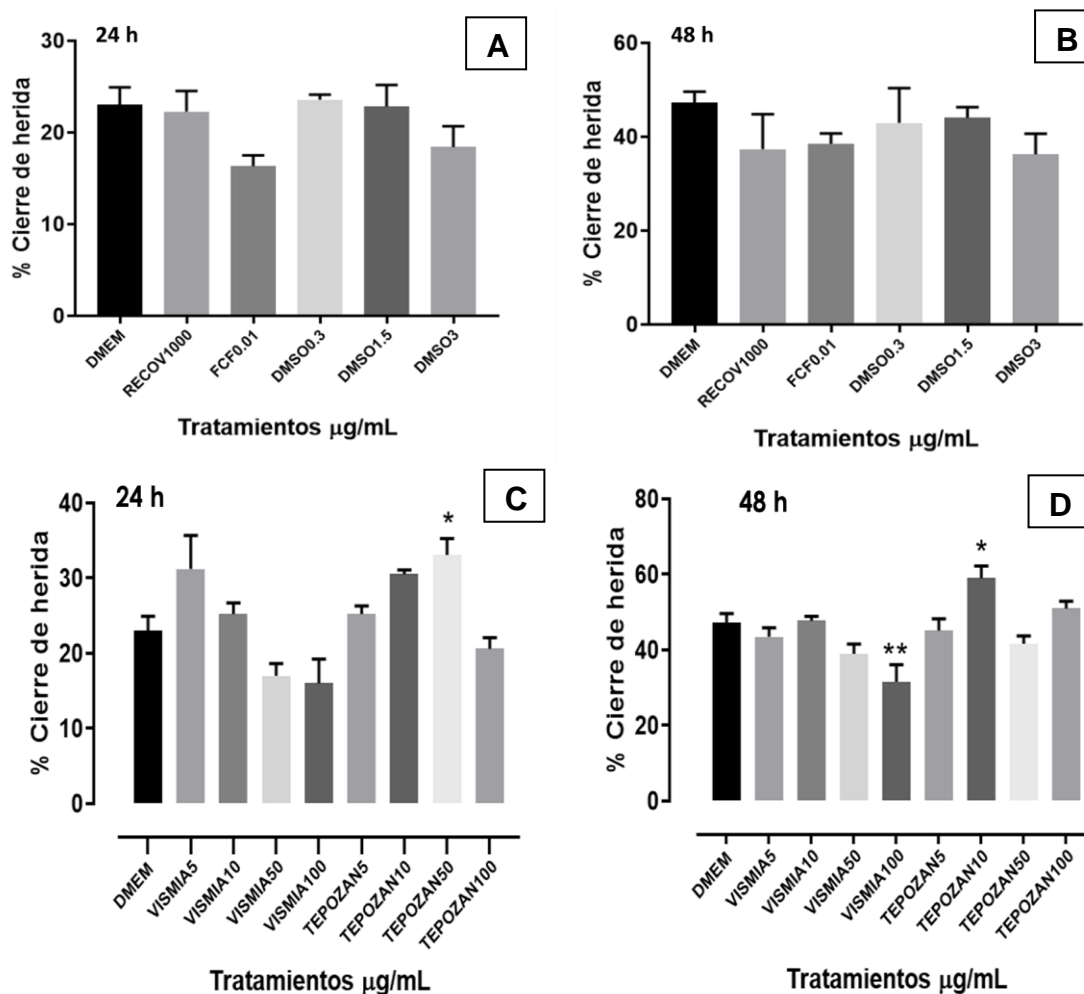


Figura 16. Cierre de herida con extractos de vismia y tepozán. A y B datos del cierre de herida de los controles usados DMEM, Recoveron, Factor de Crecimiento de Fibroblastos y DMSO, dado que no se encontraron diferencias significativas entre ellos, se decidió analizar estadísticamente los datos del cierre de la herida por parte de los tratamientos de vismia y tepozán con respecto a los valores de DMEM. C y D datos del cierre de herida por parte de los extractos de diclorometano–metanol de vismia y tepozán. A las 24 y 48 h resultado significativo el extracto de tepozán (50 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente). El extracto de vismia a 100 µg/mL fue significativo a las 48 h aunque no incentiva el cierre de la herida. N= 3, promedio del porcentaje del cierre de las heridas y ± EE. Todos los datos se analizaron con GraphPad Prism 7.03 con ANOVA de una vía y comparación de Dunnett's. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

En este modelo es importante señalar que se consideró un efecto positivo estadísticamente significativo, cuando el tratamiento incentiva el cierre de la herida más allá de lo producido en presencia del medio de cultivo DMEM. Un tratamiento con un efecto negativo estadísticamente significativo, es aquel que no contribuye a acelerar el cierre de la herida *in vitro* respecto del control positivo. También es importante mencionar que existen casos en los que un tratamiento no tenga un efecto positivo significativo, pero que sí presente el mismo efecto que el DMEM.

Para estos ensayos se evaluaron diferentes controles, el medio DMEM complementado, el fármaco Recoveron, un Factor de Crecimiento de Fibroblastos, así como algunas dosis de DMSO usadas para disolver los extractos. Ninguno de ellos resultó con diferencias significativas al ser analizados estadísticamente.

A las 24 h el extracto de vismia presentó un efecto dosis dependiente, donde a la menor dosis (5 µg/mL) tiene el mayor efecto positivo y este disminuye conforme se aumenta la concentración. Para el caso del extracto de tepozán, también se observa un efecto dosis dependiente en forma de campana, donde los menores efectos están en las dosis más bajas y más altas (5 y 100 µg/mL) y el mayor efecto se encuentra en una concentración intermedia (50 µg/mL) resultando esta última con diferencia significativa positiva con respecto al control DMEM.

A las 48 h se observa una tendencia de campana para ambas especies (menor efecto en dosis baja y alta y mayor efecto a dosis intermedias). El extracto de vismia, presento un efecto negativo significativo respecto del control positivo y no ayuda al cierre de la herida bajo ninguna de las concentraciones evaluadas. El extracto de tepozán en la concentración de 10 µg/mL tuvo una diferencia significativa positiva al incentivar el cierre de la herida, más allá de lo que ocurrió de manera normal con DMEM.

Dado que el extracto de tepozán fue significativo a 24 y 48 h en las concentraciones de 50 y 10 µg/mL respectivamente, se eligió a esta especie para continuar con el estudio biodirigido, planteado en este presente proyecto.

8.5 CITOTOXICIDAD *in vitro* DE EXTRACTOS DE TEPOZAN (MTT)

Ninguno de los tratamientos con los extractos de diferente polaridad de tepozán, presentó un efecto citotóxico sobre fibroblastos humanos (Fig.17).

En estos ensayos se consideró un efecto positivo estadísticamente significativo el tratamiento que incentivó la actividad mitocondrial de los fibroblastos, más allá de lo producido de manera normal con respecto del medio DMEM. Se consideró citotóxico, el tratamiento que afecto la actividad metabólica en más del 50% de los fibroblastos con respecto del medio DMEM (Riss *et al.*, 2016).

Solo a las 48 h hubo diferencias estadísticamente significativas negativas por parte de los extractos de hexano (5 µg/mL), acetato de etilo (10µg/ml) y metanol (50 µg/mL). Ninguno de ellos es citotóxico pues no afecta a más del 50% de los fibroblastos humanos.

En los gráficos podemos observar que entre los controles usados no hubo efectos positivos estadísticamente significativos. Ninguno de los controles tuvo un efecto citotóxico. A pesar de que el DMSO en la menor concentración (0.55 µg/mL) presentó un efecto negativo significativo, este no afecta a más del 50% de los fibroblastos con respecto del medio complementado DMEM por lo que tampoco es citotóxico.

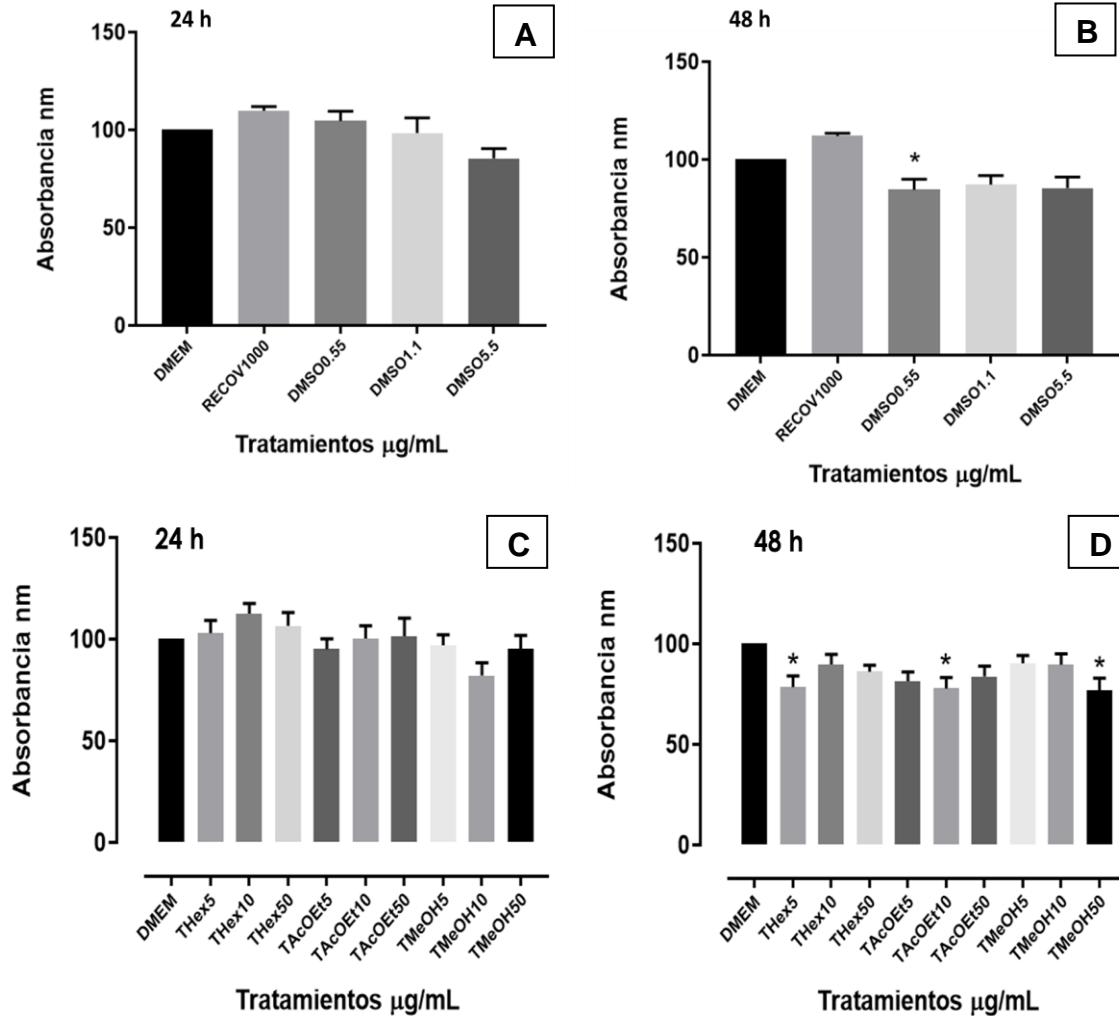


Figura 17. **A y B** datos correspondientes a los controles DMEM, Recoveron y DMSO. Dado que no hubo diferencias significativas positivas entre los controles, se decidió analizar estadísticamente los tratamientos de los extractos de Tepozán con respecto al medio DMEM. **C y D** datos de los tratamientos de los extractos de diferente polaridad de Tepozán a diferentes concentraciones. Todos los datos fueron normalizados. N= 6, promedio de absorbancia ± EE. Datos analizados con GraphPad Prism 7.03 con ANOVA de una vía y comparación de Dunnett's. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Ningún tratamiento es tóxico.

De acuerdo a los resultados obtenidos por los controles y los tratamientos de los extractos de diferente polaridad de tepozán (*B. cordata*) podemos decir que ninguno de ellos presenta un efecto citotóxico sobre fibroblastos humanos.

8.6 ACTIVIDAD CICATRIZANTE *in vitro* DE EXTRACTOS DE TEPOZAN

En los experimentos a 24 h ningún tratamiento incentivó el cierre de la herida, sin embargo a las 48 h el extracto de metanol de tepozán a 10 $\mu\text{g/mL}$ tuvo un efecto positivo (Fig.18).

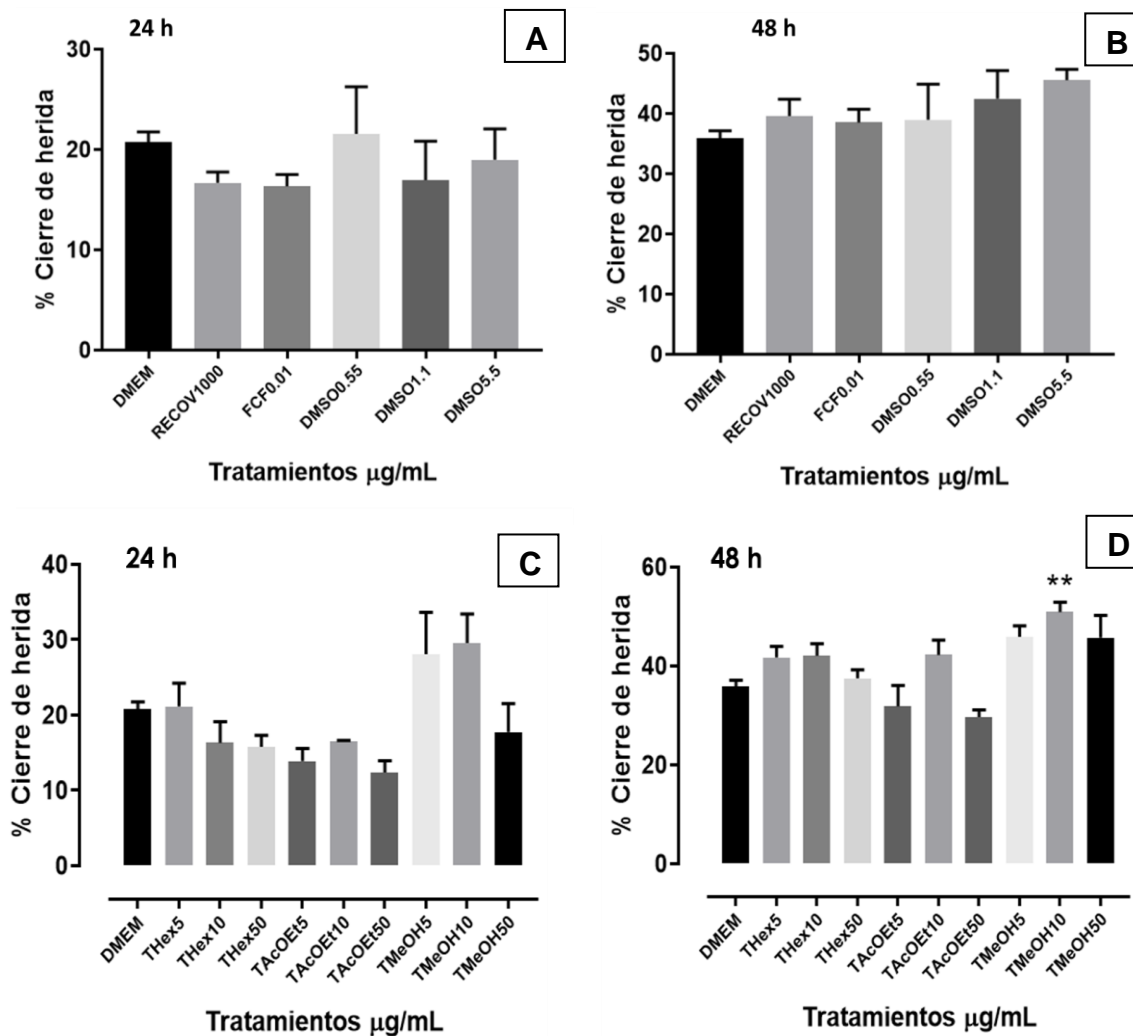


Figura 18. A y B datos del cierre de herida de los controles usados DMEM, Recoveron, Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FCF) y DMSO. No se encontraron diferencias significativas entre ellos, por lo que se decidió analizar estadísticamente los datos del cierre de la herida de los extractos de tepozán con respecto al DMEM. C y D cierre de la herida por parte de los extractos de diferente polaridad de tepozán. A las 24 h ninguno de los tratamientos incentivo el cierre de la herida. A las 48 h el extracto de metanol a la dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$ resulto estadísticamente significativo. N= 3, promedio del porcentaje del cierre de las heridas y \pm EE. Todos los datos se analizaron con GraphPad Prism 7.03 con ANOVA de una vía y comparación de Dunnett's. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Como ya se mencionó antes, se consideró con efecto positivo, aquel tratamiento que incentivo el cierre de la herida más allá de lo producido por el control con DMEM. Un efecto negativo fue el tratamiento que no incentivo el cierre de la herida *in vitro* con respecto al control positivo.

Para estos ensayos se evaluaron varios controles sin embargo ninguno de ellos resultó con diferencias significativas respecto del DMEM al ser analizados estadísticamente (Grafico A y B).

Los extractos orgánicos de tepozán (hexano, acetato de etilo y metanol) solo se evaluaron en tres de las cuatro concentraciones antes evaluadas (5, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$) ya que en la dosis más alta (100 $\mu\text{g/mL}$) se observó una disminución de la actividad por parte de vismia y tepozán. En los gráficos C y D se observa que el extracto de hexano tiene un efecto dosis-dependiente, donde a menor concentración (5 $\mu\text{g/mL}$) se obtiene el mayor efecto y este disminuye al aumentar la concentración (50 $\mu\text{g/mL}$). En los extractos de acetato de etilo y metanol se observa un efecto de campana, donde la menor y la mayor concentración (5 y 50 $\mu\text{g/mL}$) tienen el menor efecto, mientras que la dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$ tiene el mayor efecto.

De acuerdo a la literatura, existen algunos estudios donde utilizan el mismo modelo para evaluar el potencial como agente cicatrizante *in vitro*. Tal es el caso de Dinda *et al.*, 2016 quienes demostraron que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* estimuló la proliferación de fibroblastos y ayudó a la regeneración de heridas *in vitro* e *in vivo*, en un intervalo de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ siendo la concentración de mayor actividad la de 100 $\mu\text{g/mL}$. En otro estudio Tonin *et al.*, 2016 evaluaron el extracto de metanol de *Rubus imperialis*, demostrando su efecto cicatrizante *in vitro*, en las dosis de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ y resultando la de mayor efectividad la de 10 $\mu\text{g/mL}$. En otro estudio similar Lee *et al.*, 2016 evaluaron el efecto cicatrizante *in vitro* por parte del extracto de metanol de *Piper cambodianum* en las dosis de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ siendo el más efectivo a 10 $\mu\text{g/mL}$. Comparando

nuestros resultados con los de la literatura, encontramos que los extractos que fueron activos corresponden a los de mayor polaridad, donde podemos encontrar a los compuestos fenólicos.

Bajo este contexto, nosotros encontramos que el extracto de diclorometano–metanol de *Buddleja cordata* fue activo a las 24 h en la dosis de 50 µg/mL, mientras que a las 48 h lo fue en la dosis de 10 µg/mL. Para el caso de los extractos de diferente polaridad del tepozán, el extracto que resulto activo fue el de metanol a las 48 h en la concentración de 10 µg/mL, estos resultados se encuentran dentro de las concentraciones que resultan activas en otras especies reportadas. Sin embargo, es importante aclarar que aunque se utilizó el mismo modelo (scratch) existen algunas variaciones entre ellos.

Una de las variaciones corresponde a los tiempos, en los trabajos antes mencionados se evalúa el potencial cicatrizante solo a las 24 h mientras que nosotros evaluamos a las 24 y 48 h lo cual nos permitió evaluar el efecto con respecto al tiempo. Otra de las diferencias en los métodos es el análisis de las fotografías tomadas, pues en los trabajos mencionados, analizan el cierre de la herida mediante el movimiento que presentan los fibroblastos con respecto a la herida hecha, sin tomar en cuenta los espacios que se van generando por el mismo proceso; mientras que en nuestro estudio se analizan las fotografías tomando en cuenta el movimiento de las células, pero además considerando los espacios que se forman.

En los trabajos de *Caléndula* y *Rubus* no especifican el tipo de punta con la cual se simula la herida. Solo en el trabajo de *Piper* mencionan que lo hicieron con una punta de 10 µL mientras que nosotros utilizamos una punta de 1000 µL. Este último aspecto tiene un gran impacto en el cierre de una herida, pues con una punta pequeña la herida es más delgada y por tanto cierra en menos tiempo, mientras que con una punta más grande (como en nuestro caso) entonces la herida es más ancha por lo que requiere más tiempo para cerrarse. A partir de

estas diferencias, en el caso de *Rubus* los autores mencionan un cierre de herida de más del 60% al día uno (24 h) mientras que para *Caléndula* mencionan un cierre del 25%. Nosotros encontramos un cierre de herida de un 20 a 30% en el mismo tiempo.

Por otra parte, existe un trabajo de Mensah *et al.*, 2001 donde a partir del extracto acuoso de hojas de *Buddleja globosa*, evaluaron el potencial de proliferación de fibroblastos mediante el ensayo con rojo neutral. Encontrando que a bajas concentraciones del extracto (0.1, 1 y 10 µg/mL) aumenta la absorbancia por lo que concluyeron que esta especie ayuda a la proliferación celular, mientras que a dosis mayores (100 µg/mL) tiene un efecto tóxico aunque ninguno de los resultados fueron estadísticamente significativos. Este resultado concuerda con lo que nosotros encontramos, pues el extracto de diclorometano-metanol y el de metanol de *B. cordata* fueron activos en la concentración de 10 µg/mL.

En el mismo trabajo de Mensah *et al.*, 2001 encontraron que en la concentración de 5 µg/mL el extracto tuvo un efecto antioxidante significativo, así como sus compuestos (2.5 µg/mL). En comparación con nuestro trabajo, ninguna de las concentraciones evaluadas mediante MTT resultaron tóxicas, quizá esto se deba a una diferencia en la composición química de las plantas, pues aunque corresponden a especies dentro del mismo género, pueden presentar compuestos diferentes, o incluso los mismos, pero en diferente concentración.

8.7 EVALUACION DE LA PRODUCCION DE COLAGENA I DE LOS EXTRACTOS

Ninguno de los tratamientos tanto de vismia, tepozán y los extractos de diferente polaridad de tepozán incentivó la producción de colágena I, mediante un análisis cualitativo (Fig. 19 y 20).

En los ensayos para evaluar la producción de colágena I encontramos que en algunos de los tratamientos, se observó la presencia de la colágena I (verde) aunque no en todos los casos se presentó en forma de red. De manera cualitativa ninguno de los tratamientos incentivó la producción de esta proteína, más allá de lo producido de manera normal con respecto al medio DMEM. Sin embargo, el tratamiento de Vismia5 muestra un efecto muy similar al del control con DMEM. También es importante mencionar que los controles de DMSO no tienen un efecto sobre la síntesis de esta proteína por parte de los fibroblastos.

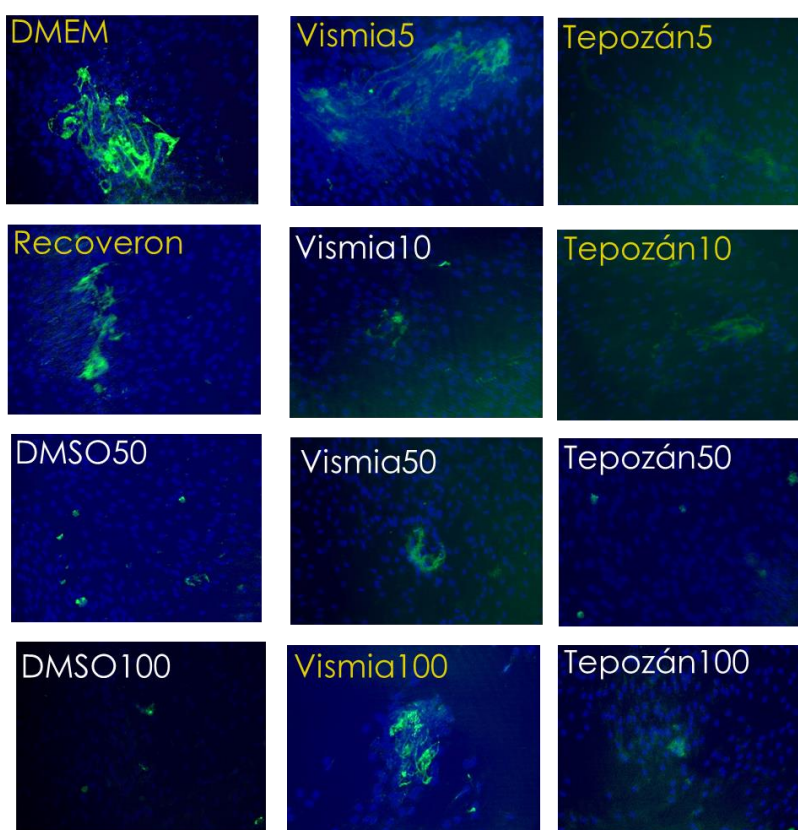


Figura 19. Contenido de colágena I a las 48 h en fibroblastos tratados con extractos de diclorometano–metanol de vismia y tepozán. Como controles se usó DMEM, Recoveron y DMSO. Tramientos a 5, 10, 50 y 100 µg/mL. En azul se observan los núcleos y en verde se distingue la matriz de colágena. Cualitativamente, el medio DMEM y Vismia5 presentan el mayor contenido de colágena I, seguido por el Recoveron, Vismia100 y finalmente Tepozán5 y 10. Ninguno de los tratamientos incentivó la producción de colágena I. Fotografías obtenidas en microscopio invertido de fluorescencia con programa AxioVision a 20X.

Existe una patente vencida para especies del genero *Vismia* donde se menciona que el extracto de corteza de metanol y el hidroalcohólico de frutos en una concentración de 10 y 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (respectivamente) estimulan la síntesis de colágeno I en fibroblastos humanos. Sin embargo, nosotros no encontramos este efecto al evaluar el extracto de diclorometano-metanol de hojas de *Vismia baccifera*. Esto puede tener dos explicaciones, la primera de ellas es que los compuestos responsables de dicha actividad estén presentes en corteza y frutos (patente) y no en hoja o bien que la especie de vismia estudiada en la patente corresponda a otra del mismo género. Se sugiere para estudios posteriores, evaluar los extractos obtenidos de otros órganos y de otras especies del género *Vismia*.

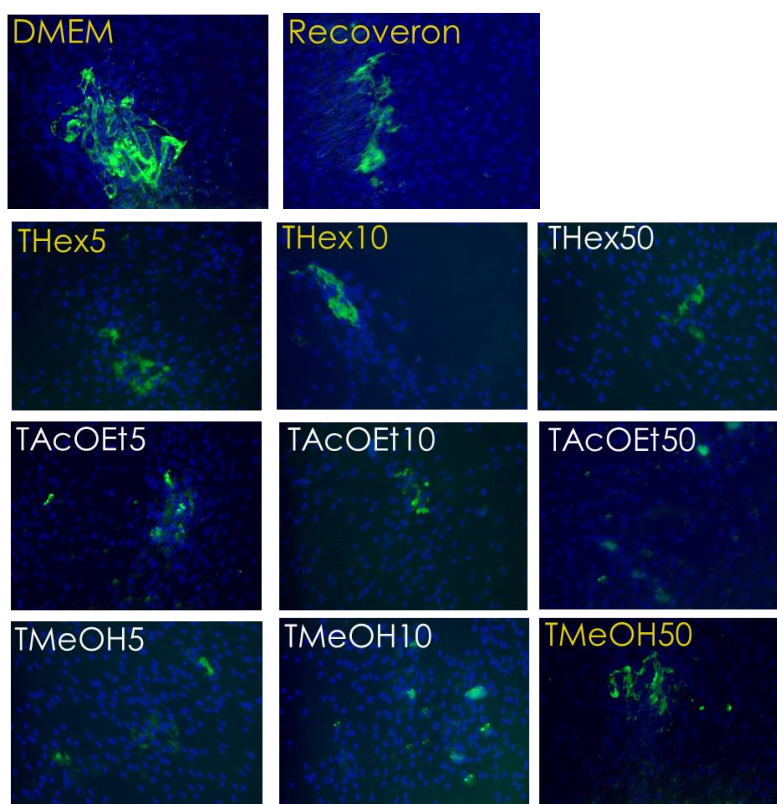


Figura 20. Contenido de colágeno I a las 48 h en células pre tratadas con extractos de diferente polaridad de tepozán (Hex, AcOEt y MeOH) evaluados a 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como controles se usó DMEM, Recoveron y DMSO. En color azul se observan los núcleos y en verde la matriz de colágena. Cualitativamente el medio DMEM presentó el mayor contenido de colágena I, seguido por el Recoveron, THex5, THex10 y TMeOH50. Ningún tratamiento incentivó la producción de la proteína más allá de lo producido por el DMEM. Fotografías obtenidas en microscopio invertido de fluorescencia con programa AxioVision a 20X.

En los ensayos con los extractos de diferente polaridad de tepozán (Fig.20) se encontró que en dos concentraciones del extracto de hexano (5 y 10 µg/mL) y la más alta del extracto de metanol (50 µg/mL) los fibroblastos presentan colágena I en forma de red, aunque el efecto es muy similar al observado con el Recoveron. En ambos casos la producción de colágena fue menor a la producida de manera normal por los fibroblastos incubados en DMEM. En el resto de los tratamientos, el contenido de colágena I es mínimo. Por lo tanto, podemos decir que ninguno de estos tratamientos, incentiva la producción de dicha proteína.

En la cicatrización las etapas de reepitelización y angiogénesis, así como todo el proceso que se lleva a cabo para la formación de la matriz extracelular, debe ser modulado para evitar alteraciones en el tejido y la formación de cicatrices de tipo queloides (Bustamante *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012). Tomando en cuenta esto, encontramos que en los gráficos del cierre de herida el error estándar (EE) de los controles usados, es mayor al de los extractos. Lo cual nos sugiere que los extractos ayudan a las células a actuar de manera controlada. Por lo que a pesar de que ninguno de los tratamientos incentivó la síntesis de colágena I, no significa que no tenga un efecto sobre ella. Quizás al actuar de manera más controlada en todo el sistema (herida) también lo hacen regulando la síntesis de colágena. Por lo tanto, se sugiere en estudios posteriores, evaluar la producción de colágena en un mayor lapso de tiempo, corroborando que se incremente de forma gradual la producción de esta proteína.

8.8 ENSAYO DE MITOMICINA C (MIGRACION CELULAR)

Ninguno de los extractos evaluados presentó un efecto significativo incentivando la migración de los fibroblastos humanos, a pesar de que solo se evaluaron las dosis que produjeron un efecto positivo en experimentos previos con el modelo de herida *in vitro* (Fig.21).

Se logró apreciar que el tratamiento TMeOH10 (extracto de metanol de tepozán a 10 µg/mL) presentó un efecto similar al del control positivo con DMEM aunque dicho efecto no fue estadísticamente significativo. Lo cual nos indica que este tratamiento si tiene un efecto sobre este mecanismo.

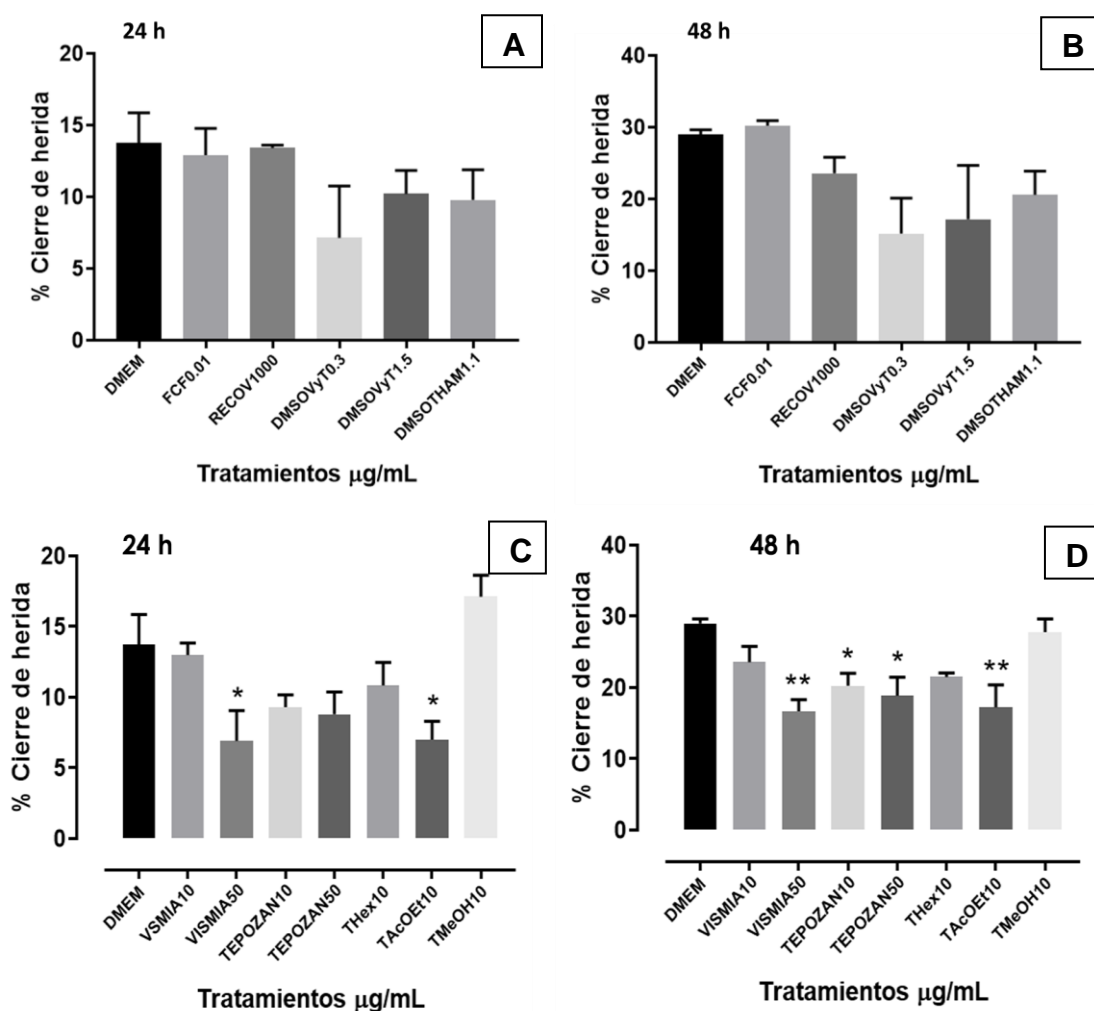


Figura 21. Cierre de herida usando fibroblastos mitomizados. A y B cierre de herida de los controles usados DMEM, Recoveron, FCF y DMSO, al no encontrar diferencias significativas entre ellos se decidió analizar estadísticamente los datos del cierre de la herida con respecto al DMEM. Se evaluaron los extractos de diclorometano–metanol y los extractos de diferente polaridad de tepozán en las dosis que resultaron activas, en los ensayos con fibroblastos normales. **C y D** cierre de herida de los tratamientos. En los dos tiempos no hubo diferencias positivas estadísticamente significativas. Pero se aprecia en ambos tiempos que TMeOH10 tiene un efecto similar al del control con DMEM. N= 3, promedio de los porcentajes del cierre de las heridas y ± EE. Datos analizados con GraphPad Prism 7.03 con ANOVA de una vía y comparación de Dunnett´s. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

De acuerdo a la literatura la mitomicina C puede afectar la viabilidad de fibroblastos induciendo apoptosis, esto se ha demostrado a la concentración de 40 y 100 µg/mL dejando actuar la mitomicina C por 5 min (Chen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). En otro estudio se empleó mitomicina C para inhibir la proliferación celular a 5 µg/mL incubando por 2 h las monocapas, sin embargo, el análisis de las fotografías es menos certero, al solo guiarse por el movimiento de los fibroblastos sin tomar en cuenta los espacios generados (Shikatani *et al.*, 2012). A pesar de que nosotros dejamos actuar la mitomicina a 10 µg/mL (dosis menor a la toxica) sobre los fibroblastos, el tiempo que se dejó en incubación fue de 3 h esto pudo haber producido algún efecto negativo en las células, lo cual pudo alterar su fisiología y por ello ninguno de los tratamientos resulto significativamente positivo.

8.9 ENSAYO DE BrdU (PROLIFERACION CELULAR)

Al evaluar este mecanismo de acción, encontramos de manera cualitativa que ninguno de los tratamientos incentivó la proliferación celular más allá de lo producido de forma normal con respecto al control con DMEM (Fig. 22 y 23).

Podemos observar que los controles positivos (DMEM, FCF y Recoveron) sí presentaron células en división celular. Los controles de DMSO no tienen células en proliferación. Los extractos de vismia y tepozán tienen algunas células en división, siendo el tratamiento de Tepozán50 en el que se aprecia un mayor número de estas células. A pesar de esto, la proporción de células en división de los tratamientos con los extractos es menor al que se encontró en el control positivo DMEM. Por lo tanto, ninguno de estos tratamientos incentivó significativamente la proliferación de los fibroblastos.

En cuanto a los extractos de diferente polaridad de tepozán, se apreció que el extracto de acetato de etilo y el de metanol, contienen células en división, sin

embargo, estos extractos tampoco incentivan la división celular más allá de lo que se lleva a cabo de forma normal con el medio DMEM.

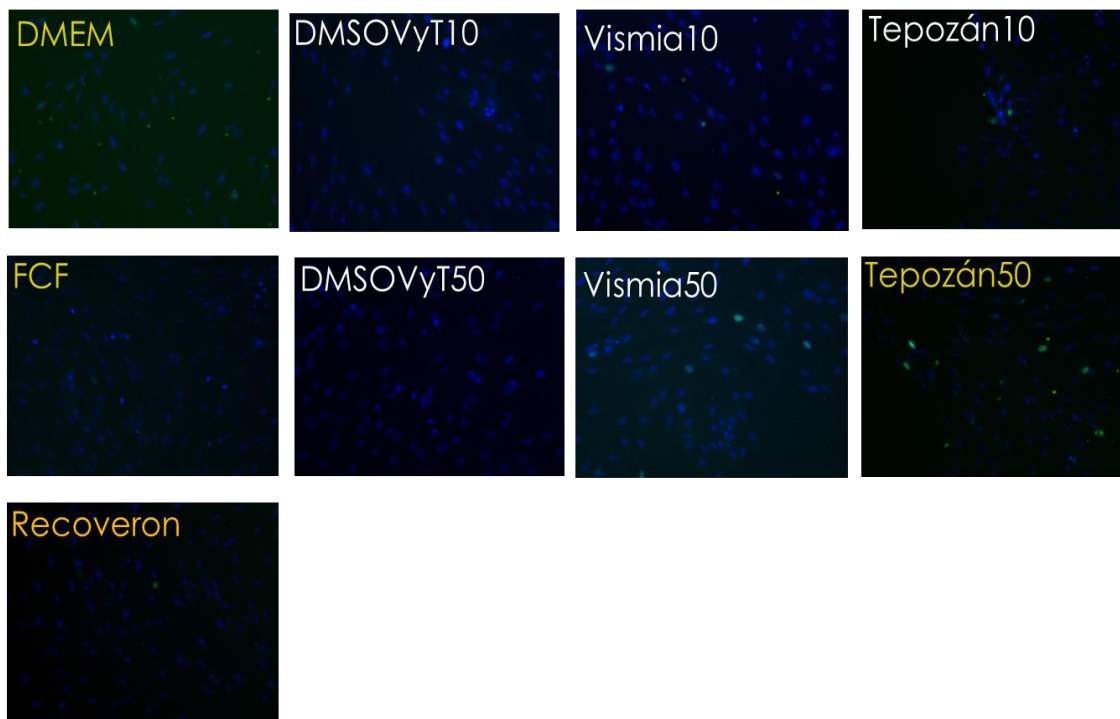


Figura 22. Ensayo de BrdU para determinar si alguno de los extractos orgánicos de diclorometano–metanol de vismia y tepozán incentivó la proliferación celular de fibroblastos humanos. Como controles se usó medio DMEM, el FCF, Recoveron y DMSO. Los extractos se evaluaron solo en las concentraciones que resultaron efectivas (10 y 50 µg/mL) en el modelo de herida *in vitro*. En color azul, se observan los núcleos y en color turquesa o azul brillante células en división celular. Cualitativamente el medio DMEM presenta mayor número de células en división celular, seguido por el FCF, el Recoveron y el extracto de Tepozán50. Ninguno de ellos incentiva la proliferación más allá de lo que se produce de manera normal (DMEM).

La mayoría de los estudios evalúan la incorporación de este análogo de timidina a nivel histológico mediante inmunotinciones de tejidos y existen pocos trabajos donde se evaluó la incorporación de BrdU en cultivos celulares tratados con extractos de plantas. En el 2016, Dinda y colaboradores, evaluaron la actividad proliferativa de los extractos orgánicos de *Calendula officinalis* mediante el mismo ensayo sin embargo ellos hicieron un análisis cuantitativo, donde a partir del número total de células se conoce cuantas de ellas se encuentran en división celular. Nosotros, hicimos un análisis cualitativo, esto no sugiere que el resultado

sea completamente erróneo, pero no, es del todo exacto. Simplemente es un primer acercamiento. Por ello se sugiere realizar los conteos celulares de cada fotografía y por tratamiento para determinar cuantitativamente, si alguno de los tratamientos incentiva la proliferación celular de los fibroblastos.

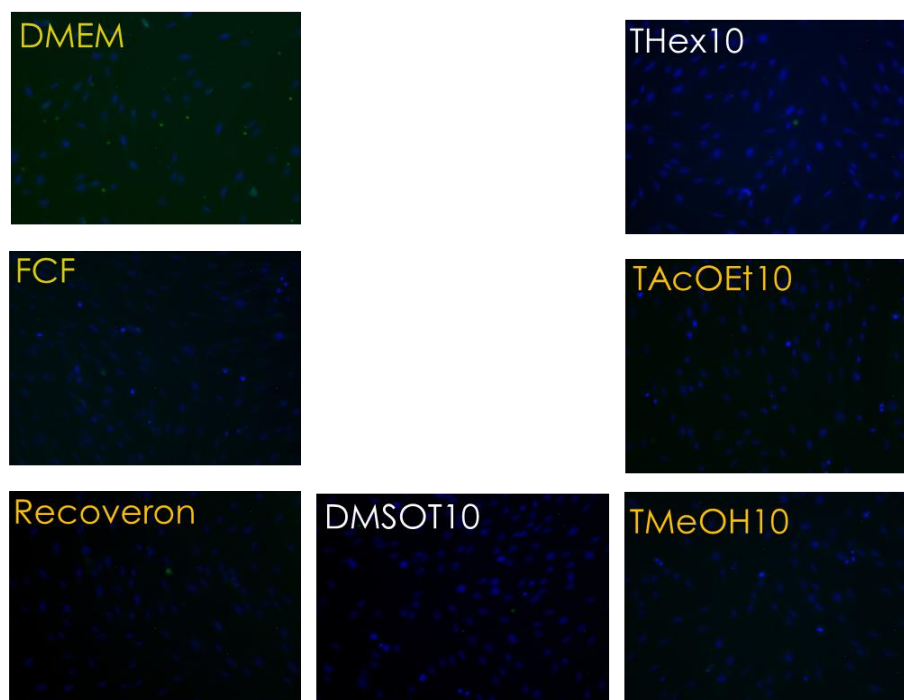


Figura 23. Ensayo de BrdU para determinar si alguno de los extractos orgánicos de diferente polaridad de tepozán incentivó la proliferación celular de fibroblastos humanos. Como controles se usó medio DMEM, el FCF, Recoveron y DMSO. Los extractos de diferente polaridad de tepozán se evaluaron en una concentración (10 µg/mL). En color azul se observan los núcleos y en color turquesa o azul brillante las células en división celular. Cualitativamente el medio DMEM presentó mayor número de células en división celular, seguido por el FCF, el Recoveron y los extractos de TAcOEt10 y TMeOH10. Ninguno de ellos incentiva la proliferación más allá de lo que se produce de manera normal (DMEM).

9. QUIMICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE TEPOZAN

El extracto de metanol de hojas de tepozán (*B. cordata*) tiene como compuesto mayoritario al verbascosido, además contiene azúcares, como la sacarosa y el manitol.

En esta sección, solo se mostrarán los resultados más relevantes. El extracto metanólico de *B. cordata* analizado por CCCF no mostró una buena separación, sin embargo al analizarlo por HPLC se encontró un pico mayoritario a los 27.742 min y con 68.40% de abundancia así como otros 17 picos minoritarios de los cuales tres de ellos están entre los 1.742 y 2.230 minutos y los otros 14 picos se encuentran entre los 27.271 y 30.847 minutos (Fig.24).

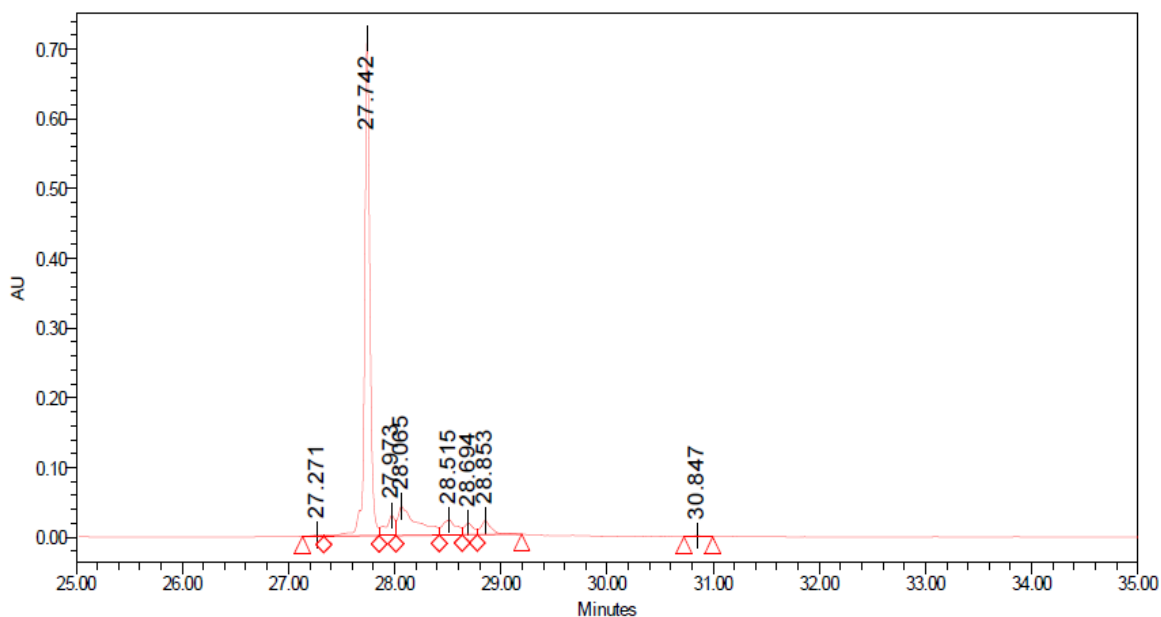


Figura 24. Cromatograma de HPLC del extracto de metanol de Tepozán. Se observa un pico mayoritario a 27.742 min de retención y 68.40% de abundancia.

El pico mayoritario no correspondió en su tiempo de retención y espectro de UV con ninguno de los estándares (ácidos ferúlico, sinápico, cumárico y cafeíco) para confirmar esto, se evaluó el extracto mediante CCF con los estándares, descartando definitivamente su presencia en nuestro extracto. El que nosotros no obtuvieramos ninguno de los acidos previamente reportados, puede deberse a la diferencia en la forma de extracción. Nosotros extrajimos a temperatura ambiente mientras que Estrada–Zuñiga *et al.*, 2009 mencionan que las hojas de tepozan fueron extraidas con metanol en ebullicion obteniendo estos compuestos en trazas (solo unos μg). A continuación se muestran los tiempos de retención de cada

ácido usado como estándar (Tabla 4) y los espectros de UV obtenidos para cada compuesto (Fig.25).

Tabla 4. Tiempo de retención de los estándares, analizados por HPLC-UV.

Estándar	TR
Ac. Ferúlico	26.546 min
Ac. Sinápico	27.524 min
Ac. Cumárico	22.372 min
Ac. Cafeíco	15.744 min

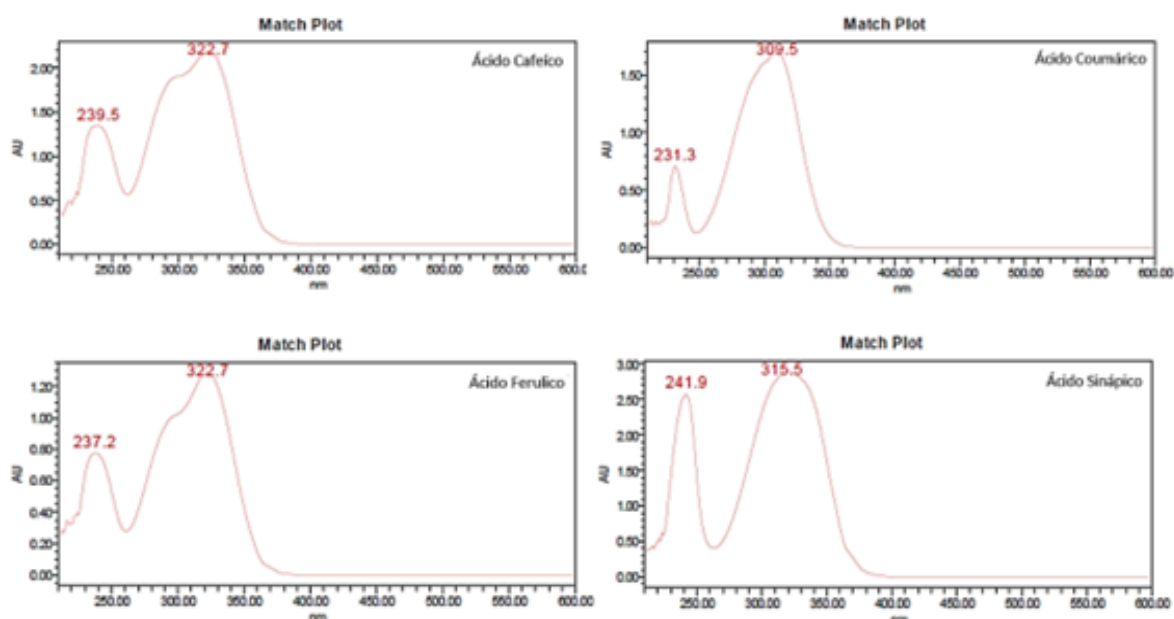


Figura 25. Espectros de absorción en HPLC-UV de los estándares.

Con base en los resultados obtenidos fue necesario realizar una CCFp (SilicaGel C-18) para aislar el compuesto mayoritario e identificarlo por RMN (300 MHz) también algunas de sus fracciones fueron evaluadas por RMN. Las señales de los espectros de RMN ^1H de F5 y F6 correspondieron a una mezcla de dos azúcares, el manitol (3.3 a 3.6 ppm) y la sucrosa o sacarosa (3.18 a 5.18 ppm) mientras que la fracción 9 solo presentó manitol. Estos azúcares fueron previamente reportados para *Buddleja asiática* (El-Domiaty *et al.*, 2009).

Las señales de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de F2 y F3 (Fig. 26 y 27) se compararon con la literatura, encontrando que todas correspondían a las del feniletanoide verbascosido. En la Tabla 5 se muestran la comparación de los valores reportados por Oliveira *et al.*, 2014 y los datos que nosotros obtuvimos, confirmando que este es el compuesto mayoritario.

Tabla 5. Comparación de señales de RMN del verbascosido y las señales de F2 y F3 (de acuerdo con Oliveira *et al.*, 2014).

Oliveira ^1H (600 MHz)	F2 y F3 (300 MHz)	Oliveria ^{13}C (600 MHz)	F2 y F3 (300 MHz)
1.08 (3H, d)	1.12 d	18.5 (C-6 $''$)	18.0
2.80 (2H, m)	2.84 m	36.4 (C-7)	37.0
3.29 (1H, t)	3.30 t	62.1 (C-6 $'$)	63.0
3.39 (1H, t)	3.42 t	70.2 (C-4 $'$)	70.6
3.56 (1H, m)	3.62 m	71.3 (C-3 $''$, C-5 $'$, C-5 $''$)	71.5
3.52-3.61 (2H, m)	3.53-3.65 m	72 (C-2 $''$)	72
3.71-4.05 (2H, m)	3.75-4.10 m	72.1 (C-8)	72.2
3.81 (1H, t)	3.85 t	73.7 (C-4 $''$)	74
3.92 (1H, dd)	4.06 dd	76 (C-2 $'$)	76
4.38 (1H, d)	4.43 d	81.4 (C-3 $'$)	82
4.92 (1H, m)	4.97 d	102.7 (C-1 $''$)	103
5.18 (1H, d)	5.23 d	103.9 (C-1 $'$)	104.5
6.28 (1H, d)	6.31 d	114.2 (C-8 $''$)	14.7
6.56 (1H, dd)	6.61 dd	114.8 (C.2 $''$)	15.2
6.66 (1H, d)	6.72 d	116.2 (C-5, C-5 $''$)	116.5
6.69 (1H, d)	6.75 d	117.2 (C-2)	118
6.77 (1H, d)	6.82 d	120.9 (C.6)	121.5
6.96 (1H, dd)	7.00 dd	123 (C-6 $''$)	123.5
7.06 (1H, d)	7.10 d	125.8 (C-1 $''$)	128
7.60 (1H, d)	7.65 d	129.7 (C-1)	131.5
		143.1 (C-4)	144
		144.7 (C-3)	146
		145.5 (C-3 $''$)	146.5
		148.1 (C-7 $''$)	148
		148.4 (C-4 $''$)	150
		166.5 (C-9 $''$)	168.5

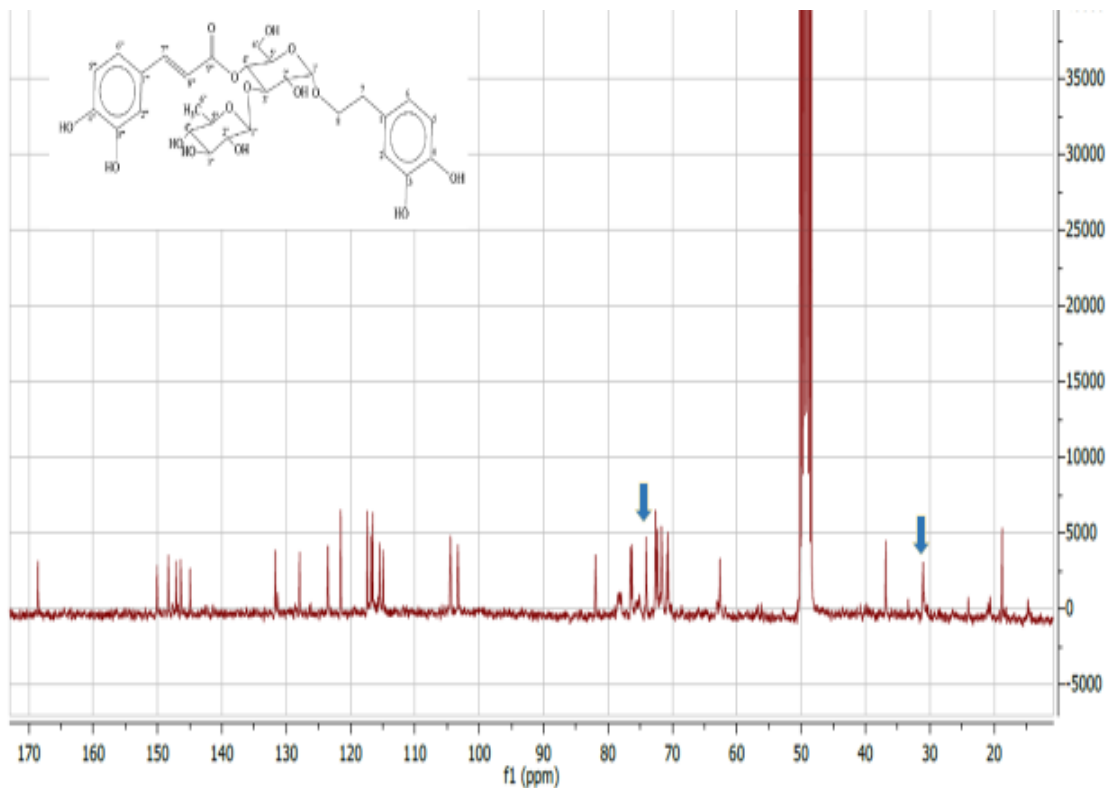


Figura 26. RMN ^{13}C (300 MHz en MeOH) de F3 identificado como verbascosido. Flechas azules señalan que no corresponden al compuesto (impurezas).

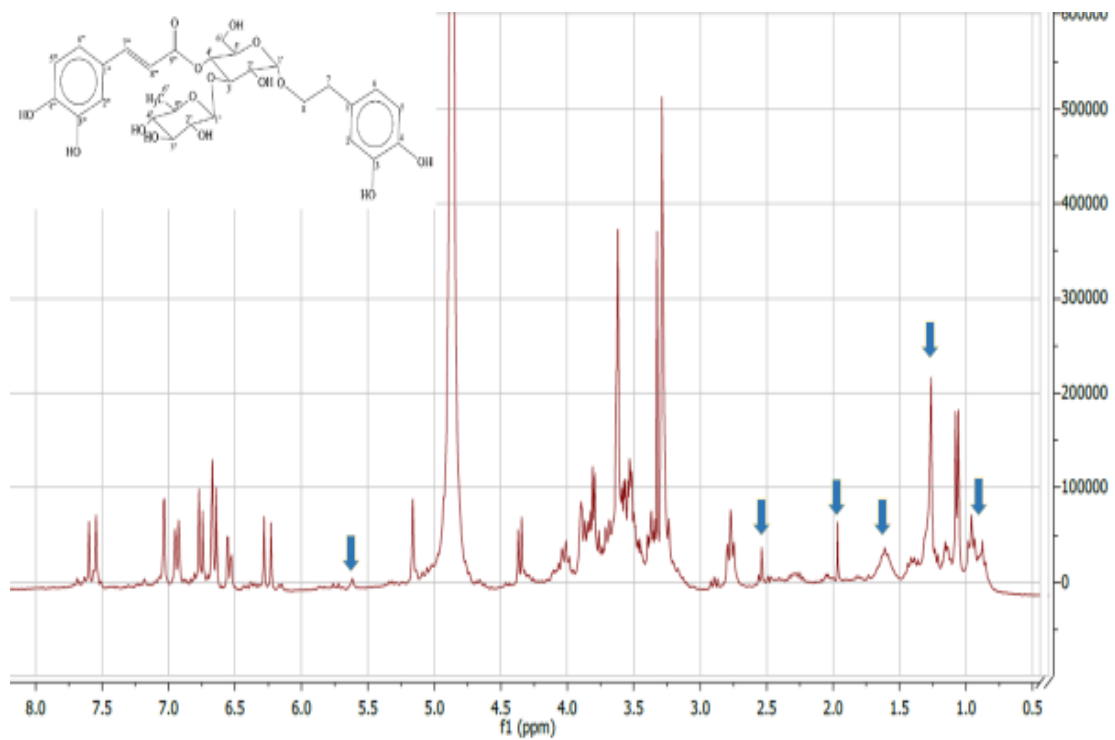


Figura 27. RMN ^1H de F3 (300 MHz en MeOH) de F3 identificado como verbascosido. Flechas azules señalan que no corresponden al compuesto (impurezas).

Se llevó a cabo otro análisis de HPLC (bajo las condiciones antes mencionadas) para corroborar la presencia del verbascosido en nuestro extracto de metanol. El cromatograma del extracto de tepozán (Fig.25) y la fracción 2 que contiene verbascosido (Fig.28) fueron similares, en ambos casos hay un pico mayoritario a 27.742 min (68.40% de abundancia) y a 27.737 min (75.67% de abundancia) respectivamente. La diferencia entre los cromatogramas es que la fracción con verbascosido no presenta las señales en los primeros minutos de retención (1.752–2.230 min) ni las señales intermedias entre 29.012–30.466 min. Las cuales, posiblemente correspondan al manitol y sacarosa identificados en las fracciones 5, 6 y 9.

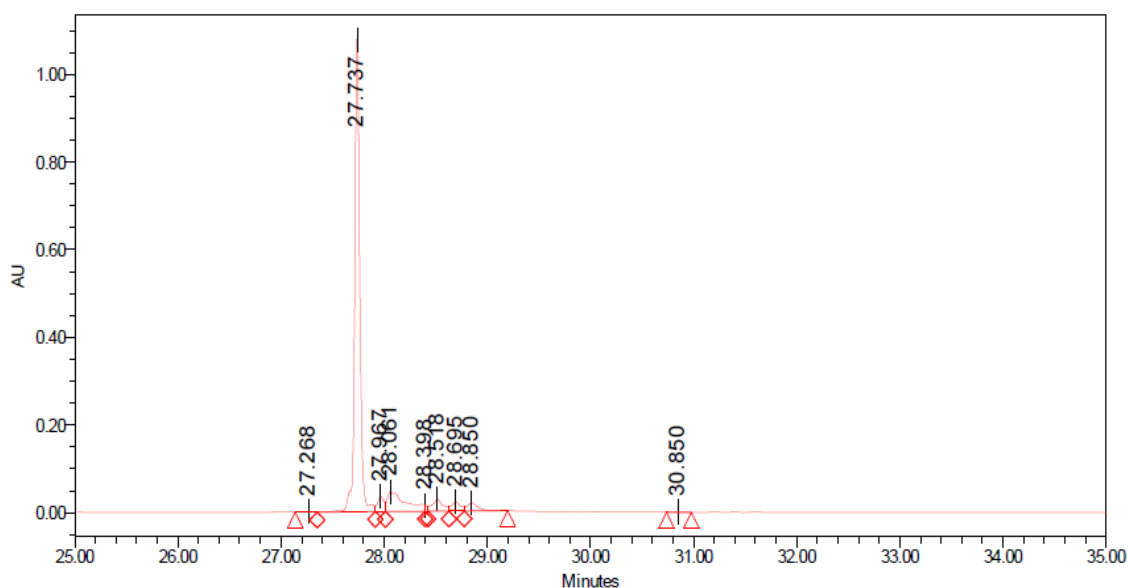


Figura 28. Cromatograma de HPLC de la F2 que contiene verbascosido. Pico mayoritario a 27.737 min de retención y 75.67% de abundancia.

De acuerdo al trabajo de Xie *et al.*, 2012 y bajo condiciones similares, el pico del verbascosido analizado por HPLC se obtuvo a los 26 min, nosotros tenemos un pico mayoritario a los 27.742 min (en el extracto) y de 27.737 min (en F2). Por otra parte, el espectro de UV del pico mayoritario fue comparado con el espectro del verbascosido publicado por Oliveira *et al.*, 2014 (Fig.29) lo cual nos confirma la presencia de este compuesto tanto en el extracto de metanol de *B. cordata* como en dos fracciones mayoritarias (F2 y F3) obtenidas por CCFP. Con todo esto

concluimos, que el extracto de metanol de hojas de tepozán, contiene verbascosido y azucares, como la sacarosa y el manitol.

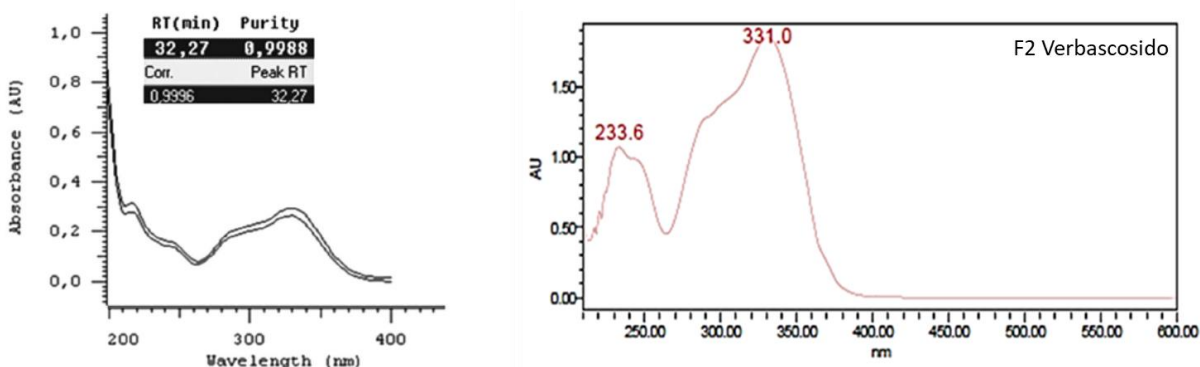


Figura 29. Comparación de los espectros de UV del verbascosido. Izq. Reportado por Oliveira *et al.*, 2014 y der. Obtenido de F2 de *B. cordata*.

Dentro de las actividades biológicas reportadas para el verbascosido, están: actividad antioxidante, teniendo un porcentaje de protección del 68 al 88% (Mensah *et al.*, 2001) actividad antinociceptiva, usando como referencia al ibuprofeno, en un 67.6 y 50 % (Backhouse *et al.*, 2008; Akdemir *et al.*, 2011) también ayuda a inhibir la agregación plaquetaria (1 y 2 mg) con respecto a la aspirina (Campo *et al.*, 2012). Esto es de suma importancia, pues el verbascosido podría estar actuando como modulador en la agregación plaquetaria, permitiendo que el proceso del cierre de herida sea de forma gradual, evitando así anomalías en la cicatrización. También, presenta efecto antiinflamatorio al inhibir el edema de pata trasera en ratas, en el modelo de carragenina (200 mg/kg) y un efecto cicatrizante *in vivo* mediante los modelos de escisión e incisión, siendo efectivo a los 10 y 12 días (Akdemir *et al.*, 2011).

10. CONCLUSIONES

- *Buddleja cordata* presentó potencial cicatrizante con dos de sus extractos. Con el de diclorometano-metanol a las 24 y 48 h en dos concentraciones (50 y 10 µg/mL respectivamente) y con el de metanol a las 48 h en la concentración de 10 µg/mL. La actividad cicatrizante *in vitro* del extracto de metanol de *B. cordata* es atribuida a la presencia del verbascosido.
- Los extractos de tepozán no fueron citotóxicos en fibroblastos humanos y no tuvieron efecto contra *P. aeruginosa*.
- *Vismia baccifera* no inhibió a *P. aeruginosa*, tampoco tuvo efecto citotóxico en fibroblastos, ni potencial cicatrizante en el modelo de herida *in vitro*.
- No se encontró un efecto positivo en ninguno de los extractos sobre los posibles mecanismos de acción de manera cualitativa (migración celular, producción de colágena I y proliferación celular).
- Por lo tanto estos resultados corroboran el uso etnomédico de las hojas de tepozán, para el tratamiento de lesiones cutáneas en México. Mientras que para el caso de vismia los resultados indican que los compuestos activos pudieran estar presentes en otras estructuras u órganos de la planta (látex, corteza o frutos).

11. BIBLIOGRAFIA

- Akdemir Z., C. Kahraman, I. I. Tatli, E. K. Akkol, I. Süntar y H. Keles. 2011. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. **Journal of Ethnopharmacology** 136: 436-433.
- Andrades P., S. Sepulveda y J. González. 2004. Curación avanzada de heridas. **Revista Chilena de Cirugía**. 56: 396-403.
- Ávila A. J. G., C. M. Castañeda, C. Benítez, D. A. Duran, V. R. Barroso, C. G. Martínez, L. J. L. Muñoz, C. A. Martínez, A. Romo de Vivar. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. **Fitoterapia** 76. 301-309.
- Ávila A. J. G., A. M. Espinosa, D. Matamoros de M. y C., J. del C. Benitez, T. Hernández, S. Flores, J. Campos, J. L Muñoz y A. M. García. 2014. Photoprotection of *Buddleja cordata* extract againsts UVB-induced skin damage in SJH-1 hairless mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 14: 281.
- Backhouse N., C. Delporte, C. Apablaza, M. Farias, L. Göity, S. Arrau, R. Negrete, C. Castro y H. Miranda. 2008. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. **Journal of Ethnopharmacology** 119: 160-165.
- Bonte F. y A. Meybeck. 1995. Composición cosmética o farmacéutica, particularmente dermatológica que contiene un extracto de *Vismia*. **Oficina española de patentes y marcas. N° 2102818. Madrid – España**.
- Brunicardi, F. C., D. K. Anderson, T. R. Billiar, D. L. Dunn, J. G. Hunter, R. E. Pollock. 2006. Manual de Cirugía. **Ed. Mc-Graw Hill Interamericana**. México. D.F. Pp. 166-183.
- Bustamante S. D., N. Álvarez, R. Mendiburen, F. Vergara, I. Zarate, C. Collado y M. Morales. 2015. Fundamentacion preclínica del uso etnomedico de matico (*Buddleja globosa* Hope). **Revista Fitoterapia**. 15(1): 37-51.
- Campo G., J. Marchesini, L. Bristot, M. Monti, S. Gambetti, R. Pavasini, A. Pollina y R. Ferrari. 2012. The *in vitro* of verbascoside on human platelet aggregation. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**. 34: 314-325.

- Castrillon R. L. E., R. A. Palma y D. C. Padilla. 2008. La función inmunológica de la piel. **Dermatología Revista Mexicana** 52(5): 211- 224.
- Chaput B., M. Courtade-Saïdi, G de Bonnezeze, H. Eburdery, C. Crouzet, J. P. Chavoïn, J. L. Grolleau & I. Garrido. 2012. Anomalías de la cicatrización. **EMC Cirugía plástica reparadora y estética** 20: E45-011.
- Chen N., J. Zhang, M. Xu, Y. L. Wang y Y. H. Pei. 2012. Inhibitory effect of mitomycin C on proliferation of primary cultured fibroblast from human airway granulation tissues. **Respiration** 85: 500-504.
- Chukwujekwu J., S. O. Amoo, C. A. Kock, P. J. Smith y J. V. Staden. 2014. Antiplasmodial, acetylcholinesterase and alpha-glucosidase inhibitory and cytotoxicity propoerties of *Buddleja saligna*. **South African Journal of Botany** 94: 6-8.
- David, J. A. 1988. Cuidado de las heridas. **Ediciones Doyma**. España. 1-3
- Dinda M., S. Mazumdar, S. Das, D. Ganguly, U. B. Dasgupta, A. Dutta, K. Jana y P. Karmakar. 2016. The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates in vitro and in vivo proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. **Phytotherapy Research** 30 (10): 1696-1707.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. **Ed. Limusa**. México. D.F. 281 p.
- El-Domiaty M., M. Wink, M. M. Abdel Aal, M. M. Abou-Hashem y R. H. Abd-Alla. 2009. Antihepatotoxic activity and chemical constituents of *Buddleja asiatica* Lour. **Zeitschrift für Naturforschung C** 64(1-1): 11-9.
- Estrada-Zúñiga M. E., F. Cruz-Sosa, M. Rodríguez-Monroy, J. R. Verde-Calvo y E. J. Vernon-Carter. 2009. Phenylpropanoid production in callus and cell suspensión cultures of *Buddleja cordata* Kunth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 97: 39-47.
- Farman Ali, A. Irshad, K. Hidayat Ulla, K. Arif-Ullah y G. Anwarul Hassan. 2011. Studies on *Buddleja asiatica* antibacterial, antifungal, antispasmodic and Ca⁺⁺ antagonist activities. **African Journal of Biotechnology** 10(39):7679-7683.

- Gómez-Cansino Roció, C. I. Espitia-Pinzón, M. G. Campos-Lara, S. L. Guzmán-Gutiérrez, E. Segura-Salinas, G. Echeverría-Valencia, L. Torras-Clavaria, X. M. Cuevas-Figueroa y R. Reyes-Chilpa. 2015. Antimycobacterial and HIV-1 reverse transcriptase activity of Julianaceae and Clusiaceae plant species from México. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2015 (ID:183036, 8 pages).
- Gómez, J., M. Alcántara, E. Simarro, B. Martínez, J. Ruiz, B. Guerra, J. Gómez Vargas y M. Valdés. 2002. Bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiología, clínica y tratamiento. Estudio prospectivo de siete años. **Revista Española de Quimioterapia** 15 (4): 560-65.
- González, T. J. H., R. R. Rodríguez, P. M. Machado, Q. J. González, S. J. Cabrera. 2004. Heridas. Métodos de tratamiento. **MEDISAN** 8(1):33-42.
- Grijalva P. A. 2006. Flora útil. Etnobotánica de Nicaragua. **Ed. Marena–Araucaria**. Managua, Nicaragua. Pp. 65 y 299.
- Guarin-Corredor, C., P. Quiroga-Santamaria y N. S. Landinez-Parra. 2013. Proceso de cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. **Revista de la Facultad de Medicina** 61 (4): 441-448.
- Guillermo, F., P. Bonilla, J. Arroyo. 2005. Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperomia scutellaefolia* R. et P. en geles aplicados a *Ratus norvergicus*. **Folia Dermatológica Peruana** 16(1):15-22.
- Hafték M. 2011. Queratinización epidérmica. **EMC Dermatología**. E-98-010-A-10.
- Hernández-Pasteur G. 2013. Metabolitos secundarios del árbol tropical *Vismia mexicana* (Clusiaceae) y su actividad sobre la transcriptasa reversa del VIH-1. **Tesis de Licenciatura (Biología)**. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Houghton P. J. 2003. *Buddleja globosa*: A medical plant of Chile, their chemistry, biological activity and traditional uses. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas** 2: 36-41.
- Houghton P. J., A. Y. Mensah, N. Iessa y L. Yong Hong. 2003. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry** 64: 385-393.

- Houghton, P. J., P. J. Hylands, A. Y. Mensah, A. Hensel, A. M. Deters. 2005. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. **Journal of Ethnopharmacology** 100:100-107.
- INI, Instituto Nacional Indigenista. 1994. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Revisada Agosto 2015. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.p?l=3&t=&id=7783>
- Kuete V., J. Nguemeving, V. Beng, A. Azebaze, F. Etoa, M. Meyer, B. Bodo y A. Nkengfack. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology** 109:372-379.
- Lazaurus, G. 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Archives of Dermatology** 130: 489.
- Le Bitoux M. A. y M. Haftek. 2008. Fisiología cutánea: queratinización epidérmica. **EMC Podología** E-27-070-A-20.
- Lee H., Y. Hong, S. H. Know, J. Park y J. Park. 2016. Anti-aging effects of *Piper cambodianum* P. Fourn. Extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice. **Clinical Interventions in Aging** 11: 1017-1026.
- Lopez A., J. Hudson y G. Towers. 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 77:189-196.
- Lujan Roca D. A. 2014. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. **Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana** 48 (4): 465-74.
- Martínez P. J. L. y Castillo-Campos G. 2008. Hypericaceae. **Flora de Veracruz**. Fascículo 148. Nov. Instituto de Ecología A.C. Xalapa, Veracruz, México.
- Mead T. J. y V. Lefebvre. 2014. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. **Methods in Molecular Biology** 1130: 233-243.
- Ménan H., J. Banzouzi, A. Hocquette, Y. Pelissier, M. Koné, M. Mallié, L. Assi, A. Valentin. 2006. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in west African traditional medicine for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology** 105:131-136.

- Mensah A. Y., J. Sampson, P. J. Houghton, P. J. Hylands, J. Westbrook, M. Dunn, M. A. Hughes, G. W. Cherry. 2001. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology** 77: 219-226.
- Mohammed N., M. Abuwuhab y F. Mohammed. 2016. Antimalarial activity of crude extract of *Buddleja polystachya* Fresen (Buddlejaceae) against *Plasmodium berghei* in mice. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences** 11 (5): 27-35.
- Núñez R., J. Rojas, M. Lucena, A. Roa y P. Meléndez. 2013. Evaluación de la actividad antibacteriana y efecto citotóxico de extractos obtenidos de la especie *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. (Hypericaceae). **Revista de la Facultad de Farmacia** 55 (2): 29-34.
- Ocampo-Acosta G. 2003. Buddlejaceae. **Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes**. Fascículo 115. Agosto. Instituto de Ecología, A.C. Patzcuaro Michoacán, México.
- Oliveria D. M. S., M. D. Maralis, M. Kalegari, O. G. Miguel y T. F. Moreira. 2014. Isolamento do verbacosídeo e validação de método analítico para padronização do extrato bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides* Cham. & Schldl. (Scrophulariaceae). **Química Nova** Vol. 37 (2): 344-348.
- Pino-Benitez N., Y. Córdoba C. 2007. Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de Quibdo-Chocó. **Scientia et Technica** 13 (33): 387- 390.
- Rahirant S., Z. Garavito y H. Hurtado. 2000. Técnica inmunocitoquímica para evaluar la proliferación de células en cultivo por la incorporación de bromodeoxiuridina. **Biomédica** 20: 144-150.
- Riss T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella y L. Minor. 2016. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**. Eli Lilly & National Center for Advancing Translational Sciences. Bethesda Maryland. Pp. 355-385.

- Salas F., J. Velasco, J. Rojas, A. Morales. 2007. Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) Collected in Venezuela. **Natural Product Communications** 2: 185 - 188.
- Sánchez-Saldaña L. y E. Saenz-Anduega. 2005. Antisépticos y desinfectantes. **Dermatología Peruana** 15 (2): 82-103.
- Senet P. 2008. Fisiología de la cicatrización cutánea. **EMC Dermatología** E-98-040-A-10.
- Shikatani E. A., A. Trifonova, E. R. Mandel, S. T. K. Liu, E. Rouier, A. Krylova, A. Szigiato, J. Beaudry, M. C. Riddell y T. L. Haas. 2012. Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis. **PLOS ON** 7 (10): e46625
- Thangavelu M., A. Kannan, P. Dharmalingam, P. S. Thotapalli. 2014. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract-*In vivo* wound healing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 121: 178-188.
- Tonin T. D., L. C. Thiesen, M. L. Oliveira, M. F. Broering, M. P. Donato, M. J. Goss, M. Petreanu, R. Niero, I. D. Machado y J. R. Santin. 2016. *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract and pure compound niga-ichigoside F1: wound healing and anti-inflammatory effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 389 (11): 1235-1244.
- Valadeau C., J. A. Castillo, G. Bourdy. 2008. Yato' Ramuesh: Plantas medicinales Yaneshas. **Institut de Recherche pour le Développement France**. Lima Perú. Pp. 133, 233, 310- 312.
- Valadeau C., A. Pabon, E. Dejaró, J. Alban-Castillo, Y. Estevez, A. F. Lores, R. Rojas, D. Gamboa, M. Sauvain, D. Castillo y G. Bourdy. 2009. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology** 413-422.
- Valadeau C, J. Castillo, M. Sauvain, A. Lores, G. Bourdy. 2010. The rainbow hurts my skin: Medicinal Concepts and plants uses among the Yanasha

- (Amuesha), and Amazonian Peruvian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology** 127: 175 - 192.
- Vilar-Compte D., B. Jacquemin, A. Díaz-González, C. Velásquez y P. Volkow. 2003. Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. **Salud Pública de México** 45 (5): 271-378.
- Vizcaya M., A. Morales, J. Rojas y R. Núñez. 2012. Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del genero *Vismia* (Guttiferae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas** 11(1): 12-34.
- Wang Y., J. Ren, K. Xia, S. Wang, T. Yin, D. Xie y L. Li. 2012. Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an in vitro study. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B** 13(12): 997-1005.
- Xie J., F. Tan, J. Zhu, C. Yue y Q. Li. 2012. Separation, purification and quantification of verbascoside from *Penstemon barbatus* (Cav.) Roth. **Food Chemistry** 135: 2536-2541.
- Zacaria H., S. Apers, M. Moshi, M. Kapingu, S. Van Miert, M. Claeys, R. Brun, P. Cos, L. Pieters y A. Vlietinck. 2004. Anthranoid compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*. **Planta Medica** 70(8): 706-710.
- Zibbel J., A. Deters, A. Hensel. 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.
- Zheng J. L., C. Helbig y W. Q. Gao. 1997. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. **The Journal of Neuroscience** 17(1): 216-226.

- Figura 1. Capas de la piel. <https://es.wikipedia.org/wiki/Piel>
- Figura 2. Capas de la epidermis. <https://es.wikipedia.org/wiki/Epidermis>
- Figura 3. Etapas de la cicatrización. Alda 2015 <http://b-log-a20.blogspot.mx/2015/>

12. ANEXOS

PREPARACION DE LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS

Para probar la actividad antibacteriana:

- Se pesó 1 mg de cada extracto (vismia y tepozán) y se le agregaron 1000 μL de DMSO, para tener [1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$].
- De la solución anterior se tomaron 100 μL y se agregaron en 900 μL de DMSO, así se obtuvo [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$].
- De la solución anterior se tomaron 100 μL y se agregaron en 900 μL de DMSO, así se obtuvo [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$].
- Finalmente de la solución anterior se tomaron 100 μL y se agregaron a 900 μL de DMSO, obteniendo así la última concentración [1 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

Para los experimentos de MTT y heridas *in vitro*.

- Para todos los extractos, en cada caso se pesó 1 mg de extracto seco y se disolvió cada uno en la mínima cantidad de DMSO.
- Una vez disuelto, cada extracto se aforo hasta 2000 μL de medio DMEM complementado (solución stock).
- Todos los extractos se filtraron con un filtro de pirinola estéril de 300 mm de diámetro y 0.22 μm .
- Para obtener la [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] se tomaron 10 μL de la solución stock correspondiente y se aforo hasta 1000 μL con DMEM complementado.
- Para la [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] se tomaron 20 μL de la solución stock adecuada, y se aforo hasta 1000 μL con medio DMEM.
- En el caso de la [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] se tomaron 100 μL de la solución stock adecuada y se aforo hasta 1000 μL con medio DMEM.
- Finalmente para la [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] se tomaron 20 μL de la solución stock adecuada y se aforo hasta 1000 μL con medio DMEM.
- Las concentraciones de DMSO se calcularon y se evaluaron tres de ellas, la dosis más baja, una intermedia y la más alta.

Extracto	DMSO para disolver extracto	DMEM complementado aforado a 2 mL
CH ₂ Cl ₂ - Vismia	20 µL	1980 µL
CH ₂ Cl ₂ -Tepozán	35 µL	1965 µL
Hexano - Tepozán	110 µL	1890 µL
AcOEt – Tepozán	90 µL	1910 µL
MeOH - Tepozán	65 µL	1935 µL

METODO DE MICRODILUCION PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para llevar a cabo la actividad antibacteriana se sembró *Pseudomonas aeruginosa* en medio Luria Bertani (LB) sólido, se colocó dentro de una estufa a 28 °C con una agitación de 200 rpm durante 24 h. Transcurrido este tiempo se preparó un inóculo con la bacteria antes sembrada en 10 mL de medio LB líquido, nuevamente se colocó dentro de la estufa bajo las condiciones antes mencionadas por 8 h. Posteriormente se ajustó el inóculo en placas de 96 pozos a una Densidad Óptica de 0.025 en un espectrofotómetro con una absorbancia de 600 nm.

Una vez ajustada la bacteria, se colocaron 200 µL del inóculo en cada pozo de la placa, se leyó en el espectro (tiempo cero T00) luego se agregaron 2 µL de cada tratamiento con seis replicas cada uno (por experimento) se tomó la lectura espectrofotométrica nuevamente, para determinar si los tratamientos presentan absorbancia (tiempo con tratamiento T0C). Después se colocó la placa en una estufa con las condiciones arriba descritas y se hicieron lecturas a las 3, 6, 9 y 12 h (tiempo T1, T2, T3 y T4).

Los tratamientos evaluados fueron los extractos de diclorometano-metanol de ambas especies en concentraciones hechas por dilución seriada 1000, 100, 10 y 1 µg/mL. Como vehículo se usó DMSO, se utilizó colistina como control positivo, a una concentración de 500 µg/mL, y como control negativo, medio LB sin bacteria.

También se hizo la cuenta viable para determinar cuántas unidades formadoras de colonia (UFC) se depositaron en la placa de 96 pozos, esto se llevó a cabo mediante el método de dilución decimal de una muestra. Para hacer una dilución 10^{-1} se mezclan 0.5 mL del inoculo en 4.5 mL de medio LB líquido. Para una dilución 10^{-2} se toman 0.05 mL del inoculo en 4.95 mL del medio de cultivo. Una vez obtenidas las diluciones se tomaron 10 μ L del medio con bacteria y se sembraron en una placa de medio LB solido mediante estriado, luego se dejó crecer durante 24 h. Una vez pasado este lapso se contaron las UFC y se hicieron los respectivos cálculos.

CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Para evaluar el potencial de la actividad cicatrizante *in vitro* se usaron dos cultivos celulares primarios de fibroblastos humanos obtenidos el 05 de noviembre de 2012 de prepucio del neonato número siete. En cada criovial fueron depositados 566 mil fibroblastos embebidos en DMSO y luego puestos a congelar en nitrógeno líquido.

Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones estériles (uso de guantes, bata azul, uso constante de alcohol al 70%) en una campana de flujo laminar, previamente irradiada con UV.

El medio de cultivo complementado (DMEM) se mantuvo a temperatura ambiente. Una vez que se obtienen las células de Nitrógeno líquido, el criovial se colocó en baño maría durante 1 min. Se tomaron 5 mL de DMEM y se depositaron en un tubo falcón de 15 mL. Se transfirió 1 mL de DMEM (de los 5 mL) al criovial y se resuspendieron las células. Se tomó todo lo del criovial (células + 1 mL de DMEM) y se depositó en el tubo falcón (con los 4 mL de DMEM restantes). Después se centrifugo por 10 min a 1500 rpm. Posteriormente se desechó el sobrenadante con una pipeta pasteur y una bomba de vacío. Se resuspendió el pellet de células y se agregaron 2 mL de DMEM, nuevamente se resuspendió (solución de células).

Se preparó la cámara de Neubauer tomando 10 µL de azul tripano y se depositaron en un lado de la cámara, luego se tomaron 10 µL de la solución de células y se resuspendió homogéneamente con el azul tripano. Se tomaron 10 µL de la mezcla y se colocaron en cada celda de la cámara. Se contaron las células vivas (redondas y traslucidas) y las células muertas (deformes y azules). Se aplicó la siguiente fórmula para conocer el número de células vivas y muertas:

$$X / 8 * 2 * 10,000 * 2 = Y$$

Se sembró el sobrante de las células en cajas T25 y se agregaron 5 mL de medio DMEM. Se dejó crecer el cultivo hasta llegar a la confluencia (caja llena de células) dentro de una incubadora a 37°C y 5% de CO₂, cambiando el medio DMEM cada tercer día. Cada que se hace una nueva resiembra, se indica con pases, iniciando en P1 y continuando sucesivamente.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT

Este ensayo se hizo a partir de una caja T25 confluyente. Para ello primero se despegan las células con tripsina, por lo que es necesario que previamente se coloque el medio DMEM y PBS (solución salina) en baño maría a 37°C. La tripsina (1:4) se mantiene a temperatura ambiente.

Primero se quitó el medio DMEM de la caja T25 confluyente, con una pipeta pasteur y una bomba de vacío. Luego se lavó con 3 mL de PBS, dos o tres veces. A la tercera vez que se lavó el cultivo se retira el PBS y se agregó 1 mL de tripsina. Se deja incubando por 10 min en condiciones normales (37°C y 5% de CO₂). Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la caja de la incubadora y se golpeó levemente con la palma de la mano (para terminar de despegar las células). Luego se observó al microscopio para corroborar que las células estuvieran despegadas.

Para inactivar la tripsina, se agregó 1 mL de medio DMEM en la caja T25 y con una pipeta estéril se tomó todo el contenido (células + tripsina + medio DMEM) y se depositó en un tubo falcón de 15 mL. Se tomó otro 1 mL de medio DMEM y con él, se lavó la caja T25. Este último, también se depositó en el tubo falcón (previamente usado) y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min.

Se retiró el sobrenadante con una pipeta pasteur y una bomba de vacío. Se resuspendió el pellet de células y se agregaron 2 mL de medio DMEM, entonces nuevamente se resuspendió. Se montó la cámara de Neubauer, tomando 10 μ L de azul tripano y depositandolos en un lado de la cámara, luego se tomaron 10 μ L de la suspensión de células y se mezcló hasta obtener una muestra homogénea. Entonces se depositaron 10 μ L a cada celda y se contó el número de células vivas (células redondas y traslucidas) y muertas (células deformes y azules). Al número de células obtenido se le aplicó la siguiente regla numérica:

$$X / 8 * 2 * 10,000 * 2 = Y$$

Una vez teniendo el número de células total, mediante una regla de tres, se determinó cuantos microlitros se deben depositar de la solución antes hecha (células + medio DMEM) para depositar 7,000 celular por pozo (este ensayo se hizo en una placa de 48 pozos). Una vez que se siembran las células en la placa se agregó a cada uno 200 μ L de medio DMEM. Esta placa se dejó crecer hasta alcanzar la confluencia (5-6 días) cambiando cada tercer día el medio DMEM. Por otra parte, las células sobrantes (del total obtenidas) se siembran en cajas T25 con 5 mL de medio DMEM y de igual forma se dejaron crecer hasta confluencia, cambiando el medio constantemente.

Una vez que la placa de 48 pozos alcanzó la confluencia (5-6 días después de ser sembradas) se retiró el medio y se agregaron 200 μ L del tratamiento correspondiente (cada uno se hizo por triplicado) se dejó incubar en condiciones normales a 37 °C y 5 % de CO₂ (durante 24 o 48 h según sea el caso).



Transcurrido el tiempo (24 o 48 h) se retiró el medio DMEM con tratamientos y se lavaron los pozos con PBS (solución salina). A cada pozo se le agregaron 135 μL de medio DMEM + 15 μL de MTT (amarillo). Después se dejó incubar por 3 h bajo condiciones normales.

Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio + MTT de cada pozo y se agregaron 150 μL de la mezcla alcohol 2- propanol: DMSO (1:1) para solubilizar los cristales de formazán que se formaron (de color morado). Se resuspendió y se tomaron 100 μL de dicha solución para colocarse en una placa de 96 pozos, donde se hizo la lectura en un espectrofotómetro a 620 nm. Se graficaron los datos de acuerdo a la absorbancia obtenida y se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía totalmente aleatorio y con comparación de Dunnett's.

ENSAYO DE HERIDA *in vitro*

Se tomó una caja T25 confluyente. Previamente se colocó en baño maría el medio DMEM complementado y el PBS, mientras que la tripsina se mantuvo a temperatura ambiente. Después que quitó el medio de la caja T25 y se lavó con 3 mL de PBS en tres ocasiones. En el tercer lavado, se quitó el PBS y se agregó 1 mL de tripsina, luego se dejó incubar durante 10 min.

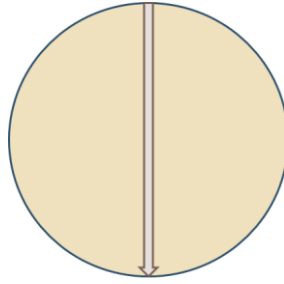
Transcurrido este tiempo, se golpeó levemente la caja para ayudar a despegar las células, además se observó al microscopio óptico para verificar que las células estuvieran despegadas. Para inactivar la tripsina se agregó 1 mL de medio DMEM complementado, lavando la caja T25. Se traspasaron los 2 mL (DMEM y tripsina) a un tubo falcón de 15 mL. Se agregó otro mililitro de medio DMEM a la caja, para lavarla y se traspasó con el resto al tubo falcón. Después se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm y una temperatura de 23 °C.

Se retiró el sobrenadante con una pipeta pasteur y se resuspendió el pellet de células. Se agregaron 2 mL de DMEM complementado y nuevamente se resuspendió. En una cámara de Neubauer se colocaron 10 µL de azul tripano y 10 µL de células con DMEM. Se resuspendió para obtener una mezcla homogénea, luego se tomaron 10 µL de la mezcla y se colocaron en una de las celdas de la cámara, los otros 10 µL se colocaron en la otra celda y se contaron las células vivas y muertas presentes en ambas celdas. De acuerdo a la siguiente regla, se obtuvo el número de células total.

$$X / 8 * 2 * 10,000 * 2 = Y$$

El experimento de herida se hizo en placas de 12 pozos, para cada pozo se necesitó sembrar 45,500 células. Mediante una regla de tres, pudimos conocer cuántos microlitros de la suspensión celular se debía colocar a cada pozo para obtener las células necesarias y luego se agregaron 500 µL de medio DMEM complementado. Cada tratamiento se hizo con una sola replica (debido a la complejidad del modelo, pues las células no pueden permanecer más de 30 min fuera de incubación y porque el análisis de las fotografías posteriores, es un proceso muy largo). Se dejaron crecer las células hasta que llegaron a confluencia (4 a 5 días) cambiando cada tercer día el medio de cultivo.

Una vez que los pozos llegaron a confluencia, se retiró el medio de cultivo DMEM, se hizo un lavado con PBS y se hizo una herida con la punta de una micropipeta de 1 mL (como se aprecia en la siguiente imagen).



Luego se lavaron los pozos con PBS (para eliminar los restos celulares provocados por la herida) y se agregaron 800 μ L del tratamiento correspondiente. Inmediatamente, se tomaron las fotografías en un microscopio óptico invertido (a las 0, 24 y 48 h) con el objetivo de 5X y con el programa AxioVision. Al tomar la primer fotografía, se marcó la zona fotografiada lo cual nos permitió fotografiar la misma zona en las posteriores fotografías.

Las fotografías se guardaron en formato jpg para poder ser procesadas. Lo primero que se hizo fue sobreponer las fotos de un mismo tratamiento con respecto al tiempo, esto para asegurar que las fotografías correspondieran a la misma zona de estudio. Una vez que todas las fotografías fueron reacomodadas y que correspondieran a la misma zona (entre ellas) se guardaron en el programa Paint para mantener el mismo tamaño en todas las fotografías.

Una vez que todas las fotografías fueron acomodadas se analizaron manualmente con el programa Tscratch, donde se marcaron solamente las zonas donde había fibroblastos. Al terminar de analizar una fotografía, el programa nos indicaba el porcentaje del área de la herida abierta. Dado que nosotros queremos el porcentaje de herida cerrado, entonces se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje real de cicatrización *in vitro*:

$$\% \text{ de cicatrización} = (T_i - T_f) * \frac{100\%}{T_f}$$

Dónde: T_i es el porcentaje de la herida abierta al T_0 ; y el T_f corresponde al porcentaje de herida abierta a las 24 o 48 h (según sea el caso). Se graficaron los

datos de 0 a 24 h y de 0 a 48 h. Los porcentajes fueron analizados mediante ANOVA de una vía, totalmente aleatorio y con comparación de Dunnett's.

EVALUACION DE LA MIGRACION CELULAR, USANDO MITOMICINA C

El ensayo para determinar la actividad migratoria de fibroblastos pre tratados con extractos orgánicos a diferentes concentraciones, se hizo bajo el mismo método usado para herida *in vitro*. Por lo que el método se resume a continuación.

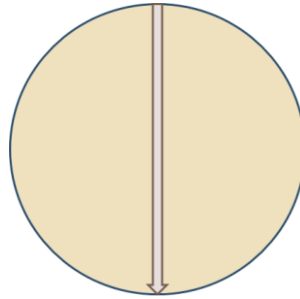
Se tomó una caja T25 confluyente. Previamente se colocó en baño maría el medio DMEM complementado y PBS, mientras que la tripsina se mantuvo a temperatura ambiente. Después que quitó el medio de la caja T25, se lavó con 3 mL de PBS y se agregó 1 mL de tripsina. Se dejó incubar durante 10 min. Después, se golpeó levemente para ayudar a despegar las células y se observó al microscopio óptico para verificar que las células estuvieran despegadas. Para inactivar la tripsina se agregó 1 mL de medio DMEM complementado. Todo fue transferido a un tubo falcón de 15 mL. Se centrifugó por 10 min a 1500 rpm y a 23 °C.

Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células. Agregamos 2 mL de DMEM complementado y nuevamente se resuspendió. Se contó el número de células en una cámara de Neubauer, distinguiendo las células vivas y muertas. De acuerdo a la siguiente regla, se obtuvo el número de células total.

$$X / 8 * 2 * 10,000 * 2 = Y$$

Este experimento se hizo en placas de 12 pozos y para cada pozo se necesitaron 45,500 células. Mediante una regla de tres, logramos saber cuántos microlitros de la suspensión celular se tenía que colocar en cada pozo para obtener las células necesarias y luego se agregaron 500 µL de medio DMEM complementado. Cada tratamiento se hizo con una sola replica. Se dejaron crecer las células hasta que llegaron a confluencia (4 a 5 días) cambiando regularmente el medio de cultivo.

Una vez que los pozos llegaron a confluencia, se retiró el medio de cultivo DMEM, se lavó con PBS y se agregaron 450 μL de mitomicina C (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se dejó incubar las placas por 3 h. Transcurrido ese tiempo se quitó la mitomicina, se lavó con PBS y se hizo la herida una punta de micropipeta de 1 mL.



Luego se lavaron los pozos con PBS (para eliminar los restos celulares provocados por la herida) y se agregaron 800 μL del tratamiento correspondiente. Inmediatamente, se tomaron fotografías en un microscopio óptico invertido (a las 0, 24 y 48 h) con el objetivo de 5X y con el programa AxioVision. Al tomar la primera fotografía se marcó la zona en la placa, lo que nos permitió fotografiar la misma zona en las posteriores fotografías.

Las fotografías se guardaron en formato jpg para poder ser procesadas. Lo primero que se hizo fue sobreponer las fotografías de un mismo tratamiento, con respecto al tiempo, para asegurar que las fotografías correspondieran a la misma zona de estudio. Una vez que todas las fotografías fueron reacomodadas y correspondían a la misma zona (entre ellas) se guardaron en el programa Paint, para mantener el mismo tamaño en todas las fotografías.

Una vez que todas las fotografías se acomodaron, entonces se analizaron manualmente con el programa Tscratch, marcando solamente las zonas donde había fibroblastos. Al terminar de analizar una fotografía, el programa nos indicó el porcentaje del área de la herida abierta. Dado que nosotros queremos el porcentaje de herida cerrado, entonces se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje real de cicatrización:

$$\% \text{ de cicatrización} = (T_i - T_f) * \frac{100\%}{T_f}$$

Dónde: T_i es el porcentaje de la herida abierta al T_0 ; y el T_f corresponde al porcentaje de herida abierta a las 24 o 48 h (según sea el caso). Se graficaron los datos de 0 a 24 horas y de 0 a 48 horas. Los porcentajes se analizaron mediante ANOVA de una vía, totalmente aleatorio y con comparación de Dunnett's.

INMUNOCITOQUIMICA DE COLAGENA I

Este ensayo se hizo en dos partes. En la primera parte, el método fue similar al realizado en los ensayos de citotoxicidad, por ello se resume a continuación:

Parte 1.

Este ensayo se hizo a partir de una caja T25 confluyente. Para ello primero se despegaron las células con tripsina, por lo que fue necesario colocar previamente el medio DMEM y el PBS (solución salina) en baño maría a 37°C. La tripsina (1:4) se mantuvo a temperatura ambiente.

Primero se quitó el medio DMEM de la caja confluyente y se lavó con PBS, dos o tres veces. Después se agregó 1 mL de tripsina y se dejó incubar por 10 min en condiciones normales (37°C y 5% de CO_2). Una vez transcurrido este tiempo, se golpeó levemente con la palma de la mano y se observó al microscopio para corroborar que estuvieran despegados los fibroblastos.

Para inactivar la tripsina, se agregó 1 mL de medio DMEM en la caja T25 y luego se transfirió todo el contenido (células + tripsina + medio DMEM) en un tubo falcón de 15 mL. Se centrifugó a 1500 rpm por 10 min.

Después se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células y se agregaron 2 mL de medio DMEM, nuevamente se re resuspendió. Se montó la

cámara de Neubauer para obtener el número de células vivas (células redondas y translucidas) y muertas (células deformes y azules) a partir de la siguiente regla:

$$X / 8 * 2 * 10,000 * 2 = Y$$

Una vez teniendo el número de células total, mediante una regla de tres, se determinó cuantos microlitros se tenían que depositar de la solución antes hecha (células + medio DMEM) para colocar 7,000 celular por pozo (en placas de 48 pozos). Luego se agregaron 200 µL de medio DMEM dejándolas crecer hasta alcanzar la confluencia (5-6 días).

Una vez que los pozos alcanzaron la confluencia se retiró el medio DMEM y se agregaron 200 µL del tratamiento correspondiente, se dejó incubar en condiciones normales 37 °C y 5 % de CO₂ durante 48 h. Después de este tiempo, se fijaron las células con formaldehido (PFA al 4%) y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso (no más de un mes).

Parte 2.

Colágeno I, anti- collagenI (antibody 1°) ab6308 de ratón [1/600].

Goat anti- mouse IgG (antibody 2°) ab6785 [1/800].

Fijación de células: Se usó paraformaldehido (PFA 4%) en PBS por 20 min. Luego se lavó dos veces con PBS.

Permeabilización: se hicieron dos lavados de 5 min con Tween 20 al 0.3% en PBS. Después se lavaron las células con PBS 2 veces por 5 min en cada caso.

Bloqueo: se incubaron las células con albumina al 1% en solución de PBS + Tween 20 al 0.3 % por 20 min a 4°C.

Inmunotinción: se incubaron células en la dilución el anticuerpo 1° en solución de bloqueo a 4°C por 24 h. Transcurrido ese tiempo, se decantó la solución y se lavaron las células 2 veces con PBS por 5 min en cada lavado. Luego se incubaron las células con anticuerpo 2° en PBS + albumina al 1% por 2 h a 37 °C. Posteriormente, se decantó la solución y se lavó 2 veces con PBS por 5 min en cada caso.

Contratinción: se colocaron 100 µL del colorante de Hoechst por 10 s en cada pozo (detector de ADN). Se enjuagaron los pozos con PBS, se mantuvieron en PBS, se cubrieron con aluminio, se refrigeraron y mantuvieron en oscuridad hasta tomar fotografías (no más de un mes).

Fotografías: se tomaron en un microscopio invertido de fluorescencia a 10 y 20X. En ellas se apreció en color azul, todos los núcleos de los fibroblastos, mientras que en verde, se observó la colágena I formando una matriz (red).

Análisis: cualitativo, en que tratamiento se observó mayor contenido de colágena I. Cuantitativo, usando el programa ImageJ se cuantifico el contenido de colágena por fotografía y por tratamiento.

INMUNOCITOQUIMICA, PROLIFERACION CELULAR USANDO BrdU

Este ensayo se hizo en dos partes. En la primera parte, el método es similar al realizado en los ensayos de citotoxicidad, por ello se resume a continuación:

Parte 1.

Este ensayo se hizo a partir de una caja T25 confluyente. Para ello primero las células fueron tratadas con tripsina, por lo que fue necesario colocar previamente el medio DMEM y PBS (solución salina) en baño maría a 37°C. La tripsina (1:4) se mantuvo a temperatura ambiente.

Primero se quitó el medio DMEM de la caja confluyente y se lavó con PBS dos o tres veces. Después se agregó 1 mL de tripsina y se dejó incubar por 10 min en condiciones normales (37°C y 5% de CO₂). Una vez transcurrido este tiempo se golpeó levemente con la palma de la mano y se observó al microscopio para corroborar que los fibroblastos estuvieran despegados.

Para inactivar la tripsina, se agregó 1 mL de medio DMEM en la caja T25 y luego se transfirió todo el contenido (células + tripsina + medio DMEM) en un tubo falcón de 15 mL. Se centrifugó a 1500 rpm por 10 min.

Después se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células y se agregaron 2 mL de medio DMEM, nuevamente se resuspendió. Se montó la cámara de Neubauer para contar y obtener el número de células vivas (células redondas y traslucidas) y muertas (células deformes y azules) a partir de la siguiente regla:

$$X / 8 * 2 * 10,000 * 2 = Y$$

Una vez teniendo el número de células total, mediante una regla de tres se determinó cuantos microlitros se tenían que depositar de la solución antes hecha (células + medio DMEM) para depositar 7,000 celular por pozo (en placas de 48 pozos). Luego se agregaron 200 µL de medio DMEM y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia (5-6 días).

Una vez que los pozos alcanzaron la confluencia se retiró el medio DMEM y se agregaron 200 µL del tratamiento correspondiente, se dejaron incubar en condiciones normales 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 o 48 h (según sea el caso).

Parte 2.

In situ cell proliferation kit, FLUOS.

Cat 11810740001 (inmunofluorescencia).

Preparación de células: los pozos se lavaron con PBS dos veces. Luego se agregaron 100 μL de la solución stock de BrdU–DMEM (1 μL / 1000 μL de DMEM) se dejó incubando por 3 h a 37°C. Pasado este tiempo, se retiró el BrU y se hicieron lavados con PBS. Después se fijaron las células con PFA al 4% por 20 min, se hicieron lavados y se dejaron en PBS hasta su uso (no más de un mes).

Desnaturalización: se cubrieron los pozos con HCl 4M durante 15 min a temperatura ambiente. Después se lavaron con PBS en tres ocasiones, por 5 min en cada caso, con el fin de neutralizar se verificó que el pH fuera 6.5 si fuese el caso que estuviera por debajo, era necesario seguir haciendo lavados.

Inmunodetección: en cada pozo se agregaron 30 μL de buffer de incubación (solución de bloqueo) durante 10 min. Después de este tiempo, se agregaron 30 μL de AntiBrdU FLUOS y se dejaron incubar por 45 min a 37°C. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS.

Tinción de núcleos: se agregaron 100 μL de colorante de Hoechts a cada pozo (durante 10 s) para teñir los núcleos. Se lavaron las placas con PBS, se mantuvieron en el mismo, se cubrieron con aluminio y se refrigeraron en oscuridad hasta su uso (no más de un mes).

Fotografías: se tomaron en un microscopio invertido de fluorescencia, con los objetivos de 10 y 20X. En ellas, se observó en color azul a los núcleos, mientras que en color turquesa o azul brillante, las células que se encontraban en división celular.

Análisis: cualitativo, se determinó en que tratamiento se observaba un mayor número de células en división celular. Cuantitativo, en cada fotografía se contó el número de células totales y de ellas cuantas se encontraban en división celular. Esto se hizo por cada tratamiento.