



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"
División de Estudios de Posgrado**

Tesis:

"Identificación de metabolitos secundarios de Lobelia laxiflora var. patzquarensis con actividad regenerativa en un modelo cutáneo in vitro."

**Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
de la Salud**

Presenta:

Lic. QFB Jania Godínez Orozco

Dirección de tesis:

*Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higareda Mendoza*

*Doctor en Investigación Biomédica
Marco Aurelio Pardo Galván*

Morelia, Michoacán; febrero de 2024



INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Doctora en Ciencias Químico-biológicas

Martha Eva Viveros Sandoval

Presidente

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Edith Higareda Mendoza

Vocal 1 (Directora de tesis)

Doctor en Investigación Biomédica

Marco Aurelio Pardo Galván

Vocal 2 (Co-director de Tesis)

Doctora en Ciencias con especialidad en Farmacología

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Vocal 3

Doctora en Farmacia

Martha Estrella García Pérez

Vocal 4

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Permanece en el padrón de Posgrado de Excelencia del CONAHCyT.

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr, Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo agradece al CONAHCyT la beca que le fue otorgada durante la realización de su tesis.

Número de registro 764908

Se agradece a los servicios de las siguientes instituciones por su disposición y contribución en materiales e instrumental a esta investigación:

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Laboratorio de Productos Naturales

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Laboratorio de Biología Molecular

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Centro de Investigación y Tratamiento Celular Regenerativo

El presente trabajo de investigación se realizó en:

Laboratorio de Biología Celular Humana, Centro de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” a cargo de la Doctora en Ciencias Ana Edith Higareda Mendoza y el Doctor en Investigación Biomédica Marco Aurelio Pardo Galván.

Dirección de Tesis:

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Edith Higareda Mendoza

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctor en Investigación Biomédica

Marco Aurelio Pardo Galván

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Contribuciones:

Mario Armando Gómez Hurtado

Doctor en Ciencias Químicas

Instituto de Investigaciones Químico- Biológicas, UMSNH

Germán Atzin Mora Roldán

Doctor en Ciencias

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Miguel Ángel Bello González

Doctor en Ciencias

Facultad de Agrobiología

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Coordinación de la Investigación Científica (CIC)

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DEDICATORIA

A la comunidad Purépecha.

Que gracias a sus conocimientos ancestrales, a quienes con mucho cariño y respeto espero que la presente investigación logre honrar su sabiduría.

A mi familia y amigos.

Quien es y será mi pilar de vida.

A mis estudiantes.

Quienes son y serán mi motivación para seguir preparándome a lo largo de mi vida profesional, y de quienes me gustaría ser un gran ejemplo para seguir.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría extender mis más sinceros agradecimientos a mis padres, los señores Ramón Godínez Pacheco y Ma. de los Ángeles Orozco Vázquez, por su gran apoyo, su motivación y por cada de sus enseñanzas a lo largo de mi vida, haciendo de mí una persona de bien y digna para la sociedad.

También, quisiera agradecer a mis asesores de tesis, la D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza y el D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván, por sus enseñanzas, su tiempo, su confianza, su apoyo y su disposición, siendo un gran pilar en mi formación como Maestra durante mi estadía en el posgrado y de gran importancia para este trabajo de investigación.

Asimismo, a los miembros de mi comité tutorial, las D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres, Martha Eva Viveros Sandoval y Martha Estrella García Pérez por su gran apoyo, sus aportaciones valiosas, su guía y sus consejos, enriqueciendo el desarrollo de la presente tesis.

Igualmente a la comunidad científica y estudiantil del posgrado, entre ellos mis profesores y compañeros(as) de posgrado, así como de mis compañeros(as) de laboratorio, quienes con cada una de sus enseñanzas contribuyeron enormemente a mi formación académica y profesional, además de compartir conmigo su gran amor por la investigación.

ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AO	Ácido oleanólico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AU	Ácido ursólico
CTM	Células troncales mesenquimales
CX3CL 1	Fractalquina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GMCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HGF	Factor de crecimiento hepático
IFN- γ	Interferón gamma
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IGF-2	Factor de crecimiento similar a la insulina 2
IL1	Interleucina 1
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF α	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TLB	Taraxerol-lupeol-beta amirina
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	VII
Agradecimientos	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen.....	XVI
Abstract.....	XVII
1. Introducción	1
2. Marco Teórico.....	3
2.2. Sistema Tegumentario	3
2.2.1. Tegumento.....	3
2.2.1.1. Epidermis	3
2.2.1.2. Dermis	5
2.2.1.3. Hipodermis	6
2.1.1. Faneras.....	6
2.1.2. Células epidérmicas.....	7
2.1.3. Células de la dermis	9
2.2. Lesiones cutáneas.....	9
2.2.1. Quemaduras	9
2.2.2. Contusiones	11
2.2.3. Heridas.....	11
2.3. Restitución tisular.....	11
2.3.1. Regeneración	12
2.3.2. Cicatrización	12
2.3.3. Fisiología de la restitución tisular	13
2.3.3.1. Fase hemostática	13
2.3.3.2. Fase inflamatoria	14
2.3.3.3. Fase de proliferación	16
2.3.3.4. Fase de maduración	17
2.4. Tipos de cicatrices	17
2.5. Terapias coadyuvantes a la cicatrización tisular.....	18

2.5.1. Terapias en medicina regenerativa.....	19
2.5.2. Células troncales mesenquimales	20
2.5.3. Modelos de estudio de restitución tisular	21
2.6. Metabolitos secundarios de origen vegetal.....	24
2.6.1. Fenoles	25
2.6.1.1. Flavonoides.....	25
2.6.2. Alcaloides	26
2.6.3. Terpenos.....	26
2.6.3.1. Biosíntesis de terpenos.....	26
2.6.3.2. Triterpenos.....	28
2.6.3.3. Aplicaciones terapéuticas de los triterpenos.....	30
2.7. Etnobiología y medicina tradicional.....	30
2.7.1. <i>Lobelia Laxiflora var. patzquarensis</i>	32
3. Antecedentes	34
3.1. Productos naturales con capacidad reconstitutiva cutánea <i>in vitro</i> en cultivos celulares 2D	34
3.2. Productos naturales con capacidad reconstitutiva tisular cutánea <i>in vitro</i> en cultivos 2D bajo condiciones de compromiso fisiopatológico	35
3.3. Productos naturales con capacidad reconstitutiva tisular cutánea <i>in vivo</i> ..	35
3.4. Estudios farmacognósticos del género <i>Lobelia</i>	36
4. Justificación	38
5. Pregunta de investigación.....	39
6. Hipótesis.....	40
7. Objetivos.....	40
7.1. Objetivo general	40
7.2. Objetivos particulares.....	40
8. Materiales y Métodos	41
8.1. Estrategia experimental general	41
8.2. Materiales para evaluar.....	41

8.3.	Obtención de extractos crudos por maceración en frío	42
8.4.	Aislamiento de extractos crudos por métodos cromatográficos	42
8.5.	Caracterización de metabolitos secundarios por espectrometría RMN 1H ⁺ y HPLC	42
8.6.	Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de triterpenos aislados de <i>Lobelia laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	43
8.7.	Cultivos celulares y condiciones	44
8.8.	Ensayo de viabilidad celular por azul de tripano	44
8.9.	Cultivo celular en monocapa de fibroblastos humanos	44
8.10.	Cinética de crecimiento y desarrollo de cultivos celulares	44
8.11.	Ensayo de proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular mediante Azul de Alamar	45
8.12.	Reacción en cadena de la Polimerasa de citoqueratinas 1 y 10	46
8.13.	Obtención de secretoma de célula troncales mesenquimales	46
8.14.	Ensayo de migración celular en cultivos en monocapa de fibroblastos humanos mediante la prueba de scratching	47
9.	Resultados	49
9.1.	Ensayo de proliferación celular por azul de tripano de los extractos crudos de <i>Lobelia laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	49
9.2.	Análisis espectrométrico de fraccionados de extracto hexánico y extracto acetato de etilo de <i>L. laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	50
9.3.	Actividad antiinflamatoria de los compuestos triterpénicos aislados del extracto acetato de etilo de <i>Lobelia laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	54
9.4.	Cinética de crecimiento de fibroblastos humanos	55
9.5.	Ensayo de viabilidad, toxicidad y proliferación celular con Azul de Alamar	55
9.6.	RT-PCR de citoqueratinas humanas	64
9.7.	Estandarización de ensayo de cierre de herida con secretoma CTM humanas	68
10.	Discusión	70
11.	Referencias	73
11.1.	Referencias complementarias	82
12.	Anexos	82

12.1. Anexo I.: Parámetros y condiciones a establecer previos al montaje de una cromatografía en columna	83
12.2. Anexo II. Ficha descriptiva de metabolitos secundarios aislados	86
12.3. Anexo III: Lecturas tomadas para los ensayos con azul de alamar.....	88
12.4. Anexo IV: Amplicones y oligonucleótidos utilizados en el ensayo RT_PCR de citoqueratinas 1 y 10.....	89

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la epidermis.....	5
Figura 2. Etapas del proceso de reparación tisular	13
Figura 3. Tipos de cultivos celulares	19
Figura 4. Secretoma de células troncales mesenquimales	21
Figura 5. Ensayo de cierre de herida por <i>Scratching</i>	22
Figura 6. Cultivo 3D de tipo esferoide	23
Figura 7. Principales rutas metabólicas para la obtención de precursores de isopreno/ terpenoides	27
Figura 8. Estructuras químicas base de triterpenos de tipo oleanano, ursano y lupano	28
Figura 9. <i>Lobelia laxiflora</i> var. <i>stricta</i> . Planch. & Oerst.	32
Figura 10. Uso tradicional de <i>L. laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	37
Figura 11. Espectros de RMN ¹ H+ de las fracciones B3, E1 y E2 del extracto acetato de etilo de <i>L. laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	50
Figura 12. Espectros de RMN ¹ H de muestras X1 y X2 del extracto hexánico de <i>L.</i> <i>laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	52
Figura 13. Cromatogramas de las muestras de triterpenos taraxerol, lupeol y beta amirina de extracto acetato de etilo de <i>L. laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	53
Figura 14. Cromatogramas de las muestras de ácido ursólico (superior) y ácido oleanólico (inferior) de extracto acetato de etilo de <i>L. laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i>	53
Figura 15. Evidencia de la capacidad antiinflamatoria sinérgica de los triterpenos AU- AO-TLB. De izquierda a derecha: Tiempo 0h, 24h, 48h y 72h	55
Figura 16. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de AO 10 µM.	58
Figura 17. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de TLB 50 µM.	59
Figura 18. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de AU 50 µM.	61
Figura 19. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de extracto crudo de <i>L.</i> <i>laxiflora</i> var. <i>patzquarensis</i> 10 µM.	62

Figura 20. RT-PCR de los cultivos tratados con triterpenos pentacíclicos de *L. laxiflora var. patzquarensis* en la expresión del gen GADPH.65

Figura 21. RT-PCR de los cultivos tratados con triterpenos pentacíclicos de *L. laxiflora var. patzquarensis* en la expresión del gen de citoqueratina 165

Figura 22. RT-PCR de los cultivos tratados con triterpenos pentacíclicos de *L. laxiflora var. patzquarensis* en la expresión del gen de citoqueratina 10.....67

Figura 23. Vista al microscopio de los cultivos celulares Dermablast.69

Índice de gráficas

Gráfica 1. Proliferación celular observada en línea A549 tratada con extractos crudos de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*49

Gráfica 2. Respuesta antiinflamatoria de la mezcla de triterpenos pentacíclicos de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*55

Gráfica 3. Cinética de crecimiento y tiempo de duplicación de la línea celular de fibroblastos humanos *Derma-Blast*.....56

Gráfica 4. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con AO57

Gráfica 5. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con el mix de triterpenos TLB59

Gráfica 6. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con AU60

Gráfica 7. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con extracto crudo de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*.....62

Gráfica 8. Proliferación celular de los cultivos a las 24 horas postratamiento con triterpenos pentacíclicos64

Gráfica 9. Niveles de expresión específicos del gen de la citoqueratina 1 en queratinocitos tratados con triterpenos y extracto de *L. laxiflora var. patzquarensis*.66

Gráfica 10. Niveles de expresión específicos del gen de la citoqueratina 10 en queratinocitos tratados con triterpenos y extracto de *L. laxiflora var. patzquarensis*.67

Gráfica 11. Porcentaje de cierre de herida por migración celular de la línea de fibroblastos Dermablast68

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las quemaduras según su profundidad 10

Tabla 2. Factores de crecimiento que participan en la cicatrización de heridas 15

Tabla 3. Clasificación de terpenos	28
Tabla 4. Dosis empleadas de secretoma en medios de cultivo <i>Derma-Blast</i>	47
Tabla 5. Disolventes por emplear como fase móvil en cromatografía en columna en extracto acetato de etilo (%)	83
Tabla 6. Disolventes por emplear como fase móvil en cromatografía en columna en extracto hexánico (%)	84

RESUMEN

La piel o tegumento es el órgano superficial del cuerpo humano, susceptible a cualquier tipo de lesión mecánica, fisicoquímica y biológica, y requiere estrategias histológicas, moleculares e inmunológicas con el objetivo de regenerar el tejido dañado, lo que conlleva a la formación de nuevos tejidos que recuperen su morfología y funcionalidad. No obstante, debido a múltiples factores, este proceso endógeno puede verse afectado, por lo que diversas terapias alopáticas permiten coadyuvar a estos mecanismos fisiológicos, aunque con consecuencias que en ocasiones ralentizan aún más la recuperación del tejido dañado. Asimismo, con el surgimiento de la medicina regenerativa, la terapéutica actual ha tenido avances significativos para la curación de heridas que muchas veces los fármacos alopáticos o las intervenciones quirúrgicas no pueden reparar en su totalidad, mejorando notoriamente la calidad de vida de los pacientes. Por otro lado, la etnobotánica y la medicina tradicional ofrecen una amplia variedad de plantas de uso medicinal que coadyuvan a la recuperación del tejido dañado de manera más económica, de fácil manejo y eficaz en comparación con los tratamientos actuales, por lo que la farmacognosia permite el estudio y cuantificación de sus propiedades curativas, con el propósito de identificar los metabolitos responsables de su actividad farmacológica. La planta *Lobelia laxiflora* variedad *patzquarensis* es un ejemplo de tratamiento herbolario utilizado en la Meseta Purépecha del estado de Michoacán por generaciones, con el propósito de aliviar las lesiones ocasionadas por el contacto con savia de hiedra venenosa, observándose de forma empírica su gran potencial regenerativo ante una recuperación tisular de forma rápida y eficaz, y sin ninguna complicación que comprometa la integridad y funcionalidad cutánea. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo identificar los compuestos químicos responsables de inducir la regeneración del tejido cutáneo, así como evaluar dicha propiedad mediante modelos biológicos.

Palabras clave: Herbolaria, productos naturales, inflamación, proliferación celular, restauración tisular.

ABSTRACT

The skin or integument is the superficial organ of the human body, susceptible to any type of mechanical, physicochemical, and biological injury, and requires histological, molecular, and immunological strategies with the aim of regenerating damaged tissue, which leads to the formation of new tissues, and recover their morphology and functionality. However, due to multiple factors, this endogenous process can be affected, which is why various allopathic therapies help to contribute to these physiological mechanisms, although with consequences that sometimes slow down the recovery of damaged tissue even more. Likewise, with the emergence of regenerative medicine, current therapeutics have made significant advances in healing wounds that often allopathic drugs or surgical interventions cannot fully repair, significantly improving the quality of life of patients. On the other hand, ethnobotany and traditional medicine offer a wide variety of plants for medicinal use that contribute to the recovery of damaged tissue in a more economical, easy-to-handle and effective way compared to current treatments, so pharmacognosy allows the study and quantification of its healing properties, with the purpose of identifying the metabolites responsible for its pharmacological activity. The plant *Lobelia laxiflora* variety *patzquarensis* is an example of herbal treatment used in the Purepecha Plateau of the state of Michoacán for generations, with the purpose of relieving injuries caused by contact with poison ivy sap, empirically observing its great regenerative potential against tissue recovery quickly and effectively, and without any complications that compromise skin integrity and functionality. Therefore, the objective of this work is to identify the chemical compounds responsible for inducing the regeneration of skin tissue, as well as to evaluate this property using biological models.

1. INTRODUCCIÓN

La restitución tisular a nivel de tegumento corresponde a una serie de eventos fisiológico-moleculares con el propósito de recuperar la homeostasis tisular ante una situación de lesión o disrupción tisular mediante la cicatrización a nivel dérmico, así como la reepitelialización cutánea. Dicho proceso implica la activación de trombocitos y síntesis de fibrina, quienes en conjunto forman una red celular y molecular denominada trombo, la cual detiene la hemorragia presente tras la ruptura de vasos capilares. Asimismo, las plaquetas y células del endotelio vascular producen señales químicas que forman una red de comunicación y/o señalización química que promueve la activación de células inmunitarias y su atracción hacia el sitio de lesión, produciendo una respuesta inflamatoria aguda. A su vez, dichas células en conjunto con las células inmunitarias envían señales químicas que permiten la activación de células presentes en la zona circundante de herida, entre ellas fibroblastos, células basales de la epidermis y células endoteliales para favorecer a su proliferación y/o diferenciación celular, con el propósito de formar células que reemplacen aquellas que fueron dañadas como producto de la lesión, así como colágenas que den lugar a la formación de tejido nuevo y funcional.

Sin embargo, una de las dificultades más recurrentes a nivel hospitalario es el cierre de heridas cutáneas, especialmente aquellas que son de gran profundidad, ya que el proceso reconstitutivo puede verse afectado o retrasado por diversas circunstancias, entre ellas: el uso de ciertos fármacos, comorbilidades relacionadas con enfermedades crónico-degenerativas, la edad del individuo, alteraciones genéticas, por mencionar algunas, por lo que se han desarrollado un sinnúmero de estrategias farmacológicas para coadyuvar a la actividad celular en los sitios de lesión, aunque por sus efectos adversos no siempre son la opción ideal para estimular a la restitución cutánea, lo cual conduce al desarrollo de nuevas terapias que favorezcan a la restauración del tejido perdido.

Asimismo, con el objetivo de encontrar alternativas al uso de fármacos como esteroides, la terapia celular así como la ingeniería de tejidos se han dado a la tarea de estudiar los factores celulares, fisiológicos y moleculares implicados en la cicatrización de heridas cutáneas, de manera que las células madre mesenquimales, así como sus secreciones son buenos candidatos en la curación de heridas, debido a

su gran cantidad de moléculas estimulan a la actividad celular para reestablecer la homeostasis tisular; aunque no es una opción accesible para todo público.

No obstante, en los últimos años se han buscado alternativas más asequibles y con menor riesgo de desarrollar complicaciones en pacientes con daño tisular ante un traumatismo o quemadura a nivel de tegumento, por lo que el uso de plantas medicinales entre la población mexicana ha ido en aumento, ya que mediante conocimientos empíricos se demuestra su eficacia y promueve su uso, especialmente en comunidades indígenas. Es por ello que la comunidad científica se ha interesado cada vez más por determinar las sustancias de origen vegetal asociadas con la actividad terapéutica de la planta, con el propósito de poder aislar compuestos nuevos y desarrollar fármacos con mayor índice de eficacia y eficiencia que los tratamientos ya existentes, lo cual nos conduce al objetivo de este trabajo, que en esencia es demostrar la eficacia de compuestos de origen vegetal en la reparación del tegumento y más allá de eso, honrar al conocimiento transmitido por nuestros ancestros purépechas, quienes presentan un alto conocimiento en plantas de uso medicinal y remarcar que el origen de muchas de las preparaciones farmacológicas ya existentes son a partir de compuestos de origen natural.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. SISTEMA TEGUMENTARIO

El sistema tegumentario constituye uno de los sistemas del cuerpo humano, responsable de la percepción y comunicación del organismo con su entorno y que además protege a los órganos y tejidos internos del ambiente. Este sistema está constituido por la piel o tegumento, considerado como el órgano de mayor tamaño en el cuerpo humano debido a que su extensión es de 2 m²; además de alcanzar un peso cercano a los 5 kg durante la etapa adulta y un espesor en la mayor parte del cuerpo que oscila entre 1 y 2 mm, siendo más gruesa en las palmas de las manos y las plantas de los pies y de menor espesor en los párpados. Asimismo, los anexos cutáneos o faneras constituyen una parte importante en este sistema, que incluye a los folículos pilosos, el cabello, las uñas, así como glándulas exócrinas sebáceas, sudoríparas y mamarias (Higashida, 2013; Ross & Wojciech, 2016).

Este sistema desempeña múltiples funciones en el cuerpo humano, entre ellas: actúa como mecanismo de protección mecánica e inmunitaria frente a agentes exógenos de carácter fisicoquímico y microbiano, mantiene la homeostasis mediante la termorregulación corporal y el equilibrio hídrico, favorece la detección de estímulos sensoriales, posee capacidad excretora y secretora, actúa como reservorio de tejido graso, y participa en la biosíntesis de la vitamina D (Castrillón et al., 2008; Serna et al., 2012a).

2.1.1. Tegumento

De acuerdo con su estructura, el tegumento se constituye por tres capas: la capa superior denominada epidermis, constituida de tejido epitelial estratificado queratinizado, un estrato intermedio llamado dermis compuesta por tejido conjuntivo denso y laxo, además de una capa de tejido conjuntivo especializado denominada hipodermis o tejido subcutáneo (Martínez & Domínguez, 2018).

2.1.1.1. Epidermis

La epidermis forma parte de los epitelios de revestimiento poliestratificado, originada a partir del ectodermo, cuya función principal es brindar protección al organismo contra cualquier agente lesivo y evitar la pérdida de líquidos. Se encuentra apoyada sobre la membrana basal, fundamental para su soporte, además de permitir el intercambio

entre el tejido epitelial y el tejido conjuntivo cutáneo e intervenir en procesos de diferenciación celular (Vela Romera, 2018). Se conforma de cinco capas o estratos bien definidos que se encuentran paralelos a la lámina basal (Brüel, *et al.*, 2015; Ross & Wojciech, 2016):

a) Estrato basal o germinativo:

Es la capa más profunda de la epidermis, y se compone de células madre que proliferan continuamente para la formación de nuevos queratinocitos de tamaño pequeño y forma cúbica o cilíndrica, con núcleos ovoides muy juntos y citoplasma con filamentos intermedios de citoqueratina (tonofilamentos), donde se distinguen además siluetas del retículo endoplasmático rugoso y numerosos ribosomas libres, unidos entre sí mediante puntos de adhesión o desmosomas, y se encuentran ancladas a la lámina basal mediante hemidesmosomas.

b) Estrato espinoso:

Tiene un espesor de 3-4 células o más, y a diferencia de la capa anterior, sus queratinocitos son de mayor tamaño, con forma poliédrica y con núcleos redondos y de ubicación central, y con una cantidad mayor de filamentos de queratina en el citoplasma, además de presentar múltiples evaginaciones citoplasmáticas semejantes a espigas, unidas entre sí por desmosomas.

c) Estrato granuloso:

Compuesto por 3-5 capas de células aplanadas, que en su citoplasma contienen gránulos de queratohialina con forma irregular y tamaño variable, compuestos por las proteínas profilagrina y tricohialina, promotoras de la aglomeración de los filamentos de queratina en tonofibrillas.

d) Estrato lúcido:

Es una capa adicional que únicamente se encuentra presente en las estructuras de contacto, como las palmas de las manos y las plantas de los pies, y está situado de forma intermedia entre el estrato granuloso y el estrato córneo. Se conforma por escasas capas de células aplanadas y densamente agrupadas, donde el núcleo y el contenido citoplasmático fueron destruidos.

e) Estrato córneo:

Corresponde a la capa más superficial de la epidermis, donde sus células se encuentran completamente diferenciadas, anucleadas y ausentes de organelos, rellenas de filamentos de queratina y con una membrana celular cubierta por una gran capa de lípidos, y donde las células son descamadas o exfoliadas de forma continua mediante la degradación de los desmosomas por enzima proteolíticas serina peptidasas de forma pH dependiente.

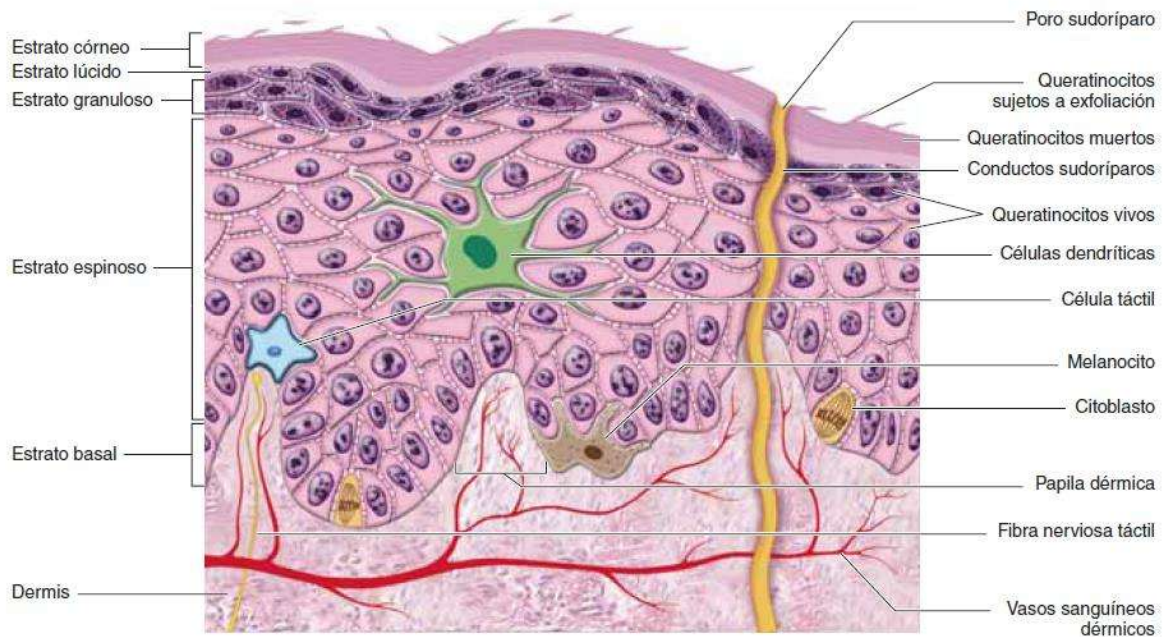


Figura 1. Anatomía de la epidermis. Tomado de *Anatomía y Fisiología: La unidad entre forma y función*. Sexta Edición (Saladin, 2013).

2.1.1.2. Dermis

La dermis es una capa conformada por tejido conjuntivo que cuenta con una matriz extracelular compuesta principalmente de fibras de colágeno, elastina y reticulina, y se encuentra separada de la epidermis a través de un contorno irregular denominado unión dermoepidérmica. Contiene una cantidad escasa de células, entre ellas encontramos fibroblastos, involucrados en la síntesis de colágeno, además de células inmunes, como macrófagos, células cebadas, linfocitos T, células plasmáticas y monocitos, por mencionar algunas. Se conforma de dos capas poco definidas: el estrato papilar, que es la capa más superficial, compuesta de tejido conjuntivo con

fibras de colágeno de tipo I y III laxas con proyecciones hacia el interior de la epidermis denominadas papilas dérmicas, conformadas por terminaciones nerviosas, algunas de ellas sensibles al tacto (corpúsculos de Meissner), vasos linfáticos y receptores sensoriales, así como capilares que irrigan y nutren a la epidermis; y el estrato reticular, formada por haces de fibras de colágeno tipo I de mayor grosor que los de la dermis papilar, que otorgan a la piel resistencia, distensibilidad y elasticidad, y se conecta con el tejido celular subcutáneo o hipodermis (Merino Pérez & Noriega Borge, s/f; Serna et al., 2012b).

2.1.1.3. Hipodermis

Es el estrato más profundo, correspondiente a la región subcutánea de la piel. Presenta un espesor variable, que se extiende desde la dermis reticular hasta la fascia muscular superficial. Se encuentra constituida por adipocitos maduros separados por tabiques conjuntivos finos que conforman a los septos interlobulillares, una continuación del tejido conjuntivo de la dermis reticular, y por ellos discurren vasos sanguíneos y nervios. Actúa como una barrera de protección mecánica frente a traumatismos, y además funciona como aislante térmico y reservorio energético. Respecto a su vascularización, forma dos plexos vasculares unidos por vasos que se intercomunican; el plexo vascular profundo situado entre dermis y el tejido adiposo subcutánea, y el plexo vascular superficial localizado en la zona más superficial de la dermis reticular (Tórtora & Derrickson, 2006).

2.1.2. Faneras

Las faneras o anexos se encuentran formadas exclusivamente de células epidérmicas. Entre las estructuras que los conforman se encuentran los folículos pilosos, el pelo y las uñas, aunque algunos autores consideran también a las glándulas sudoríparas y sebáceas. Los folículos pilosos se encuentran formados por tres segmentos: superior o infundíbulo, que abarca desde la desembocadura del conducto sebáceo hasta el orificio folicular y se queratiniza mediante los gránulos queratohialinos; medio o istmo, que va desde la desembocadura del conducto sebáceo hasta la inserción del músculo erector del pelo, es la porción más corta del folículo; e inferior, que comprende desde la inserción del músculo erector hasta el bulbo piloso constituye la parte más compleja del folículo piloso, ya que está formada

por varias estructuras, como la papila dérmica, responsable del crecimiento del vello, la matriz del pelo, vainas radiculares, y el pelo mismo (Navarrete, 2003).

El pelo es el tallo visible al exterior y la raíz situada en el espesor de la dermis está formado por células epiteliales queratinizadas. En el hombre existen dos variedades de pelo: vello y pelos gruesos; estos últimos pueden estar intensamente pigmentados. El pelo grueso está constituido por tres capas: a) médula, formada por dos o tres capas de células cúbicas conformadas por queratina blanda y separadas por espacios de aire o líquidos, b) corteza, es una capa gruesa compuesta por queratina dura. Sus células contienen gránulos finos de melanina que le dan el color, el cual es modificado por el aire que se acumula entre los espacios intercelulares, y c) cutícula, compuesta por células aplanadas escamosas de queratina dura que se cubren unas a otras como las tejas de un techo y muestran bordes libres dirigidos hacia el exterior, formando la cubierta superficial del pelo (Ross & Wojciech, 2016).

Las uñas son una modificación del estrato córneo que se produce en la punta de los dedos; se componen por laminillas de células muertas, nucleadas, llenas de queratina dura. Se les distingue la matriz o raíz y el limbo o cuerpo ungueal que es la parte visible de la uña (Saúl & Martínez, 2015).

2.1.3. Células epidérmicas

Como el resto de las vísceras, en el tegumento se encuentra una gran diversidad celular que contribuyen a su funcionamiento, distribuidas a lo largo de sus diferentes estratos. Por ejemplo, en el tejido epitelial podemos localizar cuatro especies celulares: los queratinocitos, que son células compuestas principalmente por queratina y que brindan estructura y rigidez a la epidermis; las células de Langerhans o células dendríticas cutáneas, encargadas de la captación, procesamiento y presentación de antígenos a las células T en los nódulos linfáticos para su activación, amplificando así la respuesta inmune; los melanocitos, responsables de la producción de melanina y protección de la piel de la exposición a los rayos UV; y las células de Merkel, asociadas con las terminaciones nerviosas sensitivas (Vela Romera, 2018).

Los queratinocitos son células altamente especializadas que constituyen alrededor del 80% del tejido epitelial, quienes llevan a cabo su maduración y diferenciación entre los diferentes estratos de la epidermis. Están compuestas principalmente por citoqueratinas, un grupo de proteínas estructurales expresadas en diferentes tipos y

concentraciones crecientes entre cada capa epitelial, de manera que le proporcionan rigidez y estructura a la piel. Además, juegan un papel importante en la respuesta inmune, ya que mediante la producción de péptidos antimicrobianos y citocinas proporcionan inmunidad ante microorganismos patógenos, así como una respuesta restitutiva frente a lesiones (Jiang et al., 2020).

La formación de los diferentes estratos se produce mediante un proceso conocido como queratinización o cornificación, considerado por diversos autores como una muerte celular especializada, debido a la pérdida del contenido celular y sustitución de este por queratinas tras su especialización en cada capa. Dicho proceso consiste en la diferenciación celular a partir de células madre unipotenciales presentes en el estrato germinativo (capa basal) para formar una porción de células maduras que pierden su capacidad de autorrenovación conforme emergen hacia la superficie, brindando estructura y funcionalidad al tejido, así como células con capacidad proliferativa para la renovación continua del epitelio (Le Bitoux & Haftek, 2008).

Por su parte, las células de Langerhans son células muy especializadas que provienen de la familia de células presentadoras de antígeno, que se localizan en las capas basales y suprabasales de la epidermis y representan la principal barrera hematopoyética. Según la región anatómica, su población puede variar: en la cabeza, la cara, el cuello y las extremidades es de 600 a 1,000 por mm^2 , mientras que en las regiones palmar, plantar, anogenital y en la mucosa oral es de sólo 200 por mm^2 . Son las únicas células epidérmicas que cuentan con receptores a Fc y C3b, expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) y pueden inducir la respuesta proliferativa de los linfocitos T (Castrillón et al., 2008).

En cuanto a los melanocitos, son células que conforman el 5% de las células presentes en la epidermis, originados a partir de los megaloblastos, células precursoras presentes en la cresta neural, a partir de la cual migran hacia la piel para su diferenciación. Su función es la producción de melanina, un pigmento que absorbe la radiación ultravioleta y protege a los queratinocitos, evitando que produzca daños irreversibles en su genoma (Manteca Martín, 2013).

Otro tipo de células representativas del tegumento son las células de Merkel, quienes representan entre el 1 y el 5% de las células epidérmicas. Aunque se desconoce su origen con exactitud, se cree que provienen de la cresta neural, para luego

diferenciarse en la epidermis. Se localizan en el estrato basal y su número varía según su localización anatómica, siendo abundante en la región palmoplantar y en los folículos pilosos. Poseen en su citoplasma gránulos neurosecretores, filamentos de queratina y pequeños desmosomas que permiten su unión a los queratinocitos cercanos (Vela Romera, 2018).

2.1.4. Células de la dermis

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso de gran importancia en el tejido conjuntivo conectivo, ya que son los encargados de producir las proteínas de matriz extracelular de una gran variedad de órganos, incluyendo a la dermis en la piel, con el objetivo de mantener la homeostasis tisular normal y de manera regenerativa. Gracias a citocinas y factores de crecimiento específicos, los fibroblastos dérmicos humanos pueden diferenciarse en miofibroblastos, una variedad que además de producir una mayor cantidad de colágeno respecto a otro tipo de fibroblastos, presenta actina de músculo liso, que le otorga a éstos contractilidad celular. Además, juegan un papel importante en la estimulación de queratinocitos para su proliferación y diferenciación (Gomes et al., 2021).

Antiguamente se consideraba a los miofibroblastos como el linaje celular terminal de los fibroblastos; sin embargo, se ha demostrado que esto no es así, ya que se ha demostrado que este linaje se forma y actúa temporalmente, por lo que están sujetos a procesos de inactivación y desdiferenciación en las últimas etapas del proceso regenerativo, de manera que la expresión de genes asociados a su contractilidad cesa de manera gradual, por lo que la plasticidad de estas células resulta un tanto diferente a las células epiteliales presentes en los folículos pilosos (Plikus et al., 2021).

2.2. LESIONES CUTÁNEAS

La piel, al ser el órgano más expuesto del cuerpo humano, también es el de mayor predisposición a sufrir cualquier tipo de lesión causada por agentes físicos y químicos, capaces de alterar su estructura y funcionalidad. Entre los tipos de lesión más comunes se encuentran heridas, quemaduras y contusiones.

2.2.1. Quemaduras

Una quemadura es una lesión tisular resultante del contacto directo con líquidos corrosivos, gases, fuego y/o superficies calientes, produciendo una destrucción

inmediata del tejido epitelial, edema y/o pérdida de líquido intravascular, además de afectar la capacidad de termorregulación cutánea y de exponer al tejido dañado a infecciones microbianas. Pueden clasificarse en función de su extensión, agente causal y profundidad, siendo este último aspecto el más utilizado en el área médica (Tabla 1); cuando la lesión sobrepasa el 25% de superficie corporal, el resto de los sistemas del organismo se ven comprometidos (Gómez, 2009a).

Tabla 1. Clasificación de las quemaduras según su profundidad. Tomada de *Quemaduras. Clínica y tratamiento*. Revista Farmacia Profesional. (Azcona, 2004).

TIPO	ASPECTO	TEJIDO DAÑADO	DOLOR	EVOLUCIÓN	EJEMPLO
1er grado	Superficie seca, eritema y sin exudación	Epidermis	Hipersensibilidad e hiperestesia espontánea, mayor al contacto	Epitelialización en 3-5 días No deja cicatriz	Quemaduras solares
2do grado superficial	Ampollas y eritema	Epidermis y parte de la dermis	Intenso dolor e hiperestesia al contacto, mayor que espontánea	Epiteliza en 7-14 días No deja cicatriz	Escaldadura por líquido caliente: aceite, agua. Objetos calientes: estufa, plancha
2do grado profunda	Punteado rojo sobre fondo blanquecino	Epidermis y dermis completa	Hiperestesia al contacto, igual que espontánea	Según la extensión. La curación dura un mes o más. Deja cicatriz. Puede precisar cirugía.	Quemaduras por llama: fuego, cigarrillos, velas Quemaduras eléctricas Explosión
3er grado	Superficie seca y dura; color variable	Destrucción de espesor dermoepidérmico; afectación del tejido subcutáneo, nervios y músculo	Anestesia de la zona	Lenta. Existe riesgo de infección profunda. Precisa tratamiento quirúrgico. Deja cicatriz.	Quemaduras por grandes fuegos Quemaduras químicas por abrasivos potentes

2.2.2. Contusiones

La contusión es una lesión traumática producida por golpes, compresiones o choques que dan lugar a la aparición de hematomas, magulladuras o aplastamientos del tejido tegumentario y, en ocasiones, puede enmascarar lesiones internas de mayor gravedad. En base a la intensidad del golpe, las contusiones pueden clasificarse en: 1) contusiones mínimas, donde el tejido no sufre alteraciones profundas y se produce únicamente eritema por vasodilatación en la zona lesionada, 2) contusiones de primer grado, donde se aprecia amoratamiento gradual del tejido como producto de la rotura de los capilares, y se acompaña de dolor y parálisis incompleta, 3) contusiones de segundo grado, caracterizada por la destrucción de vasos de mayor calibre, que inducen a la formación del hematoma en el sitio afectado, y 4) contusiones de tercer grado, donde se observa un aplastamiento intenso del tejido, dañando los tejidos subcutáneos y musculares al grado de provocar su muerte (Eguskiza et al., 2002; Gómez, 2009b).

2.2.3. Heridas

Una herida es una lesión causada generalmente por cortes y desgarros, que se caracteriza por la rotura de la superficie de la piel y la pérdida de tejido, y expone al interior de esta a microorganismos con potencial patógeno. En general, las heridas pueden ser de cuatro tipos: abiertas, contusas, incisas penetrantes y punzantes; existen otras clasificaciones que pueden agruparlas en base a su extensión, gravedad y agente causal, etcétera (Bosch, 2001; Eguskiza et al., 2002b).

2.3. RESTITUCIÓN TISULAR

El organismo cuenta con una serie de mecanismos fisiológicos y moleculares de curación con el propósito de contener el daño y restablecer la funcionalidad tisular. Generalmente, cuando la lesión sufrida en el tegumento se produce de manera superficial, la restauración del tejido de la zona dañada se lleva a cabo de forma completa, recobrando su funcionalidad, entonces se entiende que el proceso de curación fue mediante regeneración. En lesiones profundas, donde la recuperación del tejido se produce de manera incompleta, y se acompaña además por un encostramiento residual, se considera que el proceso de curación fue mediante reparación o cicatrización (Marcos & Ruiz, 2009a).

2.3.1. Regeneración

La regeneración puede definirse como la capacidad que poseen ciertos organismos para restaurar un tejido o bien, reemplazar una parte del cuerpo tras la pérdida o lesión de este, ya sea de forma fisiológica o accidental, como resultado de la proliferación y diferenciación de células específicas. Este fenómeno puede observarse tanto en especies vegetales o animales; sin embargo, es menos común que suceda en vertebrados, especialmente en mamíferos, debido a que conforme maduran van perdiendo su capacidad regenerativa, tal como se observa durante el desarrollo humano, donde las células embrionarias presentan una alta capacidad de regeneración, y que tras su diferenciación en células especializadas se reduce en gran medida, hasta ser notoriamente inferior en la etapa adulta, por lo que tras una lesión o pérdida de alguna parte del cuerpo, no puede restaurarse; sin embargo, en otras especies invertebradas se puede observar que sin importar su fase de desarrollo siguen conservando esta cualidad, por lo que tras un corte o pérdida de una extremidad pueden generar una nueva, sin comprometer la fisiología del órgano u tejido nuevo (Gurtner et al., 2008; Hernández Ramírez, 2010).

2.3.2. Cicatrización

De acuerdo con Hesequio (2015), la cicatrización se define como “la reparación de una herida con tejido fibroso mediante un proceso biológico complejo resultado de movimiento, división y síntesis proteica celular, lo cual genera un producto final de tejido no funcional denominado cicatriz”, que una vez formada, puede ser remodelada por largos periodos de tiempo, en función de diversos factores como la tensión cutánea, la predisposición genética del individuo, su localización y profundidad e incluso procesos infecciosos (Del pozo & Vieira, 2016)

En general, se conocen dos tipos de cicatrización: de primera intención o cicatrización primaria, que ocurre en heridas lineales donde no existe pérdida de tejidos, con bordes bien definidos, de cierre directo y rápida curación; por segunda intención o secundarias, que ocurre en heridas con bordes separados y con pérdida de tejido, además de presentar un compromiso infeccioso, en cuya brecha se llena de tejido de granulación bien definido, con un cierre de tiempo prolongado. Algunos autores incluyen un tercer tipo, que se produce cuando la herida, además de presentar las condiciones de la de segunda intención, es manipulada por un especialista con la

finalidad de redireccionar el proceso de cicatrización a una cicatrización primaria mediante el uso de puntos de contención, injertos o colgajos (Perdomo et al., 2018, Valer & Repetto, n.d.).

2.3.3. Fisiología de la restitución tisular

El proceso de curación de las heridas es complejo, activo, dinámico e involuntario, que sin importar el tipo de lesión o su extensión, involucra una serie de eventos como la coagulación, inflamación, proliferación y remodelación del tejido lesionado, por lo que en base a ello el proceso de cicatrización está compuesto por cuatro fases interconectadas y superpuestas entre sí (Figura 2): fase de respuesta inmediata, fase de inflamación, fase de proliferación y fase de maduración, las cuales serán descritas a continuación (Cruz, 2003).

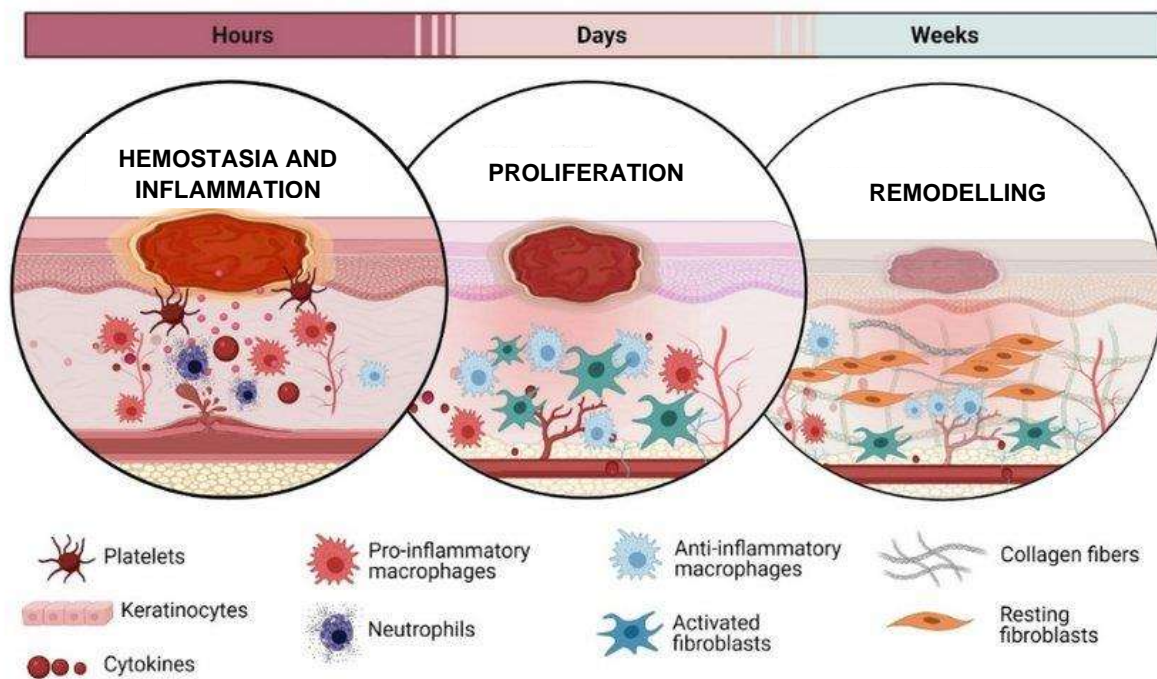


Figura 2. Etapas del proceso de reparación tisular. Modificada de Immunomodulatory Properties of Host Defence Peptides in Skin Wound Healing. Revista Blomolecules. (Petkovic et al., 2021).

2.3.3.1. Fase hemostática

Tiene una duración de hasta 15 minutos y se desarrolla de forma inmediata tras la lesión tisular. Comienza con la respuesta de contracción muscular de los vasos

sanguíneos, para la disminución de la irrigación vascular y cubrir el sitio de lesión mediante un coágulo de fibrina, que comienza con la activación plaquetaria inducida por sustancias liberadas a partir del endotelio vascular, como el Factor de Von Willebrand, una glucoproteína que permite la unión entre las plaquetas y las fibras de colágeno, y una vez activas, formarán agregados y modificarán su estructura para secretar sustancias que favorezcan a la formación del trombo de fibrina mediante la cascada de coagulación. La cascada de coagulación comprende una serie de eventos enzimáticos que se llevan a cabo mediante dos vías: una vía extrínseca, que se encuentra mediada por el factor de exposición tisular liberado en el sitio de lesión y que actuará como factor para la activación del factor X, catalizada por el factor VII, y una vía intrínseca, que se produce por la activación de los factores XII y IX, estimulados por la agregación plaquetaria y el Factor de Von Willebrand; y ambas vías convergen para obtener fibrina. El coágulo formado tiene funciones que facilitan la continuidad a las fases inflamatorias y de regeneración tisular; además que las plaquetas secretan sustancias quimioatrayentes de leucocitos propios de la inmunidad innata (Guarín-Corredor et al., 2013; Lucha Fernández et al., 2008).

2.3.3.2. Fase inflamatoria

La inflamación es un proceso fisiológico defensivo natural del organismo, que se produce como respuesta a cualquier agente lesivo de carácter microbiano y ante estímulos generados a partir de una lesión tisular, con el objetivo de eliminar al agente lesivo y estimular a la reparación del tejido dañado. A nivel tisular, se caracteriza por la presencia de los signos cardinales propuestos por Celso: dolor, calor, tumor y rubor, y a nivel vascular, se producen eventos como la pérdida de permeabilidad capilar, reclutamiento y acumulación de leucocitos en el sitio dañado y la liberación de mediadores pro y antiinflamatorios (Chen et al., 2018). Esta fase es considerada como la fase de protección del proceso de cicatrización y comienza con la activación del factor de Haegman, que induce a la liberación de bradiquinina, una sustancia vasoactiva que facilita la activación del complemento por las vías clásica y alterna para la producción de anafilotoxinas C5a y C3a, moléculas que aumenten la permeabilidad vascular y estimulan la liberación de histamina y la producción de mediadores proinflamatorios derivados del ácido araquidónico, como prostaglandinas y leucotrienos, además de actuar como quimioatrayentes de células propias de la

inmunidad innata, como neutrófilos y monocitos al sitio de lesión o foco inflamatorio (Cruz, 2003).

Los neutrófilos son las primeras células que llegan a la zona dañada, y se encargan de destruir el tejido dañado mediante la liberación de enzimas proteolíticas, además de fagocitar cualquier tipo de microorganismo presente; y una vez atrapados en el coágulo sufren de muerte celular por apoptosis. Los monocitos por su parte viajan a través del sistema circulatorio y se unen a la pared del endotelio para migrar hacia el sitio de daño y se diferencian en macrófagos capaces de secretar citocinas y otras moléculas clave para la reparación (Tabla 2), quienes estimularan a los fibroblastos y células epidérmicas para sustituir el tejido faltante (Marcos & Ruiz, 2009b).

Tabla 2. Factores de crecimiento que participan en la restitución tisular. Tomada de Schwartz. *Principios de Cirugía*.

FACTOR DE CRECIMIENTO	ORIGEN CELULAR EN LA HERIDA	EFFECTOS CELULARES Y BIOLÓGICOS
PDGF	Plaquetas, macrófagos, monocitos, células del músculo liso, células endoteliales	Quimiotaxis: fibroblastos, músculo liso, monocitos, neutrófilos Mitogénesis: fibroblastos, células del músculo liso Estimula la angiogénesis Estimula la síntesis de colágeno Estimula la reepitelización Modula la remodelación hística
FGF	Fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, células del músculo liso, condrocitos	Estimulación de angiogénesis (por estimulación de la proliferación y la migración de células endoteliales) Mitogénesis: mesodermo y neuroectodermo
HGF	Fibroblastos	Estimula fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, mioblastos Suprime la inflamación, formación de tejidos de granulación, angiogénesis y re-epitelización
KGF	Queratinocitos, fibroblastos	Homología importante con FGF; estimula queratinocitos
EGF	Plaquetas, macrófagos, monocitos	Estimula la proliferación y la migración de todos los tipos de célula epitelial
TGF α	Queratinocitos, plaquetas, macrófagos	Homología con EFG; se une a receptores de EGF Mitógeno y quimiotáctico para células epidérmicas y endoteliales

TGFβ	Plaquetas, linfocitos T, macrófagos, monocitos, fibroblastos, neutrófilos, queratinocitos	Estimula la angiogénesis Estimula la quimiotaxis leucocitaria TGF-β1 estimula la producción de matriz de la herida (fibronectina, glucosaminoglicanos de colágeno); regulación de la inflamación TGF-β3 inhibe la formación de cicatriz
IGF-1 /IGF-2	Plaquetas	Promueve la síntesis de proteínas / matriz extracelular Incrementa el transporte de glucosa en la membrana
VEGF	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos	Mitógeno para células endoteliales (no fibroblastos) Estimula la angiogénesis Proinflamatorio
IL1	Macrófagos, leucocitos, queratinocitos, fibroblastos	Proinflamatorios Estimulan la angiogénesis, la re-epitelización y la remodelación tisular
IL4 IL6	Leucocitos Fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y queratinocitos	Estimula la síntesis de colágeno Estimula la inflamación, la angiogénesis la re-epitelización, el depósito de colágeno y la remodelación tisular
Activina Angiopoyetina 1/2 CX3CL 1	Queratinocitos, fibroblastos Células endoteliales Macrófagos, células endoteliales	Estimula la formación de tejido de granulación Estimula la angiogénesis Estimula la inflamación, la angiogénesis y el depósito de colágeno
GMCSF	Macrófagos/monocitos, células endoteliales, fibroblastos	Estimula la diferenciación / proliferación de macrófagos

2.3.3.3. Fase de proliferación

Esta fase inicia con la estimulación de la migración colectiva de los fibroblastos desde la dermis hacia el sitio lesionado por medio de las citocinas y PDGF, para llevar a cabo la formación de una matriz extracelular temporal, que sintetiza fibras de colágeno de tipo I, II y III y la sustancia fundamental; además los macrófagos producidos durante la fase inflamatoria se encargan de reabsorber el coágulo hacia la superficie, por lo que disminuye su espesor para permitir la formación de fibras de colágeno similares a la dermis y a su vez se produce la neovascularización (angiogénesis) estimulada

por las células del endotelio vascular, PDGF e IL-8 en el tejido nuevo, para proporcionar el oxígeno y nutrientes necesarios para la biosíntesis del colágeno. Asimismo, se lleva a cabo la reepitelización de la epidermis desde los bordes de la herida mediante la activación de células madre epidérmicas, quienes proliferan y se diferencian en células epidérmicas maduras (Marcos & Ruiz, 2009b).

2.3.3.4. Fase de maduración

Esta última fase comienza al mismo tiempo que la anterior, y es también conocida como fase de remodelado, debido a que los fibroblastos producen además de colágeno, otros componentes clave de la nueva matriz extracelular, como ácido hialurónico, proteoglicanos y fibronectina, fundamentales para la correcta evolución de la cicatriz; y conforme pasa el tiempo, el ácido hialurónico y la fibronectina desaparecen y los haces de colágeno crecen, otorgando elasticidad a la cicatriz (Cruz, 2003).

2.4. TIPOS DE CICATRICES

Una vez finalizado el proceso de curación, la elevación de la cicatriz no debe sobrepasar a la elevación natural del tegumento circundante y debe ser visible únicamente como una fina línea de color pálido sobre la piel; sin embargo, durante el desarrollo o evolución de las cicatrices, entre el 38 y 70% pueden sufrir alguna alteración: ya sea debido a una alimentación inadecuada, factores genéticos, disfunción del sistema inmunológico, comorbilidades de tipo crónico-degenerativas como la diabetes mellitus o aterosclerosis, que pueden conducirlos a tornarse antiestéticas y desfigurantes. Por ello, basado a su morfología, se pueden distinguir cuatro tipos de cicatrices (Del pozo & Vieira, 2016b; Eming et al., 2014):

- a) Eutróficas:** también denominadas normotróficas; son aquellas donde el tejido cutáneo recobra completamente su integridad y presentan una superficie y textura homogénea y ausente de telangiectasias.
- b) Hipertróficas:** generalmente se forman durante el primer mes de evolución del proceso de reparación en zonas de presión o movimiento, y se caracterizan por la sobreelevación del tejido, con aspecto eritematoso y consistencia dura, y sin exceder los límites del sitio lesionado.
- c) Queloides:** se producen como consecuencia de una alteración hereditaria del metabolismo del colágeno, donde los fibroblastos proliferan de manera

acelerada, produciendo altos niveles de colágeno tipo I. Son lesiones firmes, de mayor dureza que las hipertróficas, y en ocasiones de aspecto nodular y eritematoso o de tonalidad rojo-violáceo, y a diferencia de las hipertróficas, se extienden fuera de los límites del sitio de lesión.

- d) Atróficas:** se producen como consecuencia de la destrucción del colágeno debido a enfermedades inflamatorias cutáneas como la varicela o el acné, o bien, debido a traumatismos, procesos quirúrgicos o por tratamientos con láser. Suelen aparecer como depresiones cutáneas, de aspecto eritematosas, que durante el proceso de cicatrización pueden tornarse en cicatrices hipopigmentadas y fibróticas.

2.5. TERAPIAS COADYUVANTES A LA CICATRIZACIÓN TISULAR

El establecimiento de un tratamiento adecuado para facilitar la curación y coadyuvar a la reparación del tejido cutáneo dañado dependen de la gravedad y el tipo de lesión. Además, es importante destacar que los tratamientos convencionales no se limitan únicamente a inducir a la reparación del tejido, sino que se utilizan para prevenir complicaciones durante la recuperación del tejido. Entre los diversos tratamientos podemos encontrar ciertos fármacos antiinflamatorios como corticosteroides, algunos antisépticos e incluso antibióticos.

Los corticosteroides como la triamcinolona son el tratamiento de primera elección y se pueden utilizar solos o tras la escisión de la cicatriz queloide o hipertrófica, que potencia la actividad de la colagenasa y reduce el tamaño de la lesión; sin embargo, posee múltiples efectos adversos, además de contribuir a complicaciones anatómicas como atrofia del tejido circundante, aparición de telangiectasias y despigmentación de la piel. Por otro lado, los apósitos han resultado ser de gran utilidad en el tratamiento de las heridas abiertas, ya que facilitan la curación y la absorción del fármaco administrado, como la gelatina de óxido de zinc, empleados para la inflamación de la piel y las úlceras en dermatitis por estasis, y apósitos hidrocoloides, que aceleran la cicatrización del tejido afectado. En el caso de las quemaduras, tras una limpieza profunda, se utilizan ungüentos y cremas como la bacitracina y la sulfadiazina de plata, para facilitar el cierre de la herida y prevenir infecciones (Gómez, 2009^a, Hesequio, 2015).

Paradójicamente, otros fármacos son empleados como anti cicatrizantes. Tal es el caso del 5-fluorouracilo y la mitomicina, debido a que evitan la proliferación celular, inhibiendo de forma selectiva la formación de matriz extracelular, previniendo así la cicatrización ocular tras cirugías de glaucoma (Berman et al., 2017; Bulstrode et al., 2005; Cabourne et al., 2015).

2.5.1. Terapias en medicina regenerativa

La medicina regenerativa es un área multidisciplinaria relativamente nueva, considerada como la medicina del futuro, ya que es utilizada como una herramienta que permite reemplazar y/o generar células y tejidos, e incluso órganos humanos con el propósito de restaurar o restablecer la función normal del sitio dañado; ésta se centra en el empleo de cultivos celulares, que pueden definirse como un conjunto de procedimientos tecnológicos que de manera artificial reproducen las condiciones fisiológicas, bioquímicas y genético-moleculares originales en las que las células se desarrollan para favorecer su crecimiento, división, multiplicación y diferenciación. Dichos cultivos pueden ser generados a partir de biopsias de tejido fresco, o bien, mediante líneas celulares preestablecidas (Figura 3), mantenidas en medios específicos que contienen los nutrientes necesarios para su supervivencia, ya sea de forma adherente o en suspensión, e incluso, en forma tridimensional. Además, pueden ser genéticamente modificadas para preservar su capacidad proliferativa si así se requiere (Benítez, 2011; Smits et al., 2017).

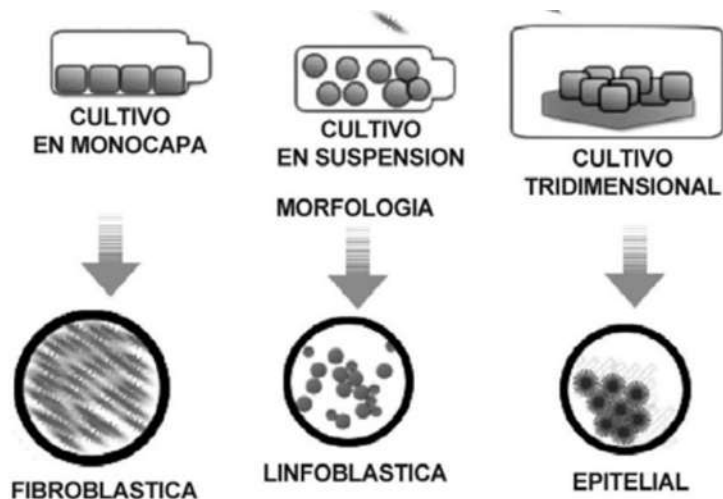


Figura 3. Tipos de cultivos celulares. Modificada de *Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. (Tavira et al., 2009).

El empleo de los cultivos celulares es sumamente amplio y comprende desde estudio preclínico de sustancias químicas sintetizadas *de novo* y de origen vegetal para la producción de nuevos fármacos y formulaciones cosméticas, así como en el desarrollo de vacunas. Además son de gran utilidad para la fabricación de implantes o estructuras biocompatibles que funcionen como andamios para la regeneración de tejido, para desarrollar organoides e injertos que reemplacen órganos lesionados, entre otros, lo que conlleva a la bioingeniería de tejidos (Flores Macías, 2017; Martínez-Santamaría et al., 2012).

2.5.2. Células troncales mesenquimales

Una de las herramientas más utilizadas dentro de las investigaciones biomédicas para el estudio en regeneración celular humana es el manejo y uso de células troncales mesenquimales (CTM), las cuales son células madre adultas multipotenciales aisladas y caracterizadas por primera vez por Alexander Friedenstein y colaboradores en 1950, las cuales son reconocidas por su nivel de plasticidad para formar linajes celulares relacionados con la formación de tejido óseo, cartilaginoso y adiposo (Socarrás-Ferrer et al., 2013).

Dichas células pueden obtenerse a partir de una amplia variedad de tejidos y órganos entre ellos la gelatina de Warton del cordón umbilical, la placenta, tejido subcutáneo y médula ósea, membrana sinovial y pulpa dental, por mencionar algunos, los cuales son tratados mediante diversas técnicas mecánicas y químicas para la disgregación tisular y, por ende, permitir el aislamiento de estas para su posterior cultivo y amplificación (Castro Manreza & Montesinos Montesinos, 2015).

Dentro de la ingeniería celular e ingeniería de tejidos han demostrado ser una herramienta de gran utilidad para estimular a la regeneración de tejidos como la piel humana, donde mediante la producción de un sinfín de compuestos celulares denominado secretoma (Figura 4), el cual actúa como una fuente rica en proteínas como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, así como factores de transcripción y proteasas que estimulan a células circundantes del tejido dañado para su respectiva activación, proliferación y diferenciación, con el propósito de recuperar la homeostasis tisular tras una lesión (Rodríguez Saenz et al., 2018).

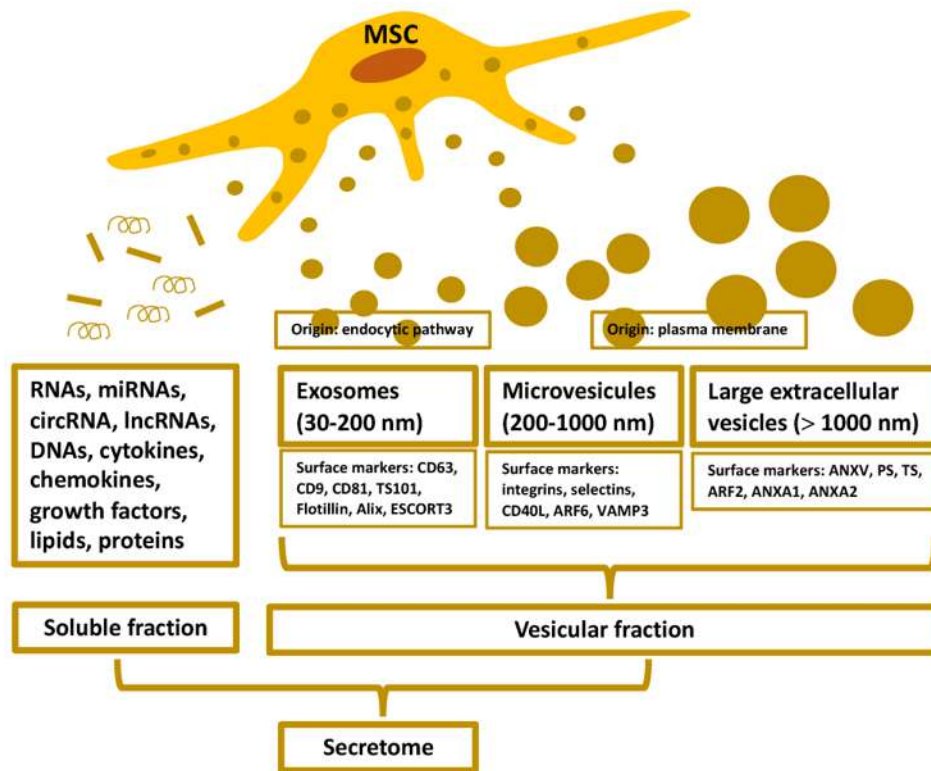


Figura 4. Secretoma de células troncales mesenquimales. Tomada de *Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases*. Revista Cells. (Múzes & Sipos, 2022).

2.5.3. Modelos de estudio de restitución tisular

En últimos años se ha estudiado ampliamente el proceso de regeneración y cicatrización, con el objetivo de comprender los mecanismos implicados y permitir así el desarrollo de terapias que puedan acelerar y/o mejorar la capacidad curativa del organismo. Debido a la complejidad que representa, se ha desarrollado un especial interés en el estudio de las etapas de proliferación y maduración, con el objetivo de comprender el comportamiento celular de las diversas estirpes participantes, por lo que se han desarrollado diversos modelos para su estudio tanto de forma *in vitro* como *in vivo* (Wilhelm et al., 2017).

Dentro de los estudios *in vitro* destaca el ensayo de cierre de heridas por *scratching* (Figura 5), siendo considerado como el modelo por excelencia para el estudio de la restitución tisular, y ampliamente utilizado para evaluar la actividad cicatrizante y/o regenerativa de metabolitos secundarios obtenidos a partir de extractos vegetales o del extracto de plantas de uso medicinal, así como para fines cosméticos. Consiste en utilizar cultivos 2D de células epiteliales y fibroblásticas en monocapa, quienes sufren

una incisión central o “lesión” de manera mecánica, ya sea por corte, presión, o mediante láser para posteriormente analizar la capacidad migratoria de las células de la periferia hacia el sitio de lesión (Cappiello et al., 2018; D’Agostino et al., 2019) .

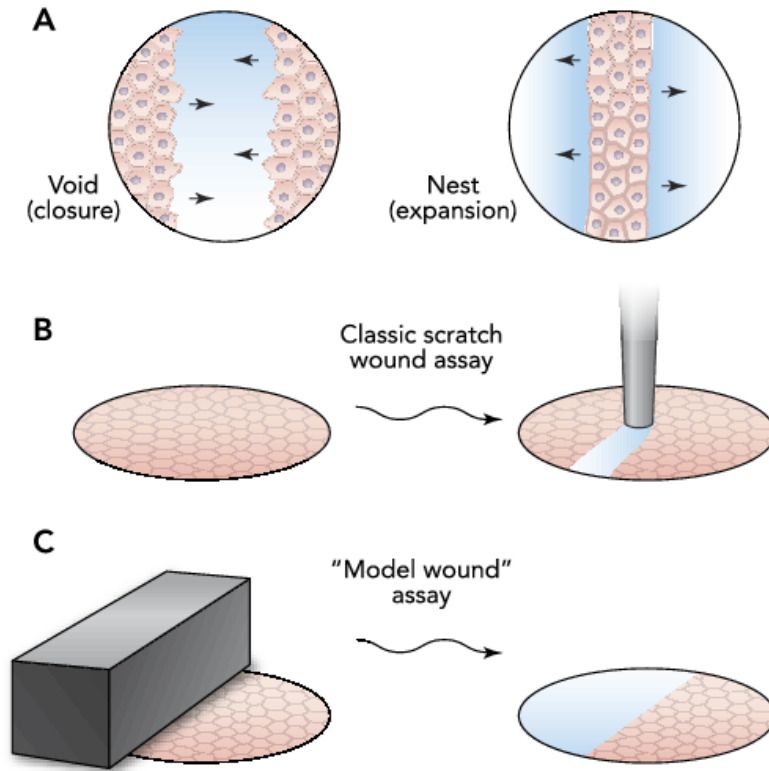


Figura 5. Ensayo de cierre de herida *Scratching*. Tomada de *Collective Cell Migration: A Mechanistic Perspective*. Revista Physiology. (Vedula et al., 2013).

Asimismo, basado en el principio del ensayo por *scratching* se han desarrollado cultivos en 3D organoides (Figura 6), los cuales permiten estudiar de forma más amplia el comportamiento restitutivo tisular, ya que debido al desarrollo de matriz extracelular por parte de las células presentes en el cultivo se puede analizar las interacciones célula-matriz y proporciona un panorama fisiológico más cercano al ocurrido de forma natural. Recientemente se han desarrollado cultivos 3D de tipo esferoide (Figura 6), los cuales al igual que los cultivos de tipo organoide permiten estudiar las interacciones célula-célula y célula-matriz, la organización y cinética de crecimiento celular, así como el análisis molecular de genes de interés. (Fennema et al., 2013; Langhans, 2018; Park et al., 2021; Ryu et al., 2019)

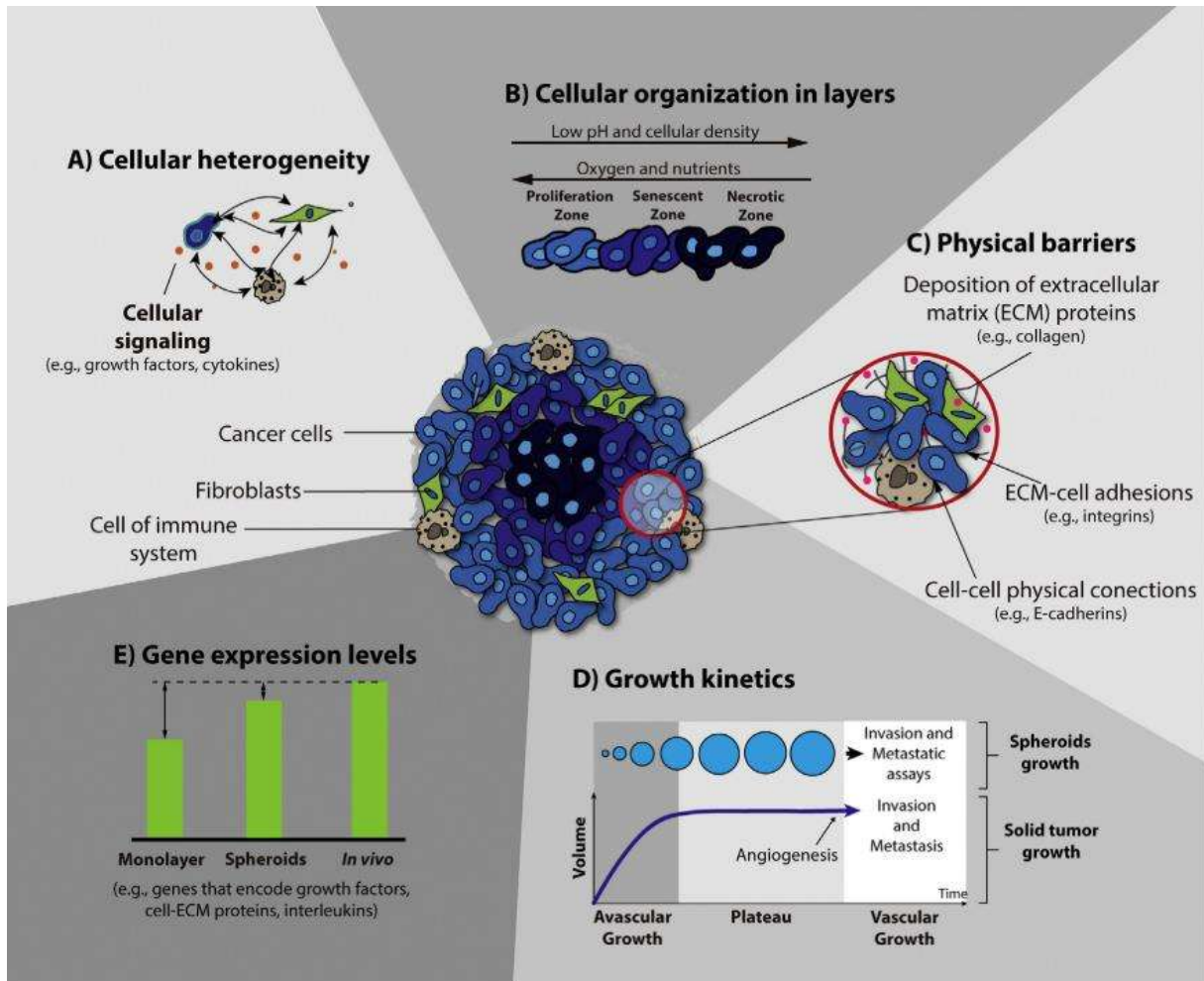


Figura 6. Cultivos celulares 3D de tipo esferoide. Tomada de *3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis*. Revista Biotechnology Advances. (Costa et al., 2016).

Por otra parte, se han desarrollado diversas estrategias para el estudio de las fases inflamatoria, proliferativa y de remodelado en la restitución tisular, empleando una amplia variedad de especies como modelos *in vivo*, entre los que se encuentran algunos peces, anfibios e incluso reptiles, debido a su capacidad regenerativa endógena. Aunque de forma clásica se emplean cerdos, conejos y roedores, quienes pueden ser incluso modificados genéticamente para evaluar de forma más específica la evolución del proceso reconstitutivo. No obstante, entre los ensayos de curación de heridas podemos encontrar modelos de cicatrización de heridas por quemadura, escisión, incisión, modelos de úlcera por isquemia-reperfusión, herida de piel isquémica, entre otros, empleados tanto en especímenes sanos como comprometidos por patologías crónico-degenerativas como Diabetes Mellitus (Gawronska-Kozak & Bukowska, 2017; Sami et al., 2019). Asimismo, se han reportado diversos trabajos

donde utilizan humanos como modelo de estudio asociados al estudio de la patogénesis y fisiología de la cicatrización cutánea; sin embargo, su uso se limita a ensayos clínicos (Ud-Din & Bayat, 2017).

Existen otros estudios moleculares empleados de forma complementaria para identificar elementos clave en las diversas vías señalización celular asociadas a la restitución tisular en los modelos *in vitro* e *in vivo*. Los más comunes son PCR en tiempo real (RT-PCR), que permite evaluar la expresión de genes asociados al proceso de recuperación del tejido, y Western Blott, que permite cuantificar la expresión de proteínas involucradas en la formación de la matriz extracelular (Abate et al., 2020; D'Agostino et al., 2020).

2.6. METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL

Las plantas cuentan con un sistema metabólico complejo, que les permite la obtención y el aprovechamiento de un sinnúmero de nutrientes a partir de moléculas de carbono, nitrógeno y energía presentes en el entorno natural. Esto conduce a la producción de una gran cantidad de sustancias químicas o metabolitos, con el propósito de preservar la vida de la planta. Algunos de estos metabolitos ejercen una gran influencia en el crecimiento y desarrollo vegetal, así como en su reproducción, por lo que son denominados metabolitos primarios. Sin embargo, existen otro tipo de compuestos derivados del metabolismo primario, sin relevancia fisiológica aparente, pero que juegan un papel fundamental en la adaptación de la planta a su entorno. Estos son conocidos como metabolitos secundarios o productos naturales, quienes cumplen un rol más asociado a la supervivencia de la planta. Actúan como quimioatrayentes de especies polinizadoras y dispersoras de semillas y frutos, sirven como defensa ante herbívoros, insectos y microorganismos patógenos, e incluso les permiten competir con otras especies vegetales por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes, además de brindarles protección a la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011; Sepúlveda et al., 2003a).

A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios o productos naturales se producen en pequeñas cantidades, y se encuentran distribuidos en diversas partes de la planta, como hojas y tallos, así como flores y frutos, responsables de su coloración y olor. Además, su producción puede verse restringida a un género o familia en particular. De acuerdo con su estructura química, estos pueden ser

divididos en fenoles, alcaloides, glucósidos, terpenos, siendo estos últimos, en conjunto con los alcaloides los más estudiados por la comunidad científica, debido a sus propiedades medicinales (Ojito-Ramos & Portal, 2017).

2.6.1. Fenoles

Los fenoles son un gran grupo de moléculas cuya estructura se caracteriza por poseer uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Son compuestos con gran capacidad antioxidante, responsables de dar color, sabor y características sensoriales a las plantas, y juegan un papel importante en el metabolismo, crecimiento y reproducción vegetal, además de actuar en defensa contra patógenos externos, radiación UV y organismos depredadores. Se encuentran representados por los fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanos, taninos y de forma más compleja, lignina (Martín, 2018; Peñarrieta et al., 2014).

2.6.1.1. Flavonoides

Los flavonoides pertenecen a la familia de los fenoles, y pueden definirse como metabolitos aromáticos de bajo peso molecular que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, en forma de O- glicósidos o como agliconas libres, formados a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, así como de unidades de acetato. Presentan un esqueleto común de difenilpiranos, compuesto por dos anillos fenólicos ligados a un anillo de pirano, que pueden formar o no un tercer anillo y tener al menos tres grupos hidroxilo fenólicos. Uno o más grupos hidroxilos del núcleo están unidos a residuos de carbohidratos simples, predominantemente D- glucosa, así como D-galactosa, D-ramnosa y D-xilosa y al ácido D-gucorónico (Martínez-Flórez et al., 2002).

Básicamente, las funciones de los flavonoides son variadas: actúan como señalizadores químicos para los insectos, guiándolos hacia el néctar de las plantas, fungen como bioindicadores que les permitan reconocer plantas apropiadas para su alimentación y estimulan la oviposición; además, protegen a las plantas de los rayos de luz UV emitidos por el sol, microorganismos bacterianos o fúngicos, insectos, animales herbívoros e incluso de la polución ambiental. En el ámbito médico, se ha demostrado que inhiben una gran variedad de enzimas, incluyendo aquellas involucradas en la síntesis de eicosanoides (Enciso & Arroyo, 2011; Treutter, 2006).

2.6.2. Alcaloides

Son compuestos heterocíclicos de bajo peso molecular, presentes en aproximadamente el 20% de las especies vegetales y fisiológicamente activos en el ser humano. Contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula base, y se sintetizan principalmente a partir de los aminoácidos triptófano, tirosina, histidina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, o a partir de purinas. Son responsables de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, al impedir la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos. Además, juegan un rol toxicológico importante ya que, debido a su similitud estructural con diversos neurotransmisores, tienen la capacidad de bloquear neuroreceptores involucrados en la transducción de la señal neuronal y canales iónicos de artrópodos y vertebrados (Loyola-Vargas et al., 2004; Meléndez-Gómez & Kouznetsov, 2005).

2.6.3. Terpenos

Los terpenos son biomoléculas de naturaleza lipídica de tipo insaponificables, considerados el grupo más numeroso de metabolitos secundarios existentes, presentes en los aceites esenciales y las resinas vegetales, además de representar una fuente importante de compuestos de uso industrial y farmacéutico (Castillo, 2015; Villamizar et al., 2010).

2.6.3.1. Biosíntesis de terpenos

Para la formación de terpenos a nivel vegetal se requiere la unión unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) que puede obtenerse a partir de dos rutas metabólicas, una de ellas dependiente del ácido mevalónico o mevalonato (MVA), y otra independiente de este compuesto. La vía del MVA considerada como la vía canónica para su producción. Esta se ejecuta en el citoplasma celular de las plantas (e incluso en células de algunos animales), donde la célula emplea acetilCoA como molécula precursora para la obtención de MVA, el cual posteriormente es metabolizado en tres reacciones para obtener isopentenil fosfato (IPP) y con ello, dar lugar a la producción de terpenos. No obstante, el IPP puede producirse también a nivel de citosol, mediante una ruta alterna al MVA denominada ruta de 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato o ruta de deoxixilulosa-5-fosfato ya que este sirve de precursor para la obtención del IPP (Figura 7) (Firn, 2010; Majumdar & Roy, 2019).

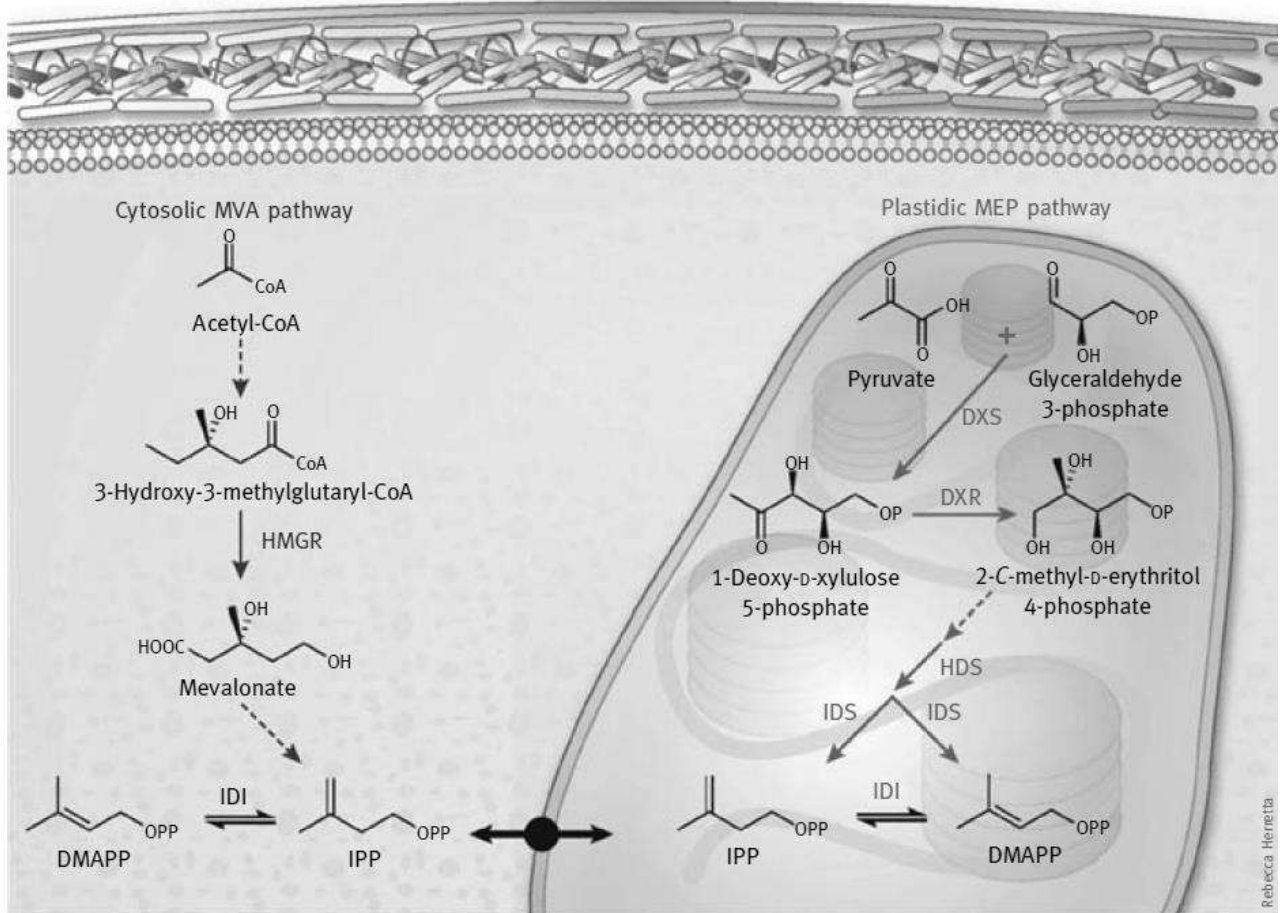


Figura 7. Principales rutas metabólicas para la obtención de precursores de isopreno/terpenoides. Tomada de *Nature's Chemicals. The Natural Products that shape our world* (Firn, 2010).

Como metabolitos secundarios son de gran importancia para el crecimiento y supervivencia vegetal, ya que muchos de estos compuestos son fitohormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), pigmentos de tipo carotenoide, clorofilas y esteroides. Asimismo, actúan como señalizadores químicos que contribuyen a prevenir la depredación de la planta por especies herbívoras, repeler algunos insectos o presentar actividad antimicrobiana contra patógenos (Sepúlveda et al., 2003b).

Tomando en cuenta la amplia variedad de terpenos que existen en la naturaleza, estos pueden clasificarse en base con las unidades de isopreno que presentan, tal como se muestran a continuación:

Tabla 3. Clasificación de terpenos. Tomada de *Educamadrid* (n.a).

TERPENOS	UNIDADES DE ISOPRENO	FUNCIONES	EJEMPLOS
Monoterpenos	2	Aromas y esencias de plantas	Geraniol, mentol
Sesquiterpenos	3	Intermediario en la síntesis del colesterol	Farnesol
Diterpenos	4	Forma pigmentos y vitaminas	Fitol (clorofila), vitaminas A, E, K.
Triterpenos	6	Intermediario en la síntesis del colesterol	Escualeno: origina todos los esteroides
Tetraterpenos	8	Pigmentos vegetales	Carotenos y Xantofilas
Politerpenos	N	Aislantes	Látex, caucho

2.6.3.2. Triterpenos

Este grupo de metabolitos son considerados como los terpenos más abundantes del reino vegetal, distribuidos ampliamente en la corteza, raíces y hojas de las plantas, haciendo relativamente sencilla su obtención y su estudio. Su estructura base se encuentra conformada por 30 átomos de carbono como resultado de la unión de 6 unidades de isopreno, unidos de forma cíclica. Dentro de este grupo, se considera que los triterpenos pentacíclicos son los de mayor impacto en investigaciones biomédicas, debido a su amplitud en cuanto a su actividad biológica; siendo los ursanos, oleananos y lupanos sus principales representantes (Figura 8) (Bachořík & Urban, 2021; Ghiulai et al., 2020).

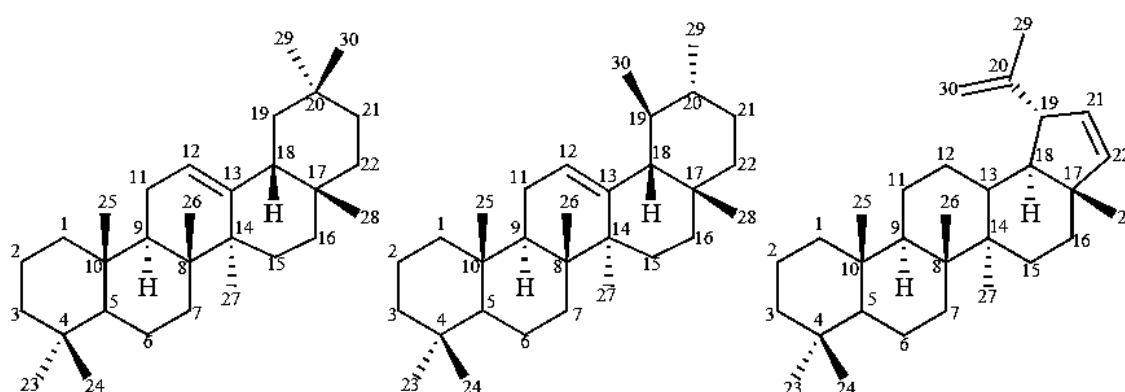


Figura 8. Estructuras químicas base de triterpenos de tipo oleanano, ursano y lupano (izq. a der.). Tomada de *The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their*

Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. Current Medicinal Chemistry (Alqahtani et al., 2013).

Los oleananos son un tipo de triterpenos pentacíclicos que se distinguen por la presencia de un grupo dimetilo gemial en posición C-20. Son considerados los triterpenos más abundantes, representando más del 50 % de triterpenos en la naturaleza, estando presentes en plantas medicinales como *Mangifera indica* y siendo el ácido oleanólico y el taraxerol algunos de los compuestos más representativos (Luchnikova et al., 2020).

En el caso de los triterpenos de tipo lupano son compuestos que presentan una estructura química, siendo considerado como el metabolito estrella de este grupo al lupeol, que se caracteriza por la sustitución del hidrógeno en posición 3 beta por un grupo hidroxilo. Este compuesto y sus derivados han demostrado presentar. (Kwon et al., 2015; Tolstikova et al., 2006).

Por su parte, los ursanos son moléculas que presentan dos grupos metilo en su estructura base, pero a diferencia de los oleananos no presentan un grupo geminal-dimetilo, sino que dichos radicales se encuentran distribuidos en posición C-19 y C-20 respectivamente, por lo que algunos autores los consideran sus isómeros estructurales. Se encuentran altamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en plantas de uso medicinal como *Centella asiática*. por presentar un grupo hidroxilo en posición 3 beta, como en el caso de la beta amirina, uno de los ursanos más caracterizados y estudiados, así como el ácido ursólico (Ipav et al., 2022; Mlala et al., 2019).

2.6.3.3. Aplicaciones terapéuticas de los triterpenos

Se ha demostrado que los terpenos pentacíclicos son moléculas altamente bioactivas, de manera que se ha descrito diversas aplicaciones terapéuticas para ellos. Una de ellas es su actividad como moléculas antivirales, observada en triterpenos como el ácido ursólico y el lupeol aplicadas al Virus de la Inmunodeficiencia Humana, ya que puede inhibir la actividad de las enzimas proteasa y transcriptasa reversa VIH-1 respectivamente, evitando así su replicación viral (Liu et al., 2022).

Por otro lado, algunos de ellos también han sido descritos como una alternativa terapéutica por su actividad antioxidante. Tal es el caso del Lupeol, quien ha

demostrado tener una actividad neuroprotectora en cerebros de ratón, lo cual podría abrir camino al desarrollo de nuevos tratamientos neurodegenerativos como el Alzheimer. Asimismo, el ácido oleanólico también presenta propiedades antioxidantes interesantes, aunque su aplicación más interesante ha sido frente a enfermedades metabólicas como la Diabetes Mellitus, controlando el estrés oxidativo presente en esta patología (Ahmad et al., 2020; Fernández-Aparicio et al., 2022).

2.7. ETNOBIOLOGÍA Y MEDICINA TRADICIONAL

La etnobiología es considerada una ciencia multidisciplinaria que se centra en el estudio de la interacción existente entre plantas, animales y humanos, y que mediante estudios etnobotánicos hace referencia al uso y manejo de las especies vegetales por el ser humano, tomando en cuenta el conocimiento tradicional y moderno existente de las mismas, incluyendo su uso como fuente de alimento, cosmético y principalmente medicinal, entre otros (Sreedevi et al., 2013). Por su parte, la medicina tradicional, también conocida como medicina popular se define como “la suma de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentales en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud, tanto física como mental”, que forma parte del patrimonio cultural de cada país y utiliza prácticas transmitidas de forma oral por generaciones desde centenares e incluso miles de años antes del desarrollo de nuestra medicina actual (OMS, 2013).

En los países subdesarrollados, particularmente en las zonas rurales, donde los individuos viven en situaciones de pobreza extrema y no cuentan con acceso a la atención médica primaria proporcionada por los sistemas de salud pública, y, por ende, tampoco a los fármacos modernos, recurren al uso de sus conocimientos en medicina tradicional para mejorar su estado de salud, la cual se basa principalmente en el uso de plantas medicinales, al ser el recurso más abundante, accesible y conocido. Sin embargo, la medicina tradicional va más allá de la botánica medicinal, ya que comprende otras técnicas como la fisioterapia, la hidroterapia, la quiropraxia, entre otras, encontrando una amplia gama de especialistas considerados terapeutas tradicionales, entre los cuales se encuentran los curanderos, yerberos, sobadores, parteras, entre otros, quienes además de emplear la herbolaria, llevan a cabo rituales ceremoniales, o bien, hacen uso de recursos animales como huevos, leche o miel, con el objetivo de aliviar los malestares del individuo enfermo (Alvarez et al., 1979; Castro Méndez, 2006; Pascual Casamayor et al., 2014).

En México la medicina tradicional es ampliamente utilizada, ya que cuenta con un gran número de técnicas y tratamientos que se han desarrollado a través del tiempo como respuesta a múltiples problemas de salud, y su prevalencia radica en la transmisión de sus conocimientos por generaciones, considerándose como el principal, e incluso el único recurso con el que cuentan las comunidades indígenas para la atención a la salud, siendo muchas veces complementario al uso de la medicina convencional alopática. Un claro ejemplo de la medicina tradicional mexicana es la medicina tradicional purépecha, la cual en la antigüedad era llevada a cabo por un médico o *Xurimecha* que se encontraba al servicio del jefe supremo o *Caltzontzin*, el cual empleaba hierbas medicinales, muchas de las cuales eran obtenidas de un jardín botánico que se encontraba en el cerro llamado *Zirate*, cerca de Santa Fe de la Laguna, o bien, a través del comercio con otras culturas indígenas (Kaivola et al., 1983; Viesca, 2017).

En años recientes, se han realizado diversos estudios etnobotánicos para determinar las plantas de uso medicinal empleadas por la comunidad Purépecha. Uno de ellos fue realizado por Gioanetto y Blas Cacari, quienes elaboraron un fichero etnobotánico y herbolario de diversas especies vegetales de uso medicinal, indicando la parte de la planta empleada, y la posología de la práctica terapéutica de acuerdo con la enfermedad para la que es utilizada, incluyendo afecciones cutáneas (Gioanetto & Blas Cacari, 1998).

Asimismo, Esquivel-García y colaboradores hicieron un estudio donde identificaron 97 plantas pertenecientes a 14 familias de plantas con uso medicinal en la Meseta purépecha, empleadas en el tratamiento de afecciones inflamatorias, heridas y erupciones cutáneas, entre ellas las plantas *Heteroteca inulodes*, *Aloe vera* y *Oenothera rosea*. Por otra parte, Bello y colaboradores inventariaron a las especies vegetales endémicas de la región de Nuevo San Juan Parangaricutiro en el estado de Michoacán, reportando el uso medicinal de múltiples plantas con actividad medicinal, entre ellas la planta *Lobelia laxiflora var. patzquarensis* utilizada como tratamiento en erupciones en la piel, la cual se encuentra descrita a continuación (Bello et al., 2015; Esquivel-García et al., 2018).

2.7.1. *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis*

Lobelia laxiflora var. *patzquarensis* o *Lobelia patzquarensis* (*catamba acuitzuri* en purépecha) es una especie perteneciente a la familia *Campanulaceae* localizada en la región norte del estado de Michoacán y que forma parte de la vegetación secundaria en bosques de encino y de pino. Se caracteriza por ser una especie rizomática densamente pubescente, con hojas lanceoladas, elípticas o angostamente ovadas, de 4 a 10 cm de largo por 1.5 a 3cm de ancho; con inflorescencia alargada, base foliosa y con pedicelos rígidos y derechos (Figura 6). Además, dicha especie posee múltiples flores con un periodo de floración que va de febrero a julio, aunque puede extenderse un poco más (Killick, 1964).



Figura 9. *Lobelia laxiflora* var. *stricta* Planch. & Oerst. Tomadas de https://nationalzoo.si.edu/object/nmnhbotany_13828420 (izquierda) y Tesis: *Obtención de metabolitos secundarios de Lobelia laxiflora variedad patzquarensis con actividad antiinflamatoria en fitodermatitis por contacto inducida por Toxicodendron radicans*, (derecha) (Serrato Rodríguez & Ruiz Marines, 2017). Consultados el 22 de septiembre de 2020.

Alrededor del mundo se ha reportado que diversas especies del mismo género son empleadas dentro de la medicina tradicional para el tratamiento de múltiples afecciones, principalmente en forma de infusiones o tinturas, lo cual ha promovido a la búsqueda de fitocompuestos responsables de sus propiedades terapéuticas, entre

los que se han encontrado principalmente alcaloides piperidínicos como la lobelina, lobelano, lobelanidina, norlobelanina, y lobelanina, y fitoesteroles como sisosterol, estigmasterol, campesterol, α y β amirina, entre otros productos naturales (Folquitto et al., 2019).

En México, se ha reportado el uso de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* dentro de la medicina tradicional purépecha para el tratamiento de dermatosis, contra el mal olor de pies, o bien, para la fitodermatitis ocasionada por hiedra venenosa (*Toxicodendron radicans*) (Gioanetto & Cacari, 1991).

3. ANTECEDENTES

Los productos naturales han despertado un gran interés, especialmente en países en desarrollo, debido a su gran potencial terapéutico en el tratamiento de una amplia variedad de patologías, por lo que pueden emplearse como materias primas para la síntesis orgánica de nuevas drogas y otras sustancias bioactivas de interés farmacológico. Sin embargo, su extracción y purificación puede ser un tanto complicada y costosa. No obstante, en los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones con plantas medicinales, con el propósito de evaluar su capacidad regenerativa en modelos celulares derivados de células epiteliales y conjuntivas cutáneas (Gutiérrez & Estevés, 2009; Rex Jeya et al., 2018).

3.1. Productos naturales con capacidad reconstitutiva cutánea *in vitro* en cultivos 2D

El uso de animales de experimentación ha sido considerado como el estándar de oro a la hora de estudiar modelos en regeneración cutánea; sin embargo, con el fin de obtener información más precisa en cuanto a la influencia de los productos naturales en la actividad celular y molecular de la restauración de la piel, se han desarrollado una gran cantidad de estudios en cultivos celulares. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Hernández-Pasteur *et al.* analizaron la capacidad regenerativa de los extractos orgánicos de hojas de dos plantas mexicanas *Buddleja cordata* (tepozán) y *Vismia baccifera* (Chotillo) en un modelo *in vitro* de herida en monocapa celular, donde observaron que el extracto de *B. cordata* a una concentración de 50 µg/mL incrementó significativamente la capacidad de regeneración de la herida (Hernández-Pasteur et al., 2019).

Asimismo, D'Agostino *et al.* determinaron la capacidad cicatrizante del extracto acuoso de germinado de *Triticum vulgare* mediante un ensayo de cierre de herida por scratching con un cultivo en monocapa de la línea celular HaCat, observando que éste induce a la proliferación y migración celular, además de analizar la expresión de genes involucrados como en remodelación, encontrando que dicho extracto modera la expresión de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, así como colágeno I, elastina, integrina αV y aquaporina 3, asociadas a la reparación del tejido (D'Agostino et al., 2020).

3.2. Productos naturales con capacidad reconstitutiva tisular cutánea *in vitro* en cultivos 2D bajo condiciones de compromiso fisiopatológico

Por otra parte, también existen estudios enfocados en analizar la capacidad reconstitutiva tisular bajo condiciones de alteración del proceso *per se*, como en las úlceras diabéticas. Tal es el caso del estudio realizado por Zhang *et al.*, donde analizan la influencia del extracto etanólico de la raíz de *Angélica dahurica* en heridas de individuos diabéticos, mediante la estimulación de la angiogénesis. Mediante el ensayo por scratching con cultivo en monocapa de la línea celular HUVEC, se observó que inducen a la proliferación y migración de células endoteliales. Además, emplearon un modelo *in vivo* de ratas diabéticas, donde observaron mediante análisis histológico, que hubo una mayor deposición de colágeno en los animales tratados con el extracto, en comparación con los animales diabéticos no tratados y animales sanos sin tratamiento. Asimismo, mediante un modelo *ex vivo* de anillo aórtico aislado de los animales diabéticos, se observó que el extracto induce al brote *de novo* de vasos sanguíneos (Zhang *et al.*, 2017).

3.3. Productos naturales con capacidad reconstitutiva tisular cutánea *in vivo*

Existen diversas investigaciones donde se analiza la capacidad reconstitutiva cutánea de plantas de uso medicinal en modelos animales. Por ejemplo, Mori *et al.* estudiaron el aceite esencial de lavanda para determinar su capacidad promotora de la reconstitución de tegumento en un modelo murino. Y encontraron que los animales tratados con el aceite esencial por 10 días, la formación de tejido de granulación fue mayor en comparación con los animales no tratados, debido al incremento de la producción de colágeno de tipo I y III, como consecuencia de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos inducida por TGF- β . Sin embargo, a partir del séptimo día, la producción de colágeno tipo III fue disminuyendo gradualmente, en comparación con la producción de colágeno I, que se mantuvo constante, lo cual corresponde con lo observado de forma natural en la piel (Mori *et al.*, 2016).

Por otro lado, Misra & Varma estudiaron el extracto hidroetanólico de *Agave americana* para determinar su capacidad para la curación de heridas cutáneas en un modelo murino, donde lograron apreciar una aceleración en el cierre de heridas cutáneas por incisión y escisión (Misra & Varma, 2017).

3.4. Estudios farmacognósticos del género *Lobelia*

El género *Lobelia* en las últimas tres décadas ha despertado un gran interés en cuanto a su estudio, ya que dentro de las más de 400 especies que lo conforman, se ha demostrado que por lo menos 15 de ellas producen una amplia variedad de compuestos orgánicos de interés farmacológico, principalmente antiinflamatorios, antiviral e incluso antioxidante (Zheng et al., 2021). Recientemente, algunas de estas especies han sido estudiadas de forma preliminar para determinar la actividad reconstituyente tisular cutánea. Tal es el caso de *Lobelia alsinoides*, donde se realizó un estudio preliminar del efecto reconstituyente tisular cutáneo del extracto etanólico de hoja en un modelo de quemadura de tercer grado en el dorso de ratas Wistar, donde se observó una rápida curación de heridas en aquellos animales tratados con ungüento enriquecido con 10% de extracto, observándose una mejor contracción de herida y un periodo más corto de epitelialización, en comparación con el resto de los tratamientos (Samdavid Thanapaul et al., 2020).

Por otra parte, en el estado de Michoacán existe una especie endémica de este género llamada *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis*, utilizada de forma tradicional por los habitantes de las comunidades purépechas para tratar afecciones de la piel, entre ellas, la fitodermatitis por contacto provocada por hiedra venenosa. El uso tradicional de esta especie vegetal se basa en la decocción la planta en agua y, una vez cocida, se retira del agua y se frota directamente en la lesión cutánea. Una vez realizado esto se espera un periodo de 24 a 48 horas, sin importar de la profundidad y gravedad de la lesión presente hasta la restauración del tejido cutáneo. De manera empírica, se ha observado que el tegumento recupera su integridad física de forma rápida y eficaz, independientemente de la gravedad de la lesión (Figura 10).



Figura 10. Uso tradicional de *L. laxiflora* var. *patzquarensis*. Modificada de Tesis: Obtención de metabolitos secundarios de *Lobelia laxiflora* variedad *patzquarensis* con actividad antiinflamatoria en fitodermatitis por contacto inducida por *Toxicodendron radicans* (Godínez-Orozco, 2020).

4. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos alopáticos empleados de forma convencional para coadyuvar a la restitución tisular son la terapéutica de primera elección dentro del área médica; sin embargo, cuando su uso es prolongado, aumenta la probabilidad de desarrollar una gran cantidad de efectos secundarios en el paciente, retrasando así el proceso reconstitutivo tisular endógeno.

Esto conduce a la búsqueda de terapias que eviten el retraso del proceso regenerativo, donde la terapéutica ofrecida por la medicina regenerativa en los últimos años se ha posicionado como una alternativa eficaz para el tratamiento de lesiones de tejido cutáneo. No obstante, pese a la tasa elevada de éxito en los tratamientos correspondientes (terapia celular e ingeniería de tejidos), son poco asequibles para la población en general, por lo que no suelen ser la terapéutica de primera elección para tratar este tipo de afecciones.

Ante esta situación, la comunidad científica se ha dado a la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean más accesibles para el público, e igual de efectivas que las ya existentes. Por ello, los estudios farmacognósticos y biomédicos aplicados a plantas de uso tradicional han jugado un papel fundamental para el desarrollo de terapias de origen natural que favorezcan a la recuperación tisular, especialmente en países donde la herbolaria sigue vigente, entre ellos México.

Asimismo, es importante destacar que para el estudio de plantas de uso medicinal se requiere de modelos biológicos como herramienta para la investigación de su capacidad regenerativa, lo que permite obtener resultados certeros de forma rápida y contundente. Por ello, el uso de cultivos celulares es un requisito fundamental que permite determinar la influencia de metabolitos secundarios sobre actividades celulares relacionadas con el proceso reconstitutivo (proliferación, migración y diferenciación celular). Además, es importante destacar que estos modelos contribuyen a disminuir en gran medida el uso de animales de experimentación, aunque estos últimos suelen ser de gran importancia para la investigación biomédica, ya que permiten controlar parámetros que aún con cultivos celulares difícilmente pueden controlarse.

Por otro lado, es importante considerar que las plantas del género *Lobelia* cuentan con una amplia variedad de metabolitos secundarios con propiedades reconstituyentes, entre ellas su capacidad de acelerar la regeneración y cicatrización cutánea, tal como se observa de forma empírica en el manejo de la especie vegetal endémica de Michoacán *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis*, de la cual hasta el momento no se han realizado estudios farmacognósticos que reporten de forma cuantitativa los metabolitos que le otorgan su actividad terapéutica.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La justificación planteada en el apartado anterior da pie para realizar la siguiente pregunta:

¿La planta *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* produce metabolitos secundarios que participen en la restitución tisular aplicada en modelos regenerativos cutáneos?

6. HIPÓTESIS

La planta *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* sintetiza fitocompuestos que inducen a una respuesta reconstitutiva tisular en modelos regenerativos cutáneos.

7. OBJETIVOS

7.1. General

Identificar metabolitos secundarios de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* que induzcan una respuesta reconstitutiva en modelos cutáneos *in vitro*.

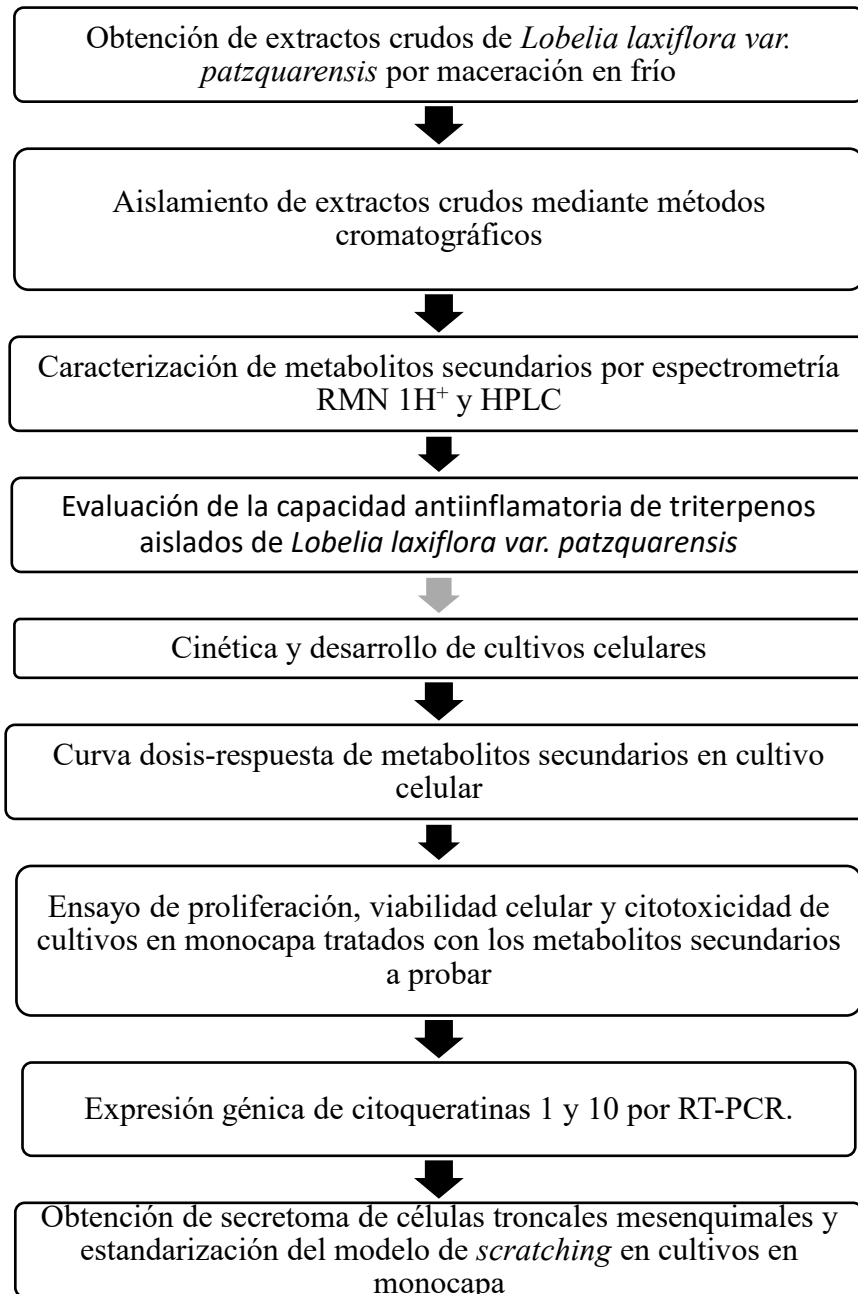
7.2. Particulares

- a) Aislar metabolitos secundarios de la planta *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* con posible actividad regenerativa.
- b) Evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* en un modelo *in vivo*, utilizando murinos.
- c) Evaluar la actividad regenerativa de los compuestos aislados de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* en un modelo *in vitro*, involucrando cultivos en monocapa de queratinocitos y fibroblastos humanos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Estrategia experimental general

La estrategia experimental que se pretende utilizar para el presente trabajo se resume en el siguiente diagrama:



8.2. Material para evaluar

Ejemplares frescos de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis* fueron localizados en la localidad de Tingüindín, Michoacán, e identificados por el D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván, investigador adscrito al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se separaron las hojas de las ramas de cada una de las plantas y posteriormente se pesan.

8.3. Obtención de extractos crudos por maceración en frío

Para la obtención de los extractos crudos las hojas fueron maceradas con los disolventes orgánicos hexano, acetato de etilo y metanol por 5 días cada uno, y filtrados con papel Whatmann 3MM. Los solventes se eliminaron a presión reducida en rotavapor y por evaporación en campana de extracción, para su posterior almacenamiento a 4 °C hasta su uso.

8.4. Aislamiento de extractos crudos por métodos cromatográficos

Con la finalidad de obtener los productos naturales de los extractos obtenidos con hexano y acetato de etilo de hoja, los extractos crudos fueron fragmentados mediante cromatografía en columna, utilizando una columna de vidrio de aproximadamente 4 centímetros de diámetro, y empleando como fase estacionaria gel de sílice 230/400 hidratado con n-hexano y como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo a polaridades ascendentes, determinadas mediante un cálculo previo (véase anexo). Además, para corroborar su separación, cada una de las fracciones fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando como fase estacionaria placas de gel de sílice 60 con dimensiones de 5.0 cm de largo por 2.5 cm de ancho cada una y mezclas de hexano-acetato de etilo como fase móvil, para su posterior observación bajo luz UV-visible, además de revelarse con una solución de ácido sulfúrico al 20% y calor.

8.5. Caracterización de metabolitos secundarios por espectrometría RMN ¹H y HPLC

Para identificar y caracterizar los metabolitos secundarios a partir de los extractos fraccionados, cada una de las fracciones fue caracterizada utilizando el espectrómetro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹H) Varian Mercury Plus, y mediante sus correspondientes espectros se obtuvieron sus estructuras químicas. De manera conjunta, mediante una base de datos, se realizó la búsqueda de productos naturales conocidos y, mediante una revisión bibliográfica se determinó la actividad reconstitutiva tisular reportada, así como sus características fisicoquímicas, facilitando su posterior aislamiento y purificación.

Para determinar la concentración de metabolitos presentes en los extractos se llevó a cabo el análisis por HPLC (ThermoFisher Scientific) utilizando la columna quiral Chiralpack AD-H (5 μ m, 4.6 x 250 mm), empleando como fase móvil una mezcla de hexano/isopropanol (60:40) y como fase estacionaria, con una velocidad de flujo de 1 μ L/minuto. Se empleó 210 nm como longitud de onda para la identificación de estos compuestos, de acuerdo con lo reportado en la literatura para los estándares de estos compuestos.

8.6. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de triterpenos aislados de *Lobelia laxiflora* var. *patzquarensis*

Para establecer la actividad antiinflamatoria los metabolitos secundarios obtenidos del extracto de hoja de *L. laxiflora* var. *patzquarensis* se utilizaron como modelo *in vivo* 25 ratones albinos hembra de 6-8 semanas de edad, basado en el trabajo realizado por Lui y col. en 2019, de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para su manejo y mantenimiento, con acceso a agua y alimento *ad libitum*.

Con el objetivo de recrear la lesión cutánea causada por *T. radicans*, se empleó como agente flogístico la savia fresca de dicha especie vegetal, la cual de acuerdo con lo establecido en la literatura como parte de su composición química se encuentra presente el metabolito secundario urushiol, responsable de la fitodermatitis por contacto de numerosas plantas del género *Toxicodendron*. Dicha savia fue colocada directamente sobre el dorso de cada animal previamente depilado 2 veces cada 24 horas, para así asegurar el desarrollo de la dermatitis correspondiente en el sitio de aplicación.

Posteriormente, se procedió a establecer las dimensiones de la costra formada en cada uno de los individuos utilizando un calibrador vernier digital y, de acuerdo con la posición anatómica del dorso de cada animal, tomándose como referencia las porciones norte-sur (cabeza-cola) y este-oeste (dorsal izquierda -derecha) de la zona afectada

Se emplearon como tratamientos los metabolitos secundarios previamente aislados: ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO), una mezcla de los anteriores, así como una mezcla de Taraxerol (T), lupeol (L) y β -amirina(B), los cuales fueron aplicados

directamente en el sitio de lesión y cada 24 horas por 3 días se realizaron las mediciones pertinentes para determinar su efecto en la herida.

8.7. Cultivos celulares y condiciones

Como modelos celulares se utilizaron dos líneas celulares: una línea celular de fibroblastos humanos libres de HDLA de uso cosmético Dermablast-CELLS (PRMedica Inc.) y una línea celular de queratinocitos epidérmicos humanos denominada HEKn (ATCC), tratadas de acuerdo con las especificaciones de los proveedores para la obtención de cultivos y resiembras.

8.8. Ensayo de viabilidad celular por azul de tripano

Para determinar la capacidad proliferativa de los extractos crudos obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol obtenidos de hojas frescas de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*, se realizó una prueba de viabilidad celular por el método de azul de tripano. Para ello, en platos de cultivo de 10 cm² se desarrollaron cultivos en monocapa de 4×10^5 células de la línea celular de carcinoma pulmonar A549 (ATCC), y se trataron con cada uno de los extractos crudos de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*, incubándose a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se tiñeron con el colorante azul de tripano, de acuerdo con las especificaciones del proveedor, realizando un conteo por campo en cámara de Neubauer, bajo microscopio invertido

8.9. Cultivo en monocapa de fibroblastos humanos

Para el desarrollo del cultivo celular de fibroblastos, se utilizó el medio DMEM con Rojo Fenol (Gibco) enriquecido con 10% Suero Fetal Bovino (Gibco), y amikacina como antibióticos (100 µg/mL). Posteriormente, los cultivos fueron incubados a 37°C y con 5% de CO₂ por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizará el cambio de medio y mediante microscopía óptica invertida, se monitorearon los cultivos hasta alcanzar el 80% de confluencia. Para el mantenimiento de los cultivos los siguientes cambios de medio se realizaron cada 3 días.

8.10. Cinética de crecimiento y desarrollo de cultivos celulares

Previo al desarrollo del cultivo celular en monocapa, se realizó una cinética de crecimiento, de manera que se conociera el tiempo de duplicación celular. Para ello, se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos en placas de cultivo de 10 cm², empleando una concentración inicial de 4×10^4 células por placa. Posteriormente, se

tomó un cultivo cada día, durante una semana, para monitorear la concentración celular, con ayuda de la cámara de Neubauer y un microscopio invertido.

8.11. Ensayo de proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular mediante Azul de Alamar

Para el ensayo de de proliferación, viabilidad y citotoxicidad se consideraron el uso de dosis de 0.1, 1, 5, 10 y 50 μM de cada uno de los compuestos a analizar, tomando como referencia las dosis manejadas en los trabajos publicados por Wójciak-Kosior y col. en 2011 y Bernabé-García y col. en 2017. Tanto para cultivos de fibroblastos como de queratinocitos se realizaron soluciones Stock mediante la disolución de los tratamientos problema (AU, AO, TLB, y ExC) de cada uno de los metabolitos correspondientes en DMSO para a partir de las mismas obtener las dosis señaladas anteriormente disueltas en agua destilada estéril, cuidando que la concentración de DMSO fuera menor al 1%.

En ambos tipos celulares se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 μL de una mezcla de cada uno de los tratamientos correspondientes con medio de cultivo, empleando como controles negativos células sin tratamiento y medio libre de células; y como control positivo muestras con DMSO, incubadas bajo las mismas condiciones que las muestras problema. Después de 24 h y 48 de incubación, se llevó a cabo el ensayo de azul de alamar, de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el proveedor (INVITROGEN), añadiendo el equivalente al 3% en volumen de azul de alamar atemperado a 37°C respecto al volumen final de cada cultivo e incubar por 1.5 h a 37 °C y en una atmósfera con 6% de CO_2 , protegido de la luz directa, monitoreando el tiempo de viraje de azul a rosa. Posteriormente, se procedió a realizar las lecturas de absorbancia correspondientes en toda la placa. empleando dos longitudes de onda: de 570 nm para la forma oxidada del colorante (resazurina) y otra a 600 nm para la forma reducida (resorufina), utilizando 100 μL de medio de cultivo como blanco.

Una vez tomadas las lecturas, se determinó la concentración celular viable, proporcional al porcentaje de la forma reducida de Azul de Alamar, mediante la siguiente ecuación:

$$AR_{LW} = A_{LW} - (A_{HW} * Ro) * 100$$

Donde:

RO= factor de corrección.

$$RO = AO_{LW}/AO_{HW}$$

AO_{LW} = AO₅₇₀ = Abs a 570 nm del medio con azul de alamar - Abs a 570 nm del medio solo.

AO_{HW} = AO₆₀₀ = Abs a 600 nm del medio con azul de alamar - Abs a 600 nm del medio solo.

ALW = A₅₇₀ = Abs a 570 nm de la muestra - Abs a 570 nm del medio solo.

AHW = A₆₀₀ = Abs a 600 nm de la muestra - Abs a 600 nm del medio solo.

Para eliminar el colorante, las muestras se lavaron con PBS y se les adicionó 0.5 mL de medio DMEM para fibroblastos y SFM para queratinocitos incubándolas a 37°C con 5% CO₂, para continuar el periodo de cultivo y realizar otras determinaciones.

8.12. Reacción en Cadena de la Polimerasa de citoqueratinas 1 y 10 humanas

Para determinar los niveles de expresión de genes asociados a queratinas epidérmicas humanas se utilizó la técnica de PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR), empleando a GADPH como gen de referencia. En cuanto al equipo, se utilizó el termociclador Mastercycler Gradient de la marca Eppendorf®, así como las enzimas transcriptasa reversa Superscript II y ADN Polimerasa Pfx de la marca Invitrogen®. Y para el análisis de las muestras se utilizó el fotodocumentador y analizador de imágenes Kodak Digital Science 1D. Asimismo, se emplearon los oligonucleótidos *ad hoc* para la amplificación de las citoqueratinas 1 y 10, de acuerdo con las especificaciones por Masse et.al. en 2014, con el propósito de utilizarlas como marcadores de expresión de diferenciación celular. Se utilizaron células en confluencia y células en división como controles celulares, así como cultivos tratados con los metabolitos de interés.

8.13. Obtención de secretoma de células troncales mesenquimales

Para la obtención del secretoma de células troncales mesenquimales primeramente se diseccionó placenta humana en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad, y se utilizó tripsina para disociar las uniones intercelulares de las CTM. Una vez disociadas, las CTM fueron cultivadas en frascos para cultivo T72, con el medio de cultivo DMEM enriquecido con SFB 10% y antibióticos, e incubadas a 37°C

con 5% de CO₂ para su mantenimiento. Tras ese tiempo, el medio fue retirado del cultivo y, para posteriormente adicionar un medio de estimulación de CTM, compuesto por DMEM S/ Rojo de fenol enriquecido con 1% de insulina y citocinas TNF- α e IFN- γ , antibióticos y antifúngicos, e incubándose nuevamente el cultivo. Tras 24 horas, se realizaron cinco lavados al cultivo con PBS 1X, y se adicionó un nuevo medio de cultivo OPTIMEM enriquecido con 0.05% de albúmina, para posteriormente trasvasarlo a un tubo Falcon y centrifugarlo a 700g por 8 minutos. Una vez centrifugado, se tomó la suspensión celular resultante y se almacenó a -80°C para su posterior uso.

8.14. Ensayo de migración celular en cultivos en monocapa de fibroblastos humanos mediante la prueba de *Scratching*

Para estandarizar la técnica de *scratching* o de cierre de herida, se desarrollaron cultivos en monocapa en una placa de 24 pocillos con una concentración de 3×10^5 células/cm² células por pocillo, utilizando células troncales mesenquimales aisladas previamente a partir de placenta humana dentro de nuestro equipo de investigación, siendo cultivadas en medio DMEM con 30% Amikacina e incubadas a 37°C / 6% CO₂ por 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo fue retirado y los pocillos fueron lavados 2 veces con 0.5 mL de PBS 1X para retirar el residuo de medio de cultivo.

Posteriormente, con ayuda de la punta estéril de una micropipeta de 200 μ L, se realizó un corte transversal en el centro de cada cultivo, de manera que simulara una herida. Estos se lavaron con PBS para retirar los restos celulares. Luego se adicionaron 500 μ L de cada uno de los tratamientos correspondientes a cada pocillo, tal como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 4. Dosis empleadas de secretoma en medios de cultivo Derma-blast			
T1	0 μ L secretoma	500 μ L medio de cultivo	Control
T2	125 μ L secretoma	375 μ L medio de cultivo	25%
T3	250 μ L secretoma	250 μ L medio de cultivo	50%

T4	375 µL secretoma	125 µL medio de cultivo	75%
T5	500 µL secretoma	0 µL medio de cultivo	100%

Tras la aplicación de los tratamientos, se visualizaron los cultivos con ayuda del microscopio invertido, tomándose fotografías como referencia del T0, incubando nuevamente los cultivos. El monitoreo de la actividad reconstitutiva en cada uno de los cultivos se llevó a cabo cada 24 horas por 3 días, con ayuda del microscopio y, mediante un análisis de imagen, se determinó el cierre de herida. Dicho ensayo se realizó por duplicado.

Para determinar la capacidad reconstitutiva de los extractos de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis* los cultivos en monocapa se sometieron a la prueba. Inmediatamente se aplicaron 800 µL del tratamiento correspondiente y se tomarán fotografías (5X) de la herida en un microscopio invertido al tiempo 0 h para posteriormente incubar las muestras por 24 h a 37 °C y 5 % CO₂, y se emplearon cuatro controles como punto de referencia para el proceso de cierre natural de la herida en monocapa: DMSO, medio libre de células, enriquecido con secretoma de CTM, llevando a cabo el ensayo por duplicado. Una vez transcurridas las primeras 12 horas, los cultivos fueron fotografiados en la misma zona que en el tiempo 0 h, y se realizará un análisis de las micrografías obtenidas mediante el a para medir el porcentaje del área que comprende la herida respecto al área total del cultivo, y obtendrá además el porcentaje de cierre de cada herida tras las 12,24,36 y 48 horas de tratamiento, con respecto al tiempo inicial mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cierre de herida} = ((T_i - T_f) \times 100) / T_i$$

Donde:

T_i = porcentaje del área ocupada por la herida en tiempo 0 h de cultivo con tratamiento respecto al área total

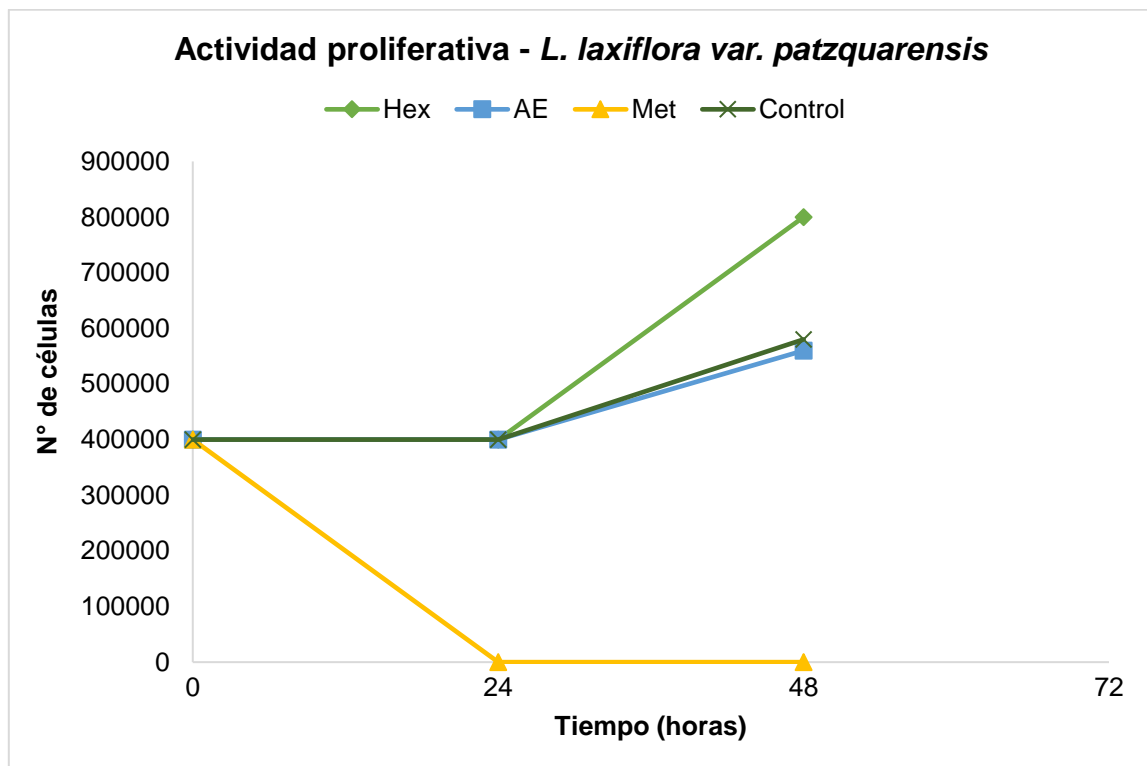
T_f = porcentaje del área ocupada por la herida en tiempo X h de cultivo con tratamiento respecto al área total

9. RESULTADOS

9.1. Ensayo de proliferación celular por azul de tripano de los extractos crudos de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*

La capacidad proliferativa celular de los extractos crudos obtenidos de *Lobelia laxiflora variedad patzquarensis* fue determinada bajo la observación en microscopio, donde se observó lo siguiente:

Tras las 24 horas de tratamiento, en los cultivos tratados con el extracto metanol todas las células se encontraban teñidas, siendo un indicativo de muerte celular, en comparación con los cultivos control, donde la población celular se mantuvo constante y sin teñir, al igual que en los cultivos tratados con los extractos hexano y acetato de etilo. Sin embargo, a las 48 horas posteriores al tratamiento con los extractos, se observó que en los cultivos celulares tratados con el extracto hexano la población celular se duplicó; no obstante, en las células tratadas con extracto acetato de etilo no hubo aumento ni decremento de la población celular (Gráfica 1).



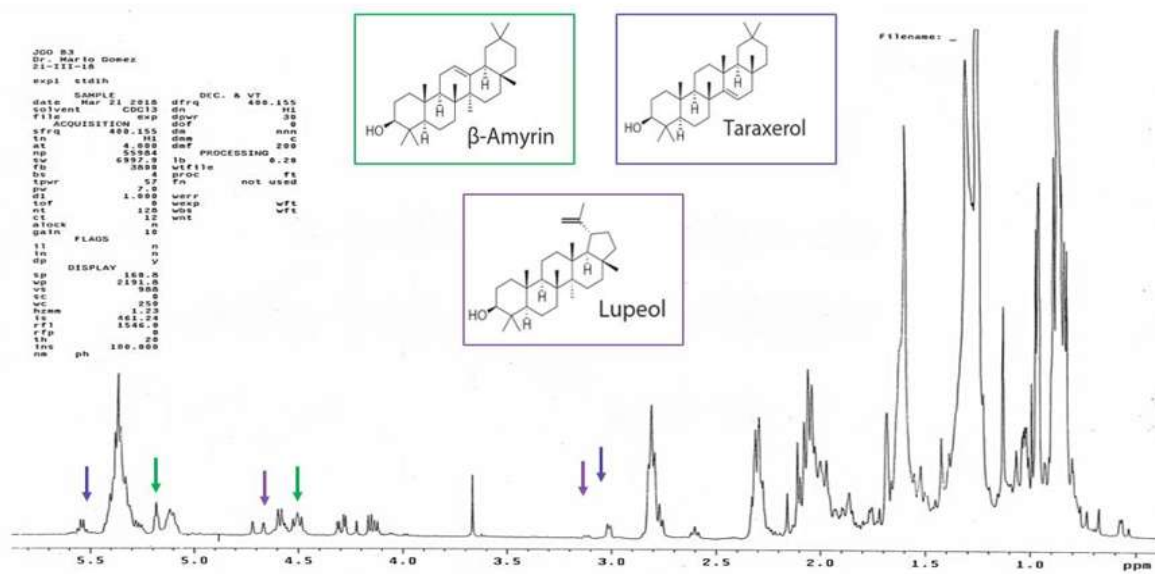
Gráfica 1. Proliferación celular observada en línea A549 tratada con extractos crudos de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*.

A partir de estas observaciones, se determinó que el extracto crudo metanólico tiene una fuerte capacidad citotóxica. No obstante, en los extractos crudos hexano y acetato de etilo, los metabolitos secundarios responsables de la restitución celular cutánea

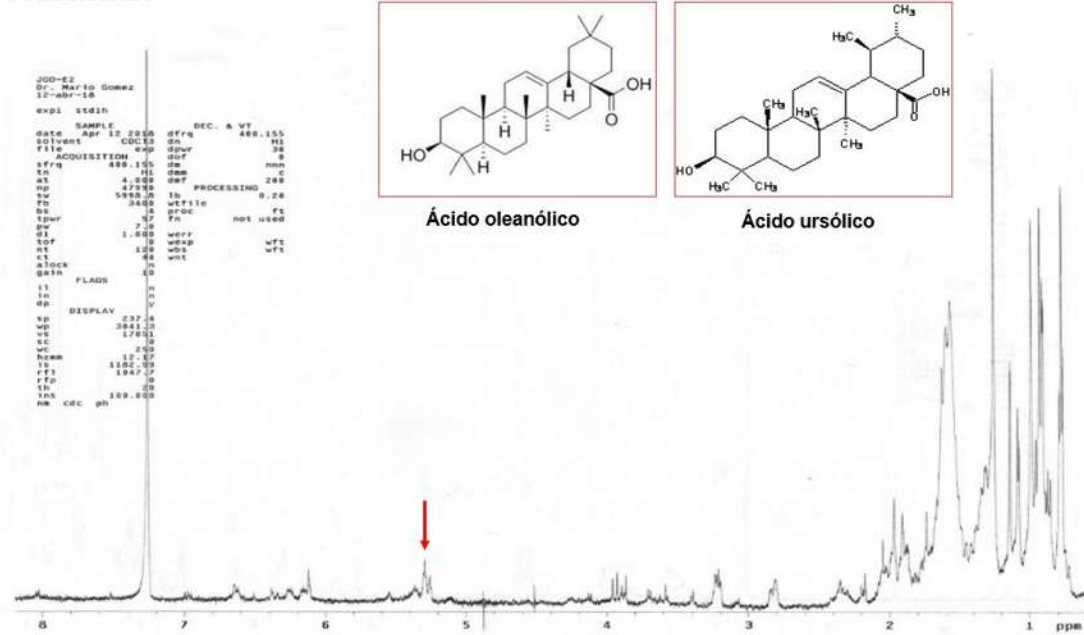
son compuestos de polaridad baja-media. Lo anterior coincide con el tratamiento de la planta previo a su uso tradicional, donde tras su cocimiento, la planta conserva sus propiedades curativas, y aquellos compuestos con actividad citotóxica se mantienen en la fase acuosa residual.

9.2. Análisis espectrométrico de fraccionados de extracto hexánico y extracto acetato de etilo de *L. laxiflora* var. *patzquarensis*

Tras el análisis de RMN $1H^+$, y con ayuda de la base de datos PubChem, se identificaron los compuestos presentes en las fracciones B3, E1 y E2 del extracto acetato de etilo, siendo el triterpeno pentacíclico beta amirina, así como sus isómeros taraxerol y lupeol aquellos presentes en la fracción B3, mientras que el terpeno pentacíclico ácido ursólico, y su isómero ácido oleanólico los presentes en las fracciones E1 y E2, considerados estos últimos como compuestos mayoritarios producidos por la planta (Figura 9).



Fracción E1



Fracción E2

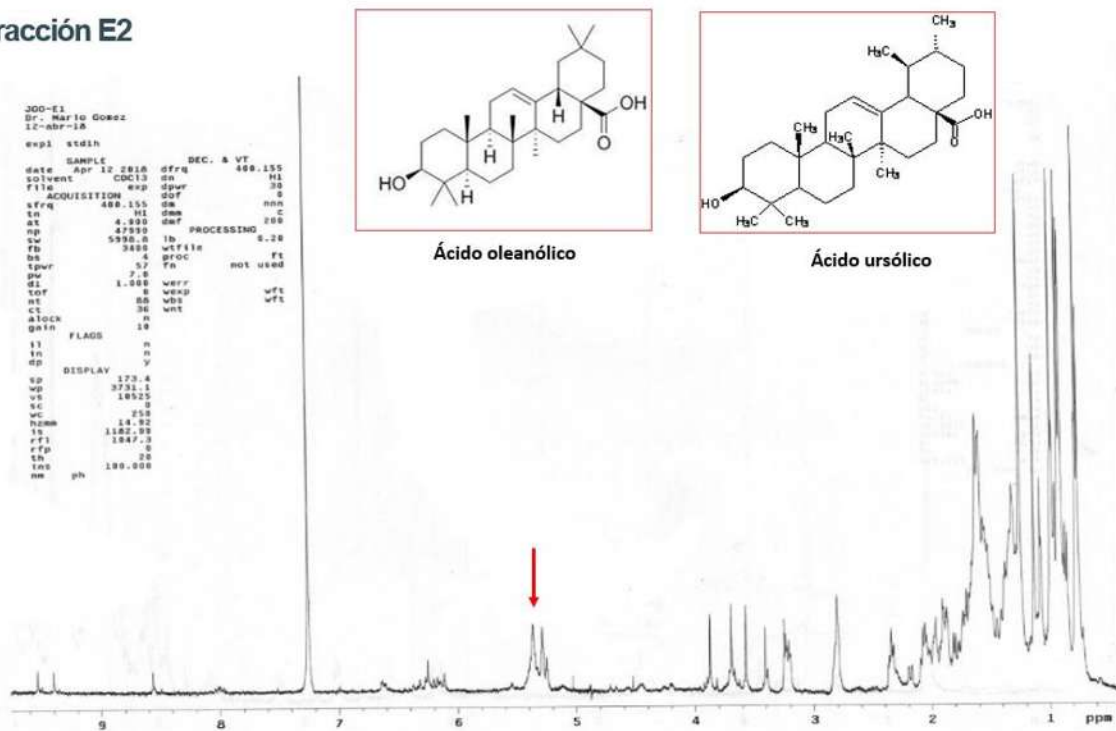


Figura 11. Espectros de RMN $1H^+$ de las fracciones B3, E1 y E2 del extracto acetato de etilo de *L. laxiflora* var. *patzquarensis*.

Asimismo, es importante destacar que tanto el ácido ursólico como el ácido oleanólico fueron posibles de separar mediante recristalización, de acuerdo con lo reportado por Godínez-Orozco, lo cual favoreció al análisis posterior de HPLC de estos.

No obstante, en el caso del extracto hexánico, se tomaron 2 compuestos denominados X1 y X2, pertenecientes a las fracciones C y E respectivamente, donde tras su análisis, se pudo apreciar una gran cantidad de compuestos grasos. Sin embargo, estos no fueron viables para su purificación y posterior análisis, ya que la cantidad obtenida de los mismos fue insuficiente, por lo que los análisis posteriores se realizaron únicamente con los triterpenos anteriormente mencionados (Figura 10).

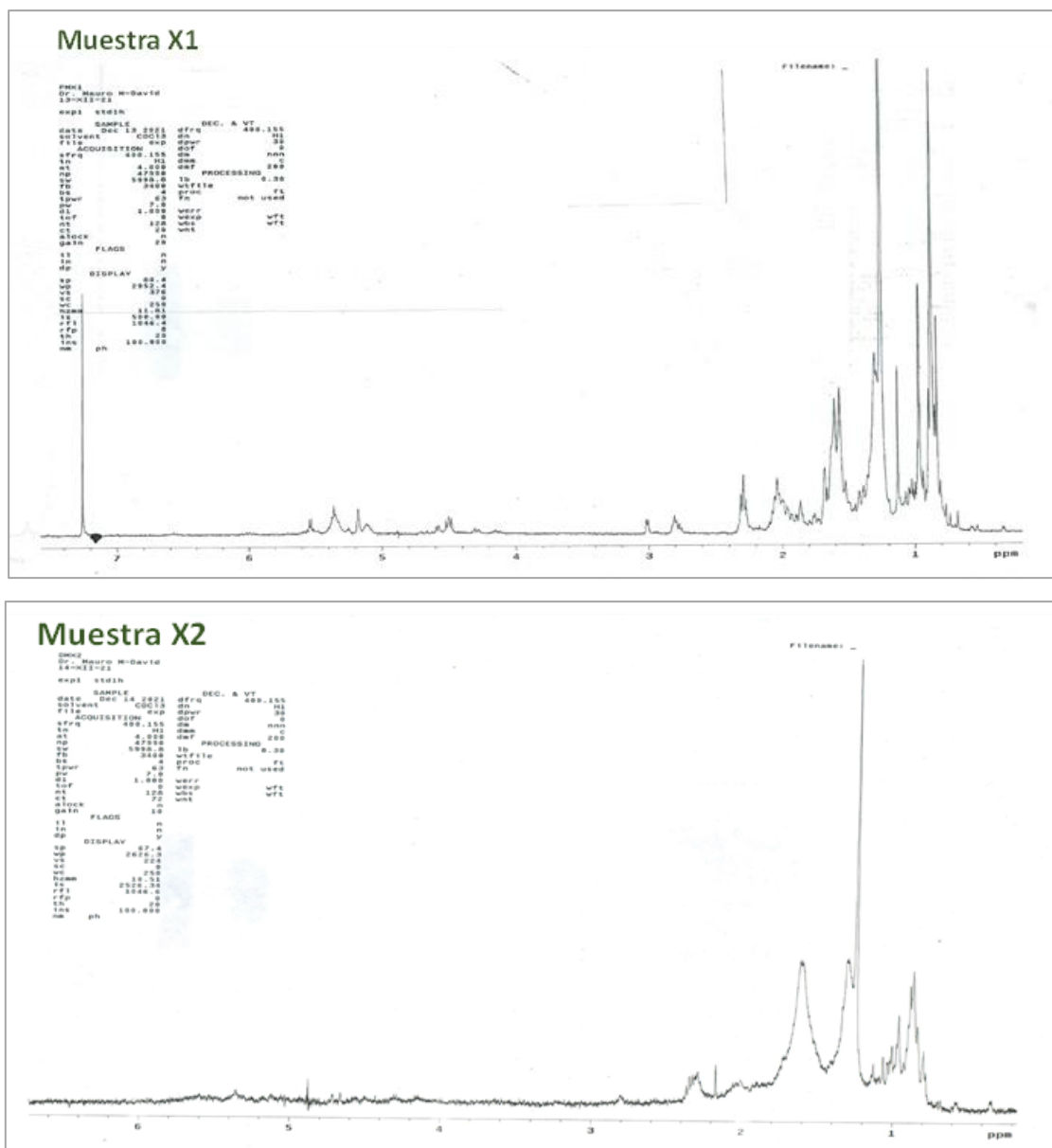


Figura 12. Espectros de RMN 1H de muestras X1 y X2 del extracto hexánico de *L. laxiflora var. patzquarensis*.

En el caso de los análisis realizados por HPLC, se lograron comprobar y cuantificar las muestras del fraccionado B3, obteniendo una señal única, donde el tiempo de retención fue de 3.790 min que comprende el área bajo la curva son similares a los observados y reportado en la literatura por varios autores de acuerdo con sus estándares correspondientes (Figura 11).

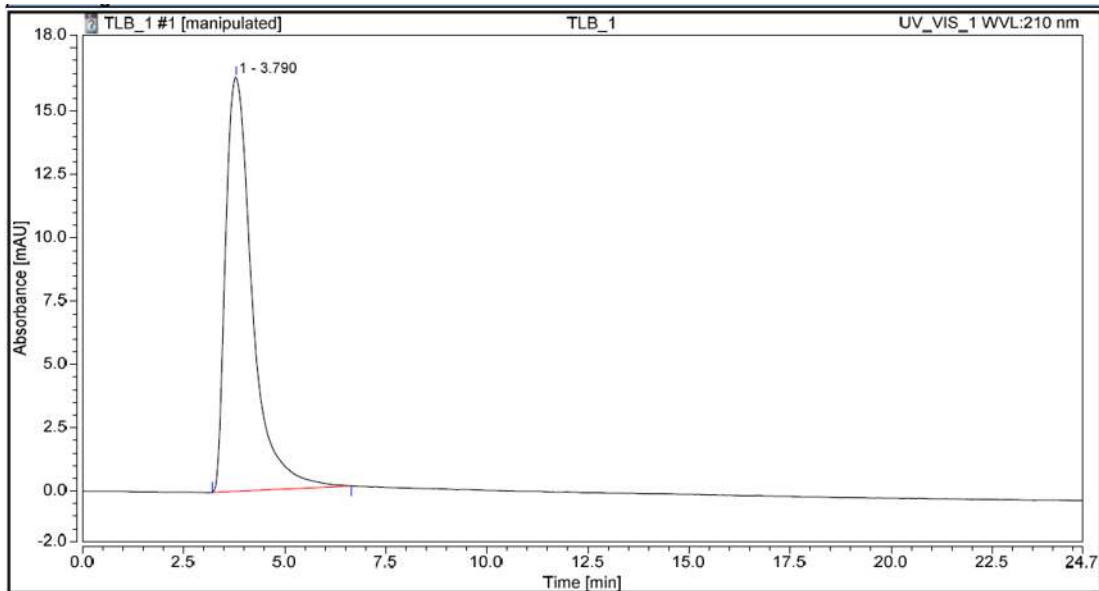
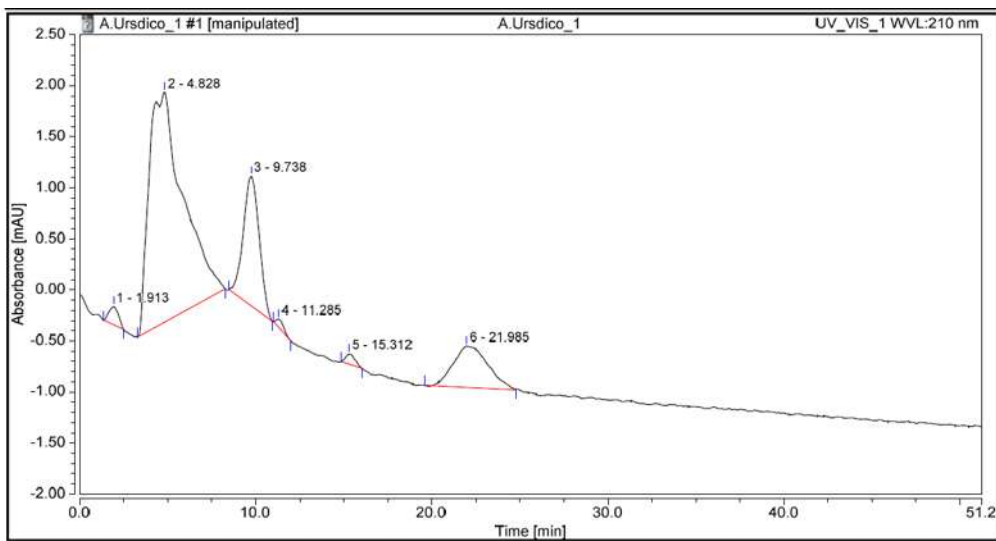


Figura 13. Cromatogramas de las muestras de triterpenos taraxerol, lupeol y beta amirina de extracto acetato de etilo de *L. laxiflora var. patzquarensis*.

En los HPLC realizados a los terpenos ácido ursólico y ácido oleanólico, obtenidos de las fracciones E1 y E2, se apreció que los tiempos de retención de ambas muestras, los cuales fueron de 21.985 min y 21.448 min respectivamente, similares al observado en el estándar analizado (Figura 12).



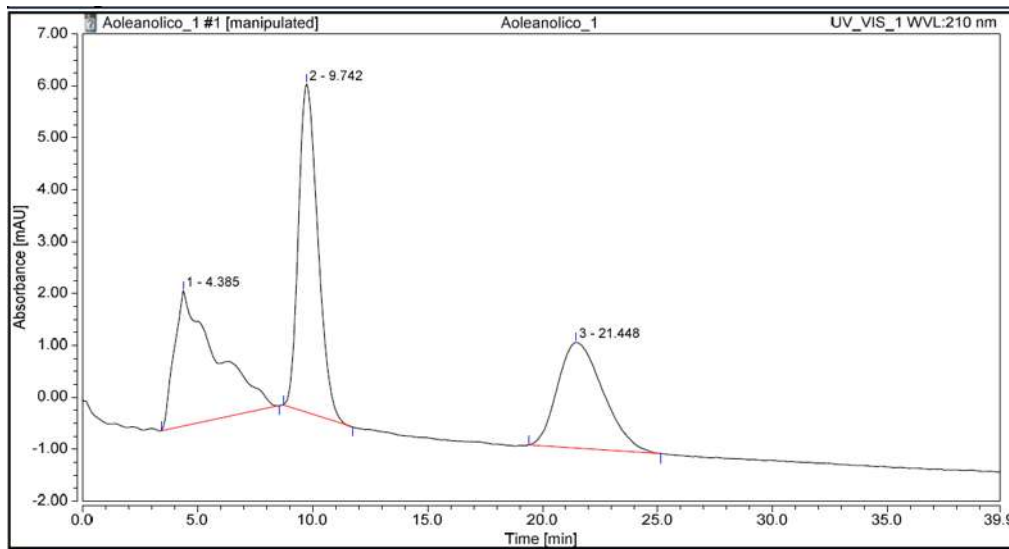
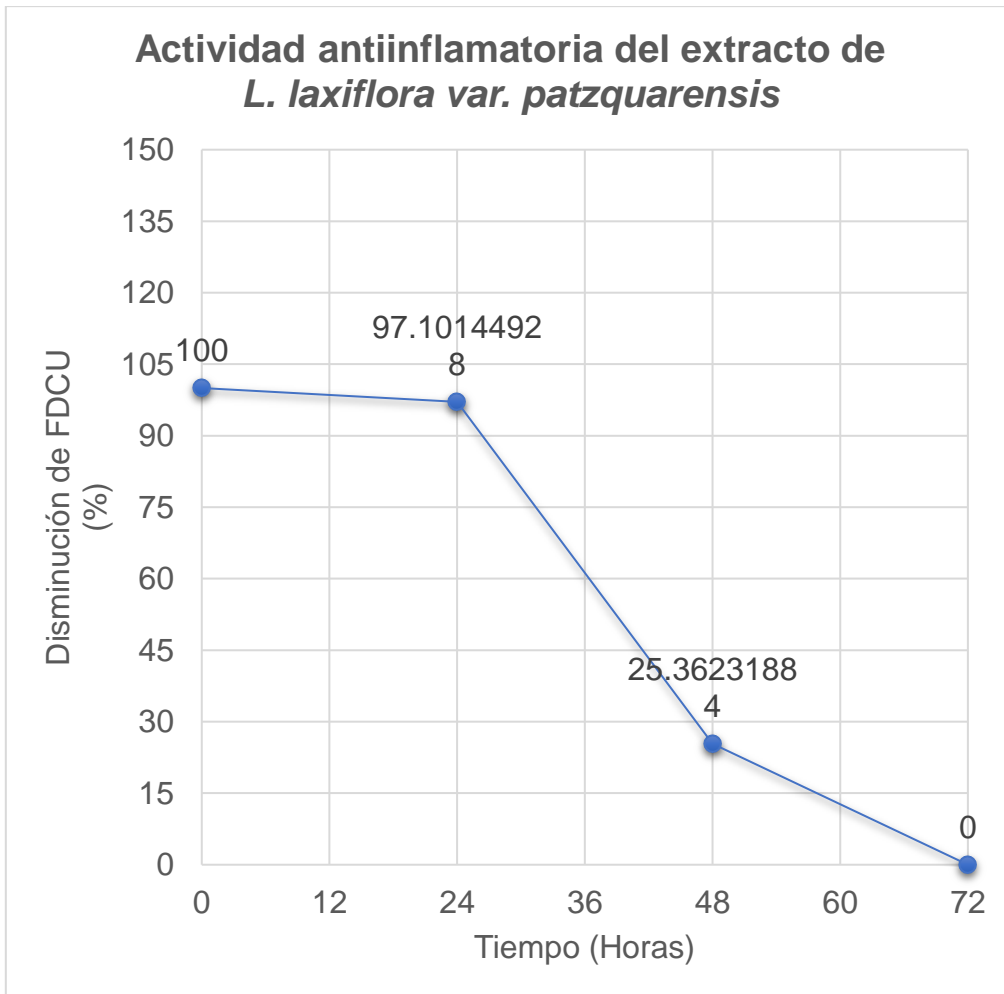


Figura 14. Cromatogramas de las muestras de ácido ursólico (superior) y ácido oleanólico (inferior) de extracto acetato de etilo de *L. laxiflora var. patzquarensis*.

A partir del resultado anterior, se buscaron otros metabolitos de abundancia media del extracto acetato de etilo para su análisis químico y si pudiesen estar involucrados en la respuesta reconstitutiva tisular cutánea. Se sometieron a cromatografía en columna y cromatografía en capa fina, bajo las condiciones indicadas en el Anexo I. A pesar de ser identificados por colorimetría y/o fluorescencia, la concentración obtenida fue insuficiente para su identificación molecular completa y por ende, no consideramos procedente continuar con su análisis.

9.3. Actividad antiinflamatoria de los compuestos triterpénicos aislados del extracto acetato de etilo de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*

A partir del análisis químico ya descrito, se realizaron experimentos *in vivo* previos para determinar la capacidad antiinflamatoria de los cinco productos naturales de tipo triterpénico descritos anteriormente (AU/AO/TLB). Como se muestra en la figura 15, los cinco compuestos presentaron una actividad antiinflamatoria de forma aislada. Sin embargo, también se pudo apreciar que la presencia de los cinco compuestos triterpénicos presentó una actividad antiinflamatoria sinérgica (Gráfica 2).



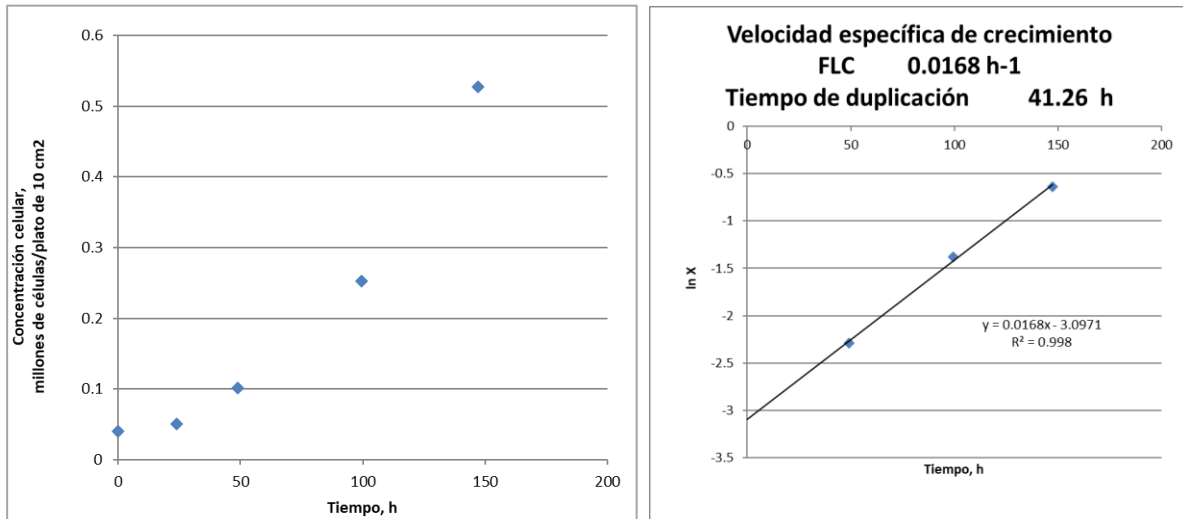
Gráfica 2. Respuesta antiinflamatoria de la mezcla de triterpenos pentacíclicos de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*.



Figura 15. Evidencia de la capacidad antiinflamatoria sinérgica de los triterpenos AU-AO-TLB. De izquierda a derecha: Tiempo 0h, 24h, 48h y 72h.

9.4. Cinética de crecimiento de fibroblastos humanos

Previo al desarrollo de experimentos, se desarrolló una cinética de crecimiento de los fibroblastos, con el objetivo de estudiar el comportamiento proliferativo celular. Se pudo apreciar una fase *lag* durante las primeras 24 horas, a partir de donde fue aumentando gradualmente la concentración celular para dar comienzo a la fase exponencial del cultivo antes de las 48 horas (Gráfica 3).



Gráfica 3. Cinética de crecimiento y tiempo de duplicación de la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos Derma-blast.

Asimismo, se pudo determinar el tiempo de duplicación de las células con los datos obtenidos, fue de 41.6 horas. De lo anterior, se pudo determinar tanto la concentración celular previo al desarrollo de cultivos respecto al tiempo de duplicación celular.

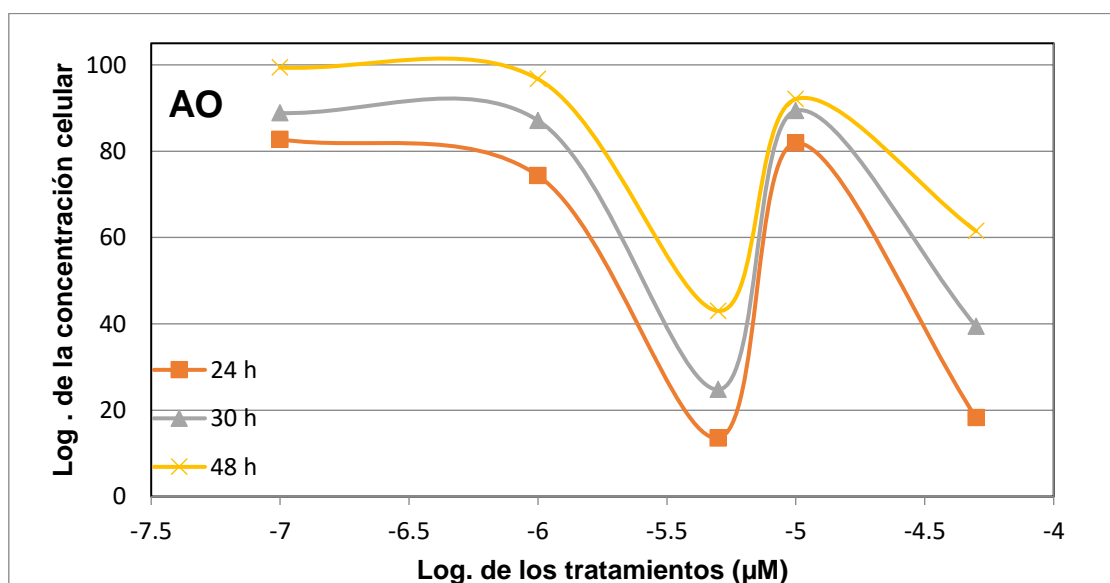
9.5. Ensayo de viabilidad, toxicidad y proliferación celular con Azul de Alamar

El ensayo con el colorante Azul de alamar (Alamar Blue®) es una técnica que ofrece muchas ventajas a la hora de determinar la viabilidad y toxicidad celular, ya que es estable, rápido, altamente sensible y rentable durante su uso, además de no afectar a los cultivos a la hora de utilizarlo, por lo que puede emplearse simultáneamente con otros experimentos. Lo anterior, en conjunto con la experiencia en el manejo dentro de nuestro laboratorio, hace de esta técnica útil para analizar los compuestos aislados a partir de nuestra planta de interés. Dichos ensayos se ejecutaron por cuadruplicado, con el fin de homogenizar los resultados a obtener.

Tras la aplicación de los tratamientos con triterpenos en los cultivos, se realizó un análisis cuantitativo donde se tomaron las lecturas correspondientes a las 24, 30 y 48 horas para cada una de las muestras celulares, con el objetivo de obtener un perfil de viabilidad celular, empleando como controles para el análisis cuantitativo las siguientes combinaciones: cultivo+ azul de alamar, medio de cultivo y DMSO.

Asimismo, de forma cualitativa se determinó el perfil de citotoxicidad de los diferentes tratamientos, considerando los siguientes factores durante la observación en el microscopio: confluencia y morfología celular (alargadas o esféricas) para su análisis, por lo que se seleccionaron aquellas dosis donde se observó homogeneidad en las repeticiones, morfología inalterada y baja toxicidad celular a partir de las cuales se obtuvo lo siguiente:

En los cultivos tratados con AO, se tomó una muestra de 2.6 μM para realizar las lecturas correspondientes a las 24, 30 y 48 horas postratamiento, donde se observó una respuesta metabólica oscilatoria entre los diferentes tratamientos, siendo las dosis de 50 μM donde se pudo apreciar una disminución significativa en la concentración celular en los tres tiempos, y una disminución importante en la dosis de 5 μM pero menor a la de 50 μM . Sin embargo, en la dosis de 10 μM se pudo apreciar una recuperación de la actividad celular respecto a la dosis anterior, por lo que se seleccionó esta última concentración como la concentración óptima para trabajar en ensayos asociados con la capacidad reconstitutiva (Gráfica 4).



Gráfica 4. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con AO. De izquierda a derecha: dosis 0.1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM y 50 μM .

En el análisis cualitativo se pudo apreciar una variable morfología celular en los diferentes tratamientos; sin embargo, en aquellos cultivos tratados con la dosis 10 μM se apreciaron una gran variedad de queratinocitos alargados delgados (normales) y una cantidad mínima de células esféricas, lo cual se relaciona con la actividad metabólica observada en el análisis cuantitativo. Por el contrario, en la dosis 5 μM se observaron una gran cantidad de células de morfología esférica, que se correlaciona con la baja actividad metabólica observada (Figura 16).

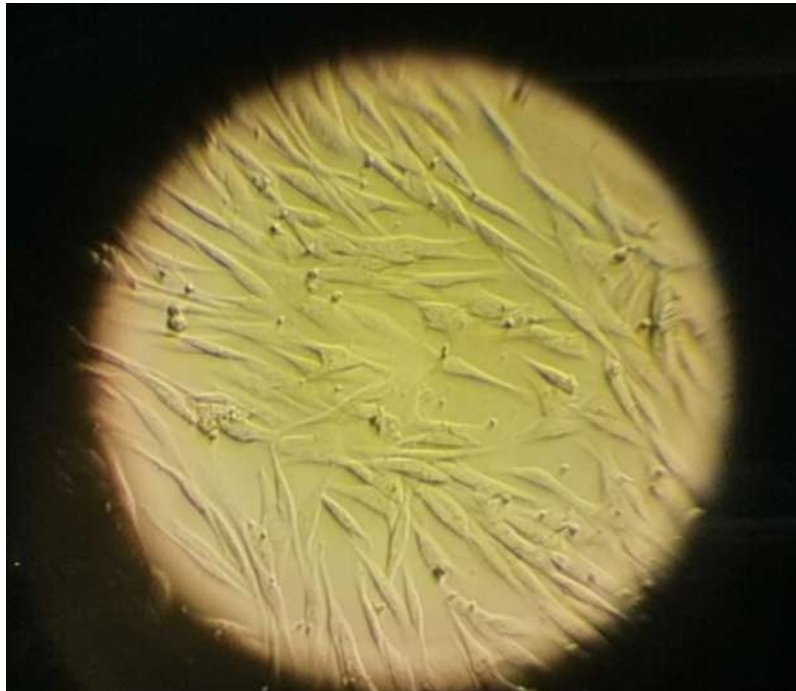
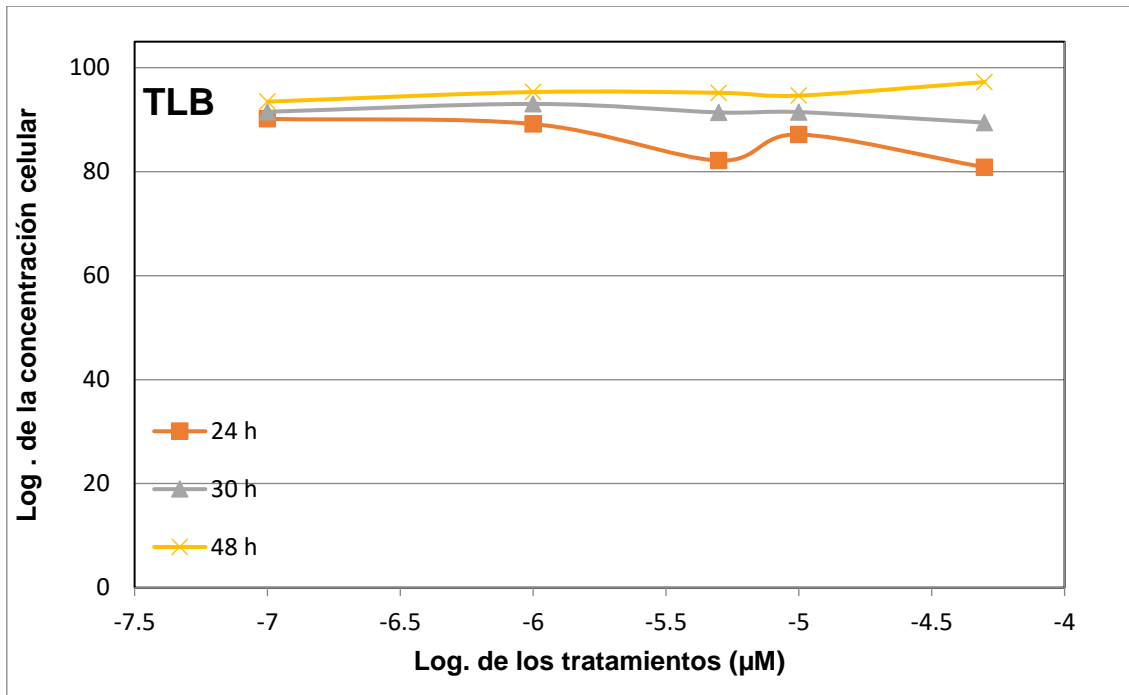


Figura 16. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de AO 10 μM .

Por otra parte, en los cultivos tratados con TLB no se observó un cambio significativo en el metabolismo celular a lo largo del tiempo en las concentraciones empleadas, por lo que se sugiere que la combinación de los triterpenos taraxerol, lupeol y beta-amirina no afectan significativamente la viabilidad de los queratinocitos (Gráfica 5).

Respecto al análisis cualitativo, se aprecia que en dosis menores a 50 μM del compuesto las células presentan alteraciones importantes en la morfología celular, aunque conforme la dosis aumenta, la cantidad de células esféricas y granuladas disminuye, mientras que la cantidad de células alargadas y confluentes aumenta, siendo significativa en la dosis de 50 μM , lo cual se correlaciona con lo observado en el comportamiento metabólico de dichos cultivos (Figura 17).



Gráfica 5. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con el mix de triterpenos TLB. De izquierda a derecha: dosis 0.1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM y 50 μM .

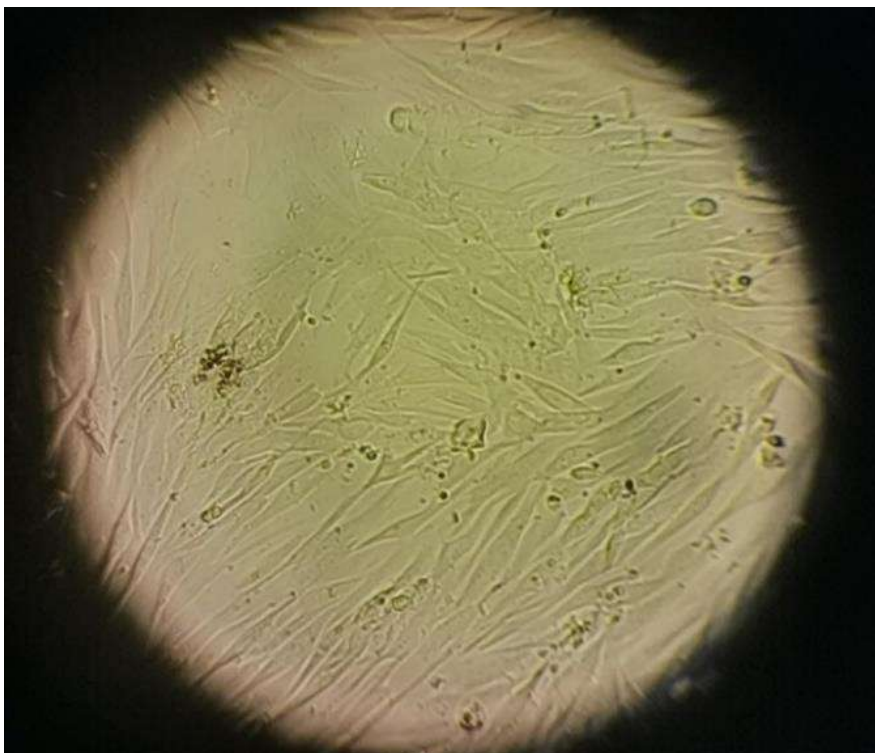
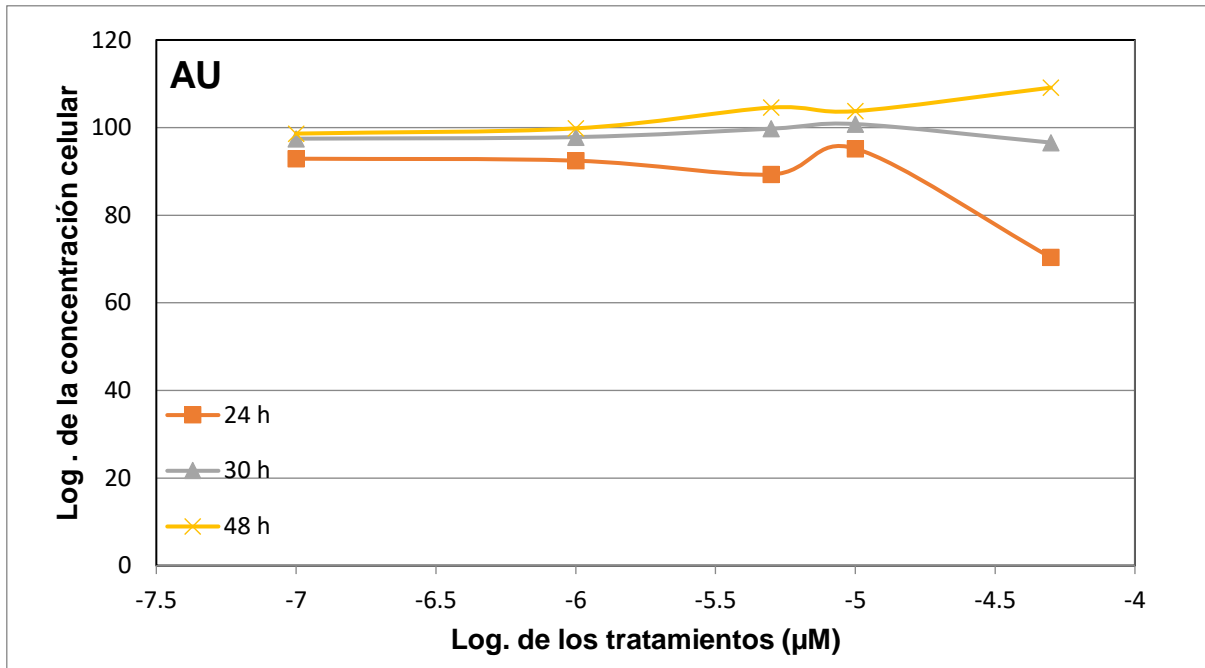


Figura 17. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de TLB 50 μM .

Por otro lado, en los cultivos tratados con AU, se observa que tras las 24 horas de aplicación, únicamente en los cultivos tratados con la dosis 10 μM de este triterpeno

hay una disminución importante en la concentración celular; sin embargo, también se aprecia un aumento significativo en la concentración celular en las 30 y 48 horas postratamiento, lo cual indica que dicha dosis es ideal para su análisis en modelos reconstitutivos *in vitro* (gráfica 6). Además, de acuerdo con la observación morfológica, las células son confluentes, de apariencia alargada y delgada, lo cual confirma lo mencionado anteriormente (Figura 18).



Gráfica 6. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con AU. De izquierda a derecha: dosis 0.1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM y 50 µM.

No obstante, si se compara el efecto de este triterpeno respecto a su isómero (AO), donde se observó un movimiento oscilatorio, se demuestra que la diferencia estructural de ambos compuestos sí tiene un impacto importante en la actividad metabólica celular.

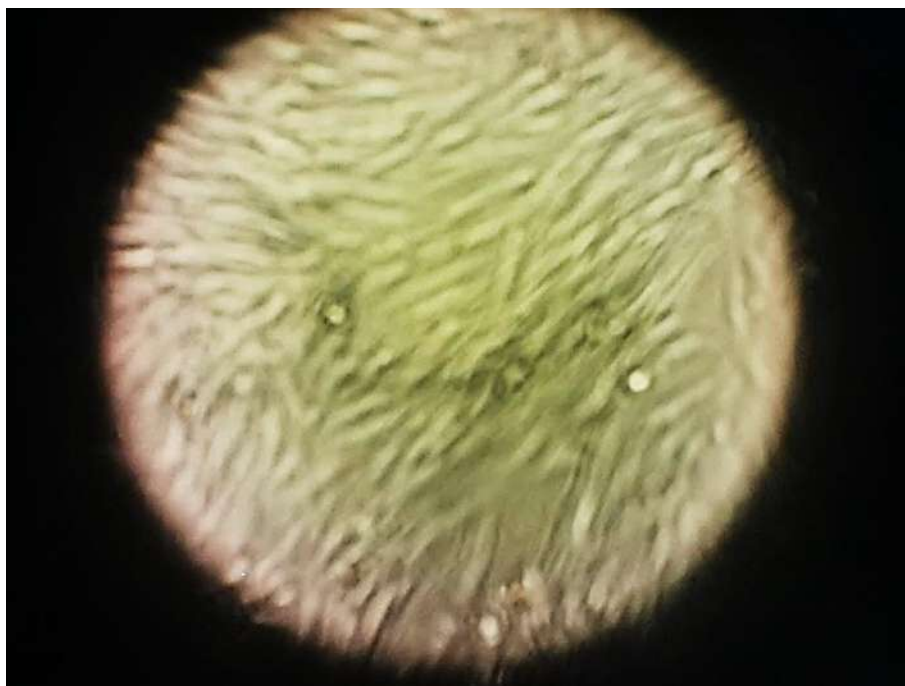
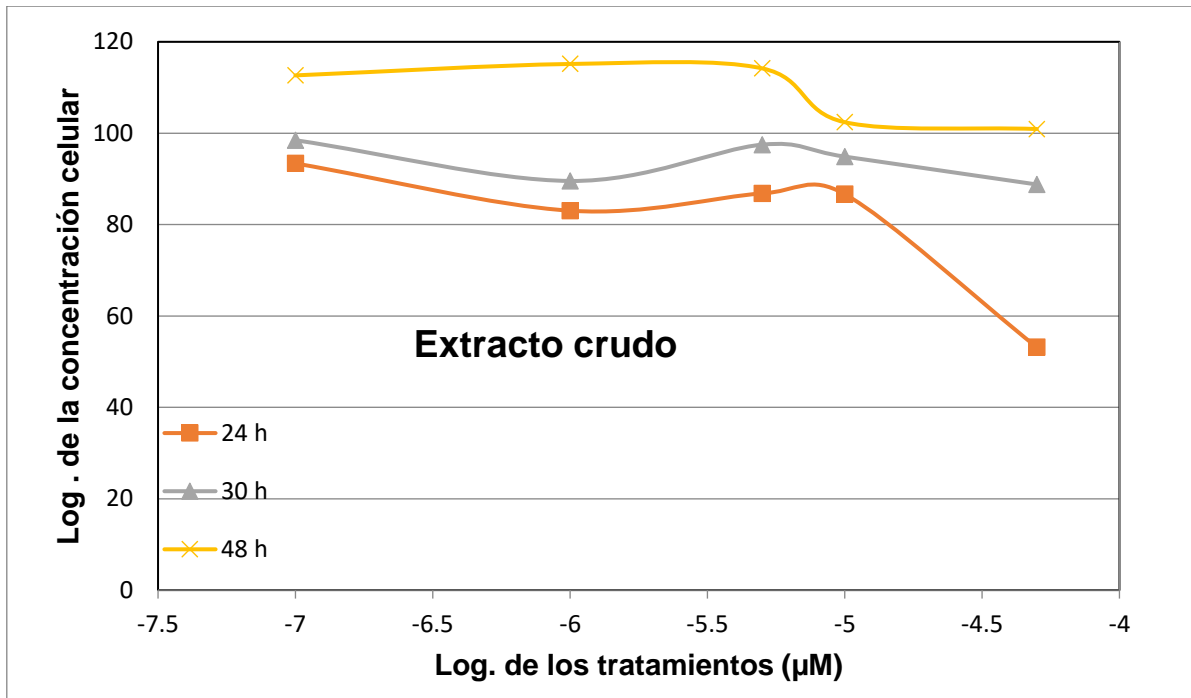


Figura 18. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de AU 50 μM .

Además del análisis realizado a los 5 triterpenos de interés, se realizó el mismo ensayo con cultivos tratados con el extracto crudo de *L. laxiflora var. patzquarensis*. Durante el análisis con las diferentes dosis, se observa un comportamiento similar al observado con el ácido ursólico, lo cual indica que únicamente el ácido ursólico presenta un impacto significativo en la viabilidad celular; sin embargo, la presencia de los triterpenos restantes pareciera reducir la concentración celular, siendo notorio en la dosis 50 μM (figura 19).



Gráfica 7. Curvas dosis-respuesta respecto al tiempo de los cultivos tratados con extracto crudo de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis*. De izquierda a derecha: dosis 0.1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM y 50 µM.

Asimismo, en el análisis morfológico, se observa células confluentes en los cultivos tratados con una dosis 10 µM de extracto crudo (figura 19), que corresponde a lo observado en el comportamiento metabólico reportado anteriormente.



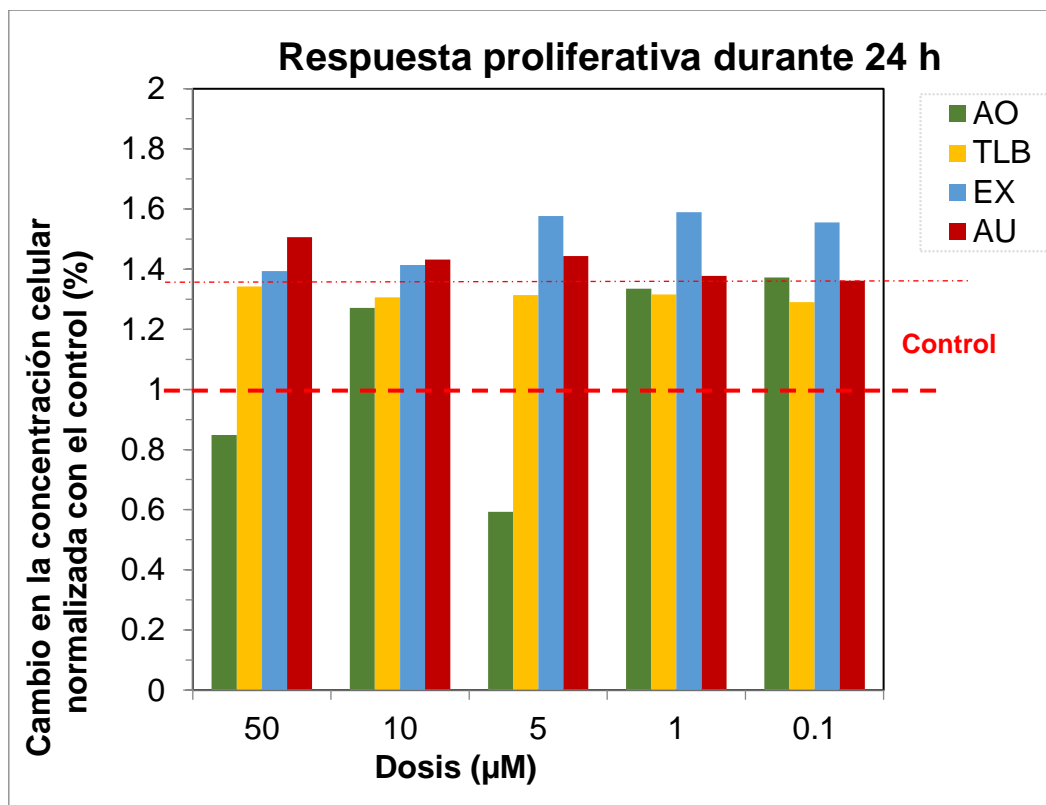
Figura 19. Queratinocitos tras las 48 horas de aplicación de extracto crudo de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis* 10 µM.

No obstante, en todos los casos el hecho de encontrar células con morfología esférica no es necesariamente un indicativo de muerte celular, ya que aún pueden ser células metabólicamente activas pese a su adherencia, lo cual se demuestra con el viraje del colorante azul de alamar tras su aplicación, debido a la actividad metabólica de las enzimas mitocondriales de tipo deshidrogenasas implicadas durante la reducción de resazurina a resofurina. Sin embargo, se consideró muerte celular en aquellas células donde además de existir un tiempo prolongado en el viraje dado por el metabolismo mitocondrial existía una morfología esférica, relacionada con el desprendimiento de la célula a la placa de cultivo.

Por otro lado, para determinar la capacidad proliferativa de los compuestos pentacíclicos se utilizaron los cultivos de queratinocitos mencionados anteriormente, así como cultivos de queratinocitos HEK_n a confluencia como control, con el objetivo de comparar su impacto en la proliferación celular a las 24 horas postratamiento a las dosis mencionadas anteriormente, de lo cual se obtuvieron los siguientes datos:

En los cultivos tratados con extracto crudo se observó un aumento significativo en la respuesta proliferativa tras las 24 horas de aplicación de las dosis 0.1, 1 y 5 μM , siendo las dosis de 1 y 5 μM las que se relacionan con una mayor actividad proliferativa, la cual disminuyó gradualmente a concentraciones 10 y 50 μM , por lo que la actividad proliferativa puede considerarse como dosis-dependiente.

Por otro lado, en los cultivos tratados con AU se aprecia una respuesta que fue incrementando de forma dosis-dependiente, siendo la concentración más alta en aquellos cultivos tratados con dosis de 5, 10 y 50 μM , donde los queratinocitos presentan una respuesta proliferativa por encima del control, así como en comparación con dosis más bajas de este compuesto, lo que coincide con lo observado en la viabilidad celular mencionada en el apartado anterior y su importancia como señalizador químico a nivel celular (gráfica 8). Los otros cuatro compuestos no estimularon la proliferación celular, lo que sugiere que el AU es el responsable de la estimulación de la proliferación observada en el extracto crudo.



Gráfica 8. Proliferación celular de los cultivos a las 24 horas postratamiento con triterpenos pentacíclicos. De derecha a izquierda: dosis 0.1 µM, 5 µM, 10 µM y 50 µM de ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO), mezcla de taraxerol, lupeol y beta-amirina (TLB), y extracto crudo (EX).

9.6. RT-PCR de citoqueratinas humanas

Con el propósito de determinar la influencia de los triterpenos pentacíclicos en la diferenciación de queratinocitos presentes en la epidermis humana, se realizó el análisis de la expresión de las citoqueratinas 1 y 10, que de acuerdo con la literatura, están relacionadas con la diferenciación durante la reepitelialización de la epidermis durante la restitución tisular cutánea. Para ello, se realizó un RT-PCR del ARNm de citoqueratinas 1 y 10 en queratinocitos tratados con los compuestos pentacíclicos identificados en *L. laxiflora* var. *patzquarensis*. Los resultados de este análisis se muestran en las figuras 18 y 19 para las citoqueratinas 1 y 10, respectivamente.

Como se puede apreciar en la figura 21 y gráfica 9, en efecto el extracto crudo estimula la activación de la diferenciación queratinocítica. También puede apreciarse que los isómeros ácido ursólico y ácido oleanólico también inducen la activación de la diferenciación queratinocítica en niveles similares a los del extracto del cual fueron

aislados. Por lo que sugiere que estos compuestos son los responsables de promover la síntesis de citoqueratina 1.

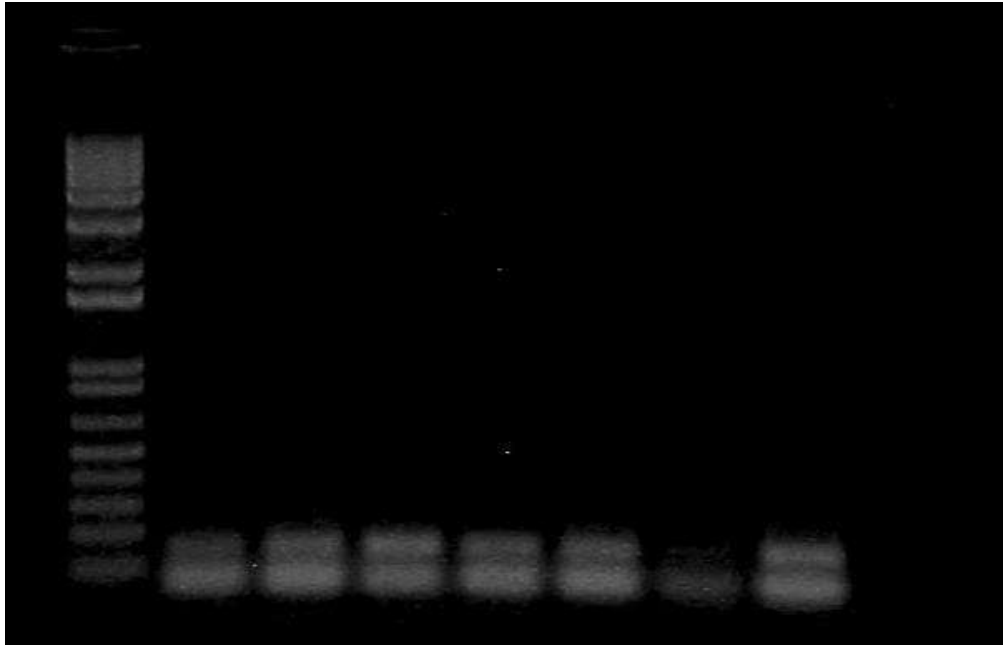


Figura 20. RT-PCR de los cultivos tratados con triterpenos pentacíclicos de *L. laxiflora* var. *patzquarensis* en la expresión del gen GADPH. El orden de las muestras y su cuantificación se muestran en la gráfica 9.

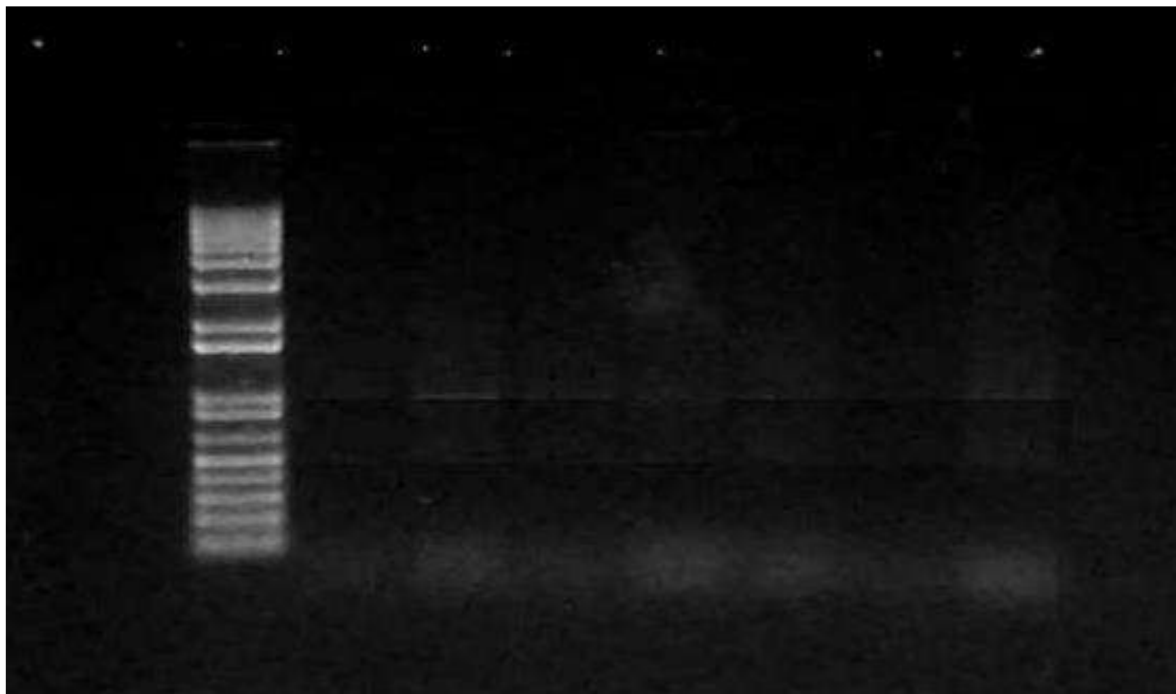
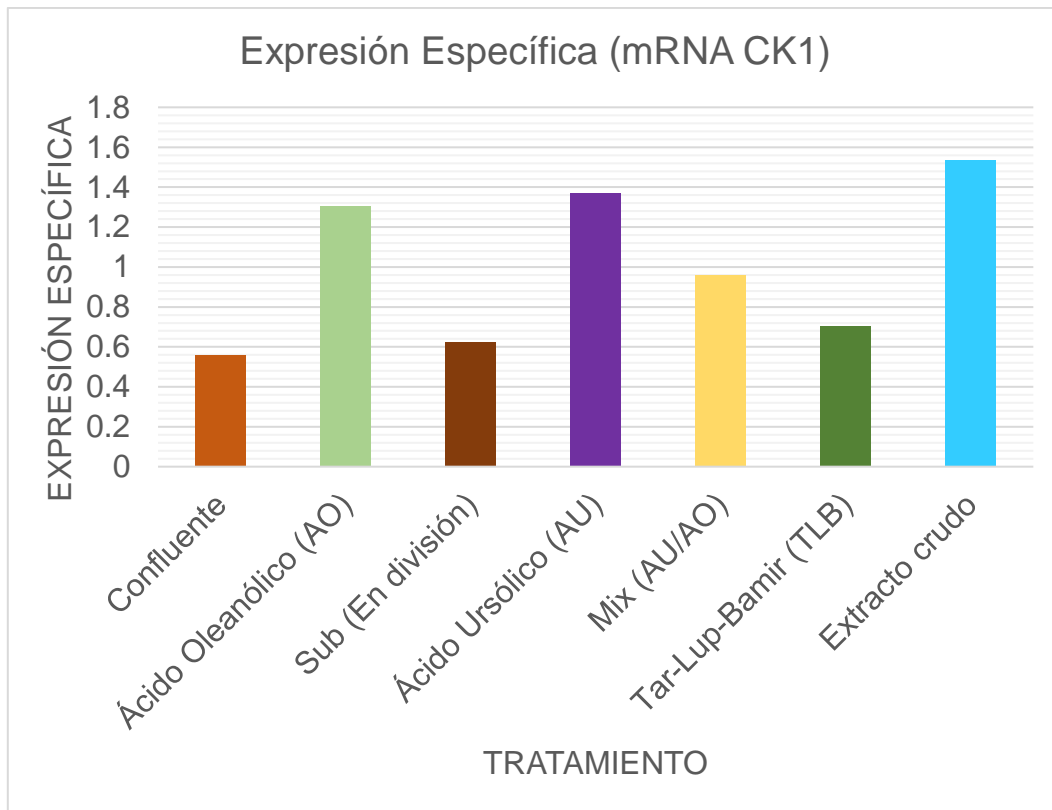


Figura 21. RT-PCR de los cultivos tratados con triterpenos pentacíclicos de *L. laxiflora* var. *patzquarensis* en la expresión del gen de citoqueratina 1. El orden de las muestras y su cuantificación se muestran en la gráfica 9.

En cambio, en el tratamiento con la mezcla de compuestos TLB (Taraxerol, lupeol y beta-amirina, no estimularon la expresión de la citoqueratina 1.



Gráfica 9. Niveles de expresión específicos del gen de la citoqueratina 1 en queratinocitos tratados con triterpenos y extracto de *L: laxiflora var. patzquarensis*. La expresión específica se determinó como el cociente de expresión del gen correspondiente entre la expresión del gene de GADPH en la misma muestra.

Por otro lado, en cuanto a la expresión del gen de citoqueratina 10, como se puede apreciar en la figura 22, su expresión aumentó significativamente en los cultivos tratados con la mezcla de triterpenos TLB, en comparación con los isómeros ácido ursólico y ácido oleanólico, lo que sugiere que los triterpenos TLB actúan en el proceso tardío de activación queratinocítica en el que se involucra a la citoqueratina 10 (Gráfica 10).

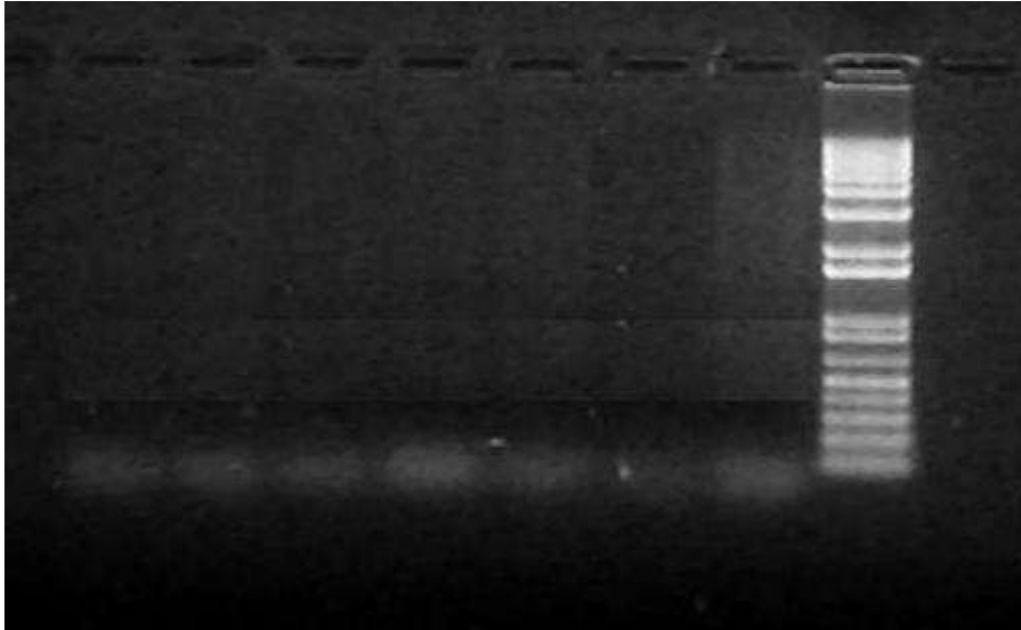
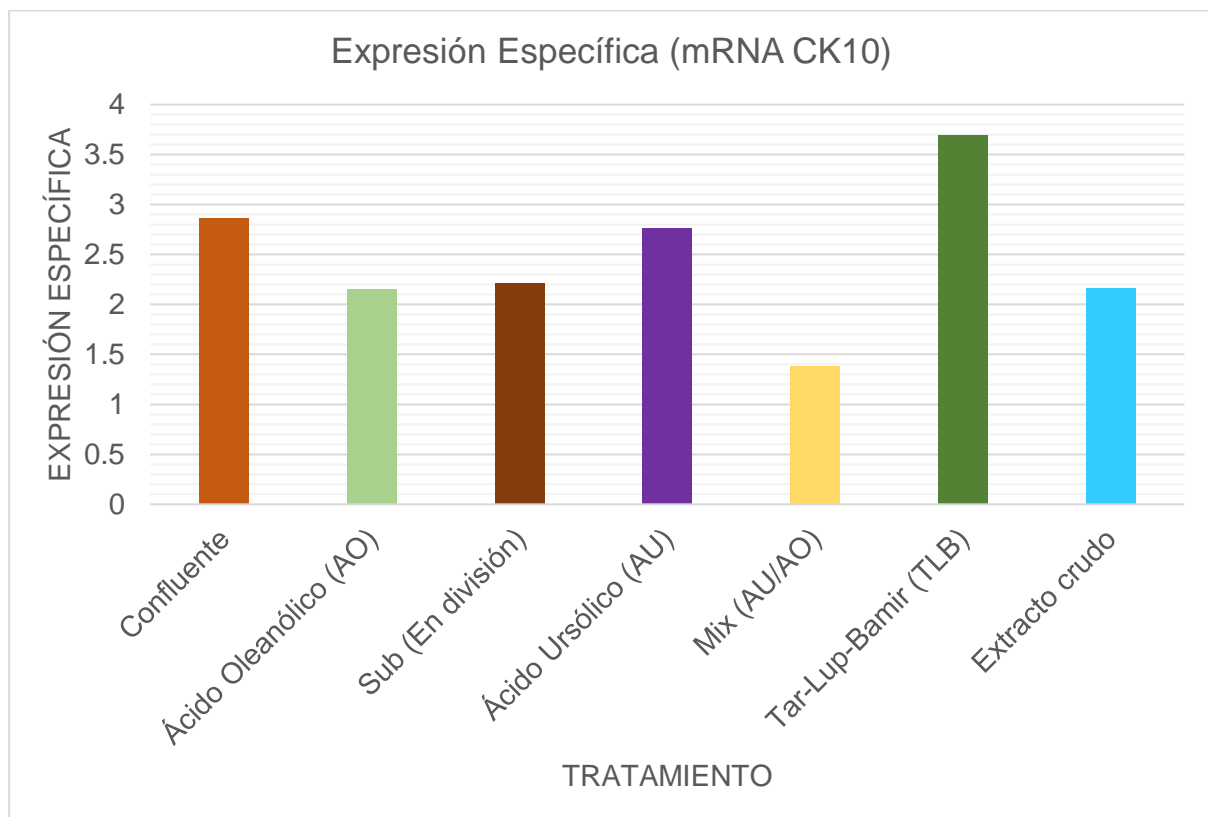


Figura 22. RT-PCR de los cultivos tratados con triterpenos pentacíclicos de *L. laxiflora* var. *patzquarensis* en la expresión del gen de citoqueratina 10.

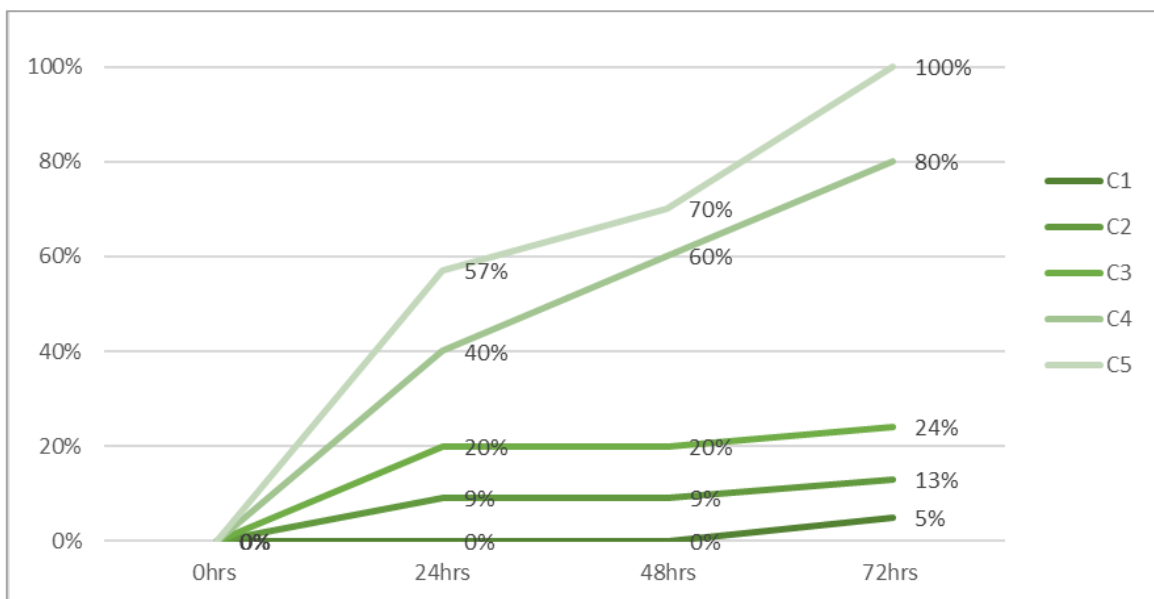


Gráfica 10. Niveles de expresión específicos del gen de la citoqueratina 10 en queratinocitos tratados con triterpenos y extracto de *L. laxiflora* var. *patzquarensis*. La expresión específica se determinó como el cociente de expresión del gene correspondiente entre la expresión del gene de GADPH en la misma muestra.

9.7. Estandarización de ensayo de cierre de herida con secretoma de CTM humanas

Tras la estandarización de la técnica, se pudo apreciar que los cultivos tratados con 25% de secretoma no presentaron actividad migratoria durante las primeras 48 horas postratamiento, sino fue hasta las 72 horas, con un porcentaje de cierre de herida del 5%, ocurriendo de forma similar con los cultivos tratados con 50% de secretoma, donde el porcentaje de migración celular fue del 9% tras las primeras 24 horas postratamiento, manteniéndose hasta las 72 horas, donde aumentó a un 13%, siendo un estímulo mínimo el observado sobre las células cultivadas.

Sin embargo, en los cultivos tratados con 75 y 100% de secretoma, se observó que el porcentaje de cierre de herida a las 24 horas postratamiento fue del 40 y 57% respectivamente, aumentando exponencialmente hasta el cierre de la herida, siendo evidente el estímulo aplicado a las células para su migración hacia el sitio de lesión, tal como ocurre de forma natural en la fisiología cutánea.



Gráfica 11. Porcentaje de cierre de herida por migración celular de la línea celular de fibroblastos Derma-blast.

Además, es importante destacar que en los cultivos tratados con 25 y 50% de secretoma hubo presencia de cuerpos apoptóticos, lo cual determinó que la cantidad de secretoma aplicado fue insuficiente y, por tanto, no contenía la concentración de nutrientes necesarios para la supervivencia celular. A diferencia de estos, en los cultivos tratados con 75 y 100% de secretoma se pudo apreciar una diferenciación

celular importante, crucial para la producción de colágeno en la dermis y la formación de tejido cicatrizal en la piel, según lo reportado en la literatura (Figura 20).

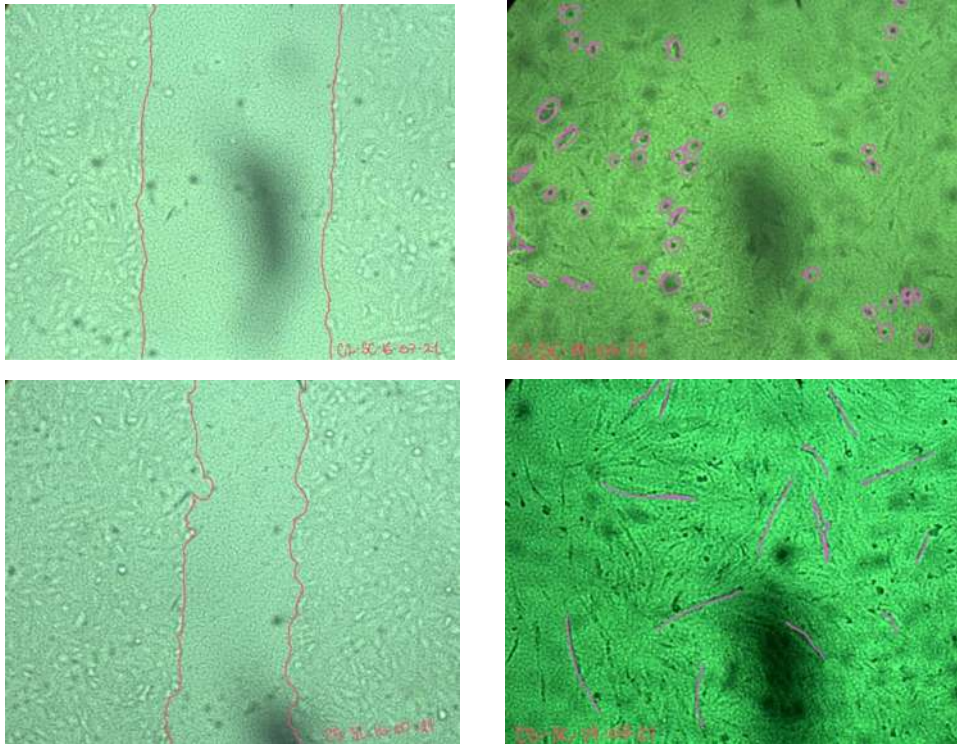


Figura 23. Vista al microscopio de los cultivos celulares Dermablast. Arriba: Células tratadas con 25% de secretoma de CTM en T0 (izquierda) y T72 (derecha). Abajo: Células tratadas con 100% de secretoma de CTM en T0 (izquierda) y T72 (derecha).

12.5. DISCUSIÓN

En la presente tesis se ha descrito ampliamente la importancia del proceso reconstitutivo tisular cutáneo, las diferentes terapias que coadyuvan a este proceso fisiológico, así como los modelos celulares y animales empleados para su estudio. Además, se ha resaltado la importancia y aplicación de la medicina tradicional en la terapéutica regenerativa cutánea. Por ello, en el presente trabajo, a partir de la especie *L. laxiflora* var. *patzcuarensis* se obtuvo el extracto vegetal de hoja utilizando como solventes orgánicos de polaridad media acetato de etilo. De este extracto se obtuvieron directamente los triterpenos pentacíclicos ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO), taraxerol, lupeol y beta-amirina (T-L-B).

Una de las primeras etapas dentro de la reconstitución tisular cutánea es la inflamación, debido a que citocinas proinflamatorias son fundamentales para la activación de células involucradas en la recuperación anatómica y fisiológica del tejido a restaurar. Por ello, para favorecer a la proliferación y diferenciación celular el proceso inflamatorio deberá regularse a la baja, por lo tanto se requieren de señales químicas que induzcan a una actividad antiinflamatoria. Dentro de la pleiotropía farmacológica reportada en los triterpenos pentacíclicos identificados en *Lobelia laxiflora* var. *patzcuarensis* se describe ampliamente su respuesta antiinflamatoria y su participación en procesos reconstitutivos cutáneos.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria de manera aislada en los metabolitos caracterizados, obteniendo resultados prometedores tras las 24 y 48 horas de aplicación, lo cual coincide con la actividad antiinflamatoria reportada en algunos trabajos de investigación. Por ejemplo, en el estudio realizado por Checker y col. en 2012 donde el ácido ursólico inhibe la proliferación de células inmunitarias, así como su correspondiente secreción de citocinas proinflamatorias. Asimismo, en el trabajo realizado por Khanra y col. en 2017 donde se demuestra que el taraxerol posee propiedades antiinflamatorias al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias mediante la inhibición de la activación del factor nuclear-kappa Beta en ratas hiperglucémicas; e igualmente en el estudio realizado por Holanda y col. en 2007 donde describen la capacidad antiinflamatoria de beta-amirina en un modelo murino de periodontitis.

Lo anterior explica la sinergia visualizada en el modelo animal, donde pudo apreciarse como el proceso inflamatorio se reduce de manera significativa tras 24 horas de posttratamiento, tal como se aprecia en su uso tradicional medicinal, además de que hasta el momento no hay reportes en la literatura sobre la sinergia farmacológica de estos compuestos.

Por otra parte, respecto a la viabilidad celular y proliferación celular inducida por estos compuestos, el implementar el ensayo de Azul de Alamar fue una herramienta crucial, ya que permitió además determinar el perfil toxicológico a diferentes dosis de compuestos en queratinocitos epidérmicos humanos HEK293, se pudo observar que al comparar la respuesta proliferativa ante los compuestos ácido ursólico y ácido oleanólico hubo una respuesta antagónica significativa entre ambos, por lo que es importante considerar que la isomerización de un compuesto puede tener un impacto significativo durante la fisiología celular.

También consideramos relevante e interesante que el AU y el AO, más no lupeol/betamirina/taraxerol, participan en la estimulación de la expresión de la citoqueratina 1 y con ello, la activación de la reepitelización. En cambio, los compuestos lupeol/betamirina/taraxerol, y no AO y AU, estimulan a su vez a la citoqueratina 10, involucrada en la diferenciación tardía. En este trabajo hemos encontrado entonces que los 5 compuestos intervienen, de una manera u otra, en efectos antiinflamatorios, en proliferación y en diferenciación de procesos involucrados en restitución cutánea. Faltaría sólo conocer su posible efecto en la migración celular, donde por cierto ya se estandarizó el sistema de migración celular haciendo uso del secretoma aislado a partir de células troncales mesenquimales, y cubriríamos el espectro completo de la participación de estos compuestos en regeneración cutánea.

Finalmente, este trabajo nos muestra un panorama distinto respecto a la importancia de la herbolaria tradicional, ya que generalmente se liga a un manejo inapropiado y/o cuestionable dentro de la comunidad médica, debido al manejo empírico y a la falta de seguridad en cuanto su espectro farmacológico y terapéutico. Sin embargo, esto no es del todo cierto, ya que los productos naturales han demostrado tener un efecto rápido y eficaz en la restitución de tejidos ante situaciones de lesión o de origen patológico.

Además, al emplear metabolitos extraídos de plantas medicinales en conjunto con la medicina regenerativa se pueden desarrollar tratamientos dirigidos hacia la regeneración tisular con mejor efecto farmacológico que los tratamientos alopáticos ya existentes.

Lo anterior confirma las propiedades farmacológicas de plantas utilizadas ancestralmente por la medicina tradicional mexicana, y la importancia de perfilar ese conocimiento ancestral y generacional a un plano científico, garantizando así su confiabilidad y, sobre todo aportando nuevas estrategias más efectivas y seguras para el paciente, siendo el presente trabajo un ejemplo de ello.

10. REFERENCIAS

- Abate, M., Pepe, G., Randino, R., Pisanti, S., Basilicata, M. G., Covelli, V., Bifulco, M., Cabri, W., D'ursi, A. M., Campiglia, P., & Rodriguez, M. (2020). Ganoderma lucidum ethanol extracts enhance re-epithelialization and prevent keratinocytes from free-radical injury. *Pharmaceuticals*, 13(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ph13090224>
- Ahmad, R., Khan, A., Lee, H. J., Rehman, I. U., Khan, I., Alam, S. I., & Kim, M. O. (2020). Lupeol, a plant-derived triterpenoid, protects mice brains against $\alpha\beta$ -induced oxidative stress and neurodegeneration. *Biomedicines*, 8(10), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100380>
- Alqahtani, A., Hamid, K., Kam, A., Wong, K. H., Abdelhak, Z., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K., Li, K. M., Groundwater, P. W., & Li, G. Q. (2013). The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Current Medicinal Chemistry*, 20(7), 908–931.
- Alvarez, C., Garduno, M., Guerrero, M., Martinez, A. M., Miller, B., & Zavala, R. (1979). Medicina tradicional. *Revista del Colegio Nacional de Enfermeras*, 26(104), 23–29.
- Azcona, L. (2004). Quemaduras. Clínica y tratamiento. *Farmacia Profesional*, 18(9), 63–67.
- Bachořík, J., & Urban, M. (2021). Biocatalysis in the chemistry of lupane triterpenoids. En *Molecules* (Vol. 26, Número 8, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26082271>
- Bello, M. Á., Hernández, S., Lara, Ma. B. N., & Salgado, R. (2015). Plantas útiles de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*, 39, 175–215.
- Benítez, G. (2011). www.medigraphic.org.mx Medicina regenerativa y terapia celular. *Rev Mex Med Tran*, 4(2), 70–77.
- Berman, B., Maderal, A., & Raphael, B. (2017). Keloids and hypertrophic scars: Pathophysiology, classification, and treatment. *Dermatologic Surgery*, 43, S3–S18. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000819>
- Bosch, Á. (2001). Las heridas y su tratamiento. *Offarm: farmacia y sociedad*, 89–92.
- Bulstrode, N. W., Mudera, V., McGrouther, D. A., Grobbelaar, A. O., & Cambrey, A. D. (2005). 5-Fluorouracil selectively inhibits collagen synthesis. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116(1), 209–221. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000169701.16509.D6>
- Cabourne, E., Clarke, J. C. K., Schlottmann, P. G., & Evans, J. R. (2015). Mitomycin C versus 5-Fluorouracil for wound healing in glaucoma surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006259.pub2>

- Cappiello, F., Casciaro, B., & Mangoni, M. L. (2018). A novel in vitro wound healing assay to evaluate cell migration. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(133), 10–15. <https://doi.org/10.3791/56825>
- Castillo, A. (2015). *Síntesis de terpenos bioactivos: empleo de Bellardia trixago y ciclaciones biomiméticas*.
- Castrillón, L., Palma, A., & Padilla, C. (2008). La función inmunológica de la piel. *Dermatología Revista Mexicana*, 52(5), 211–224.
- Castro Manrreza, M. E., & Montesinos Montesinos, J. J. (2015). Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1), 38–44.
- Castro Méndez, I. (2006). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(2), 0–0.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., & Zuo, Z. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218.
- Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>
- Cruz, A. (2003). Biología de la cicatrización. *Revista Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 11(1), 45–62.
- D'Agostino, A., Adriana Pirozzi, A. V., Finamore, R., Grieco, F., Minale, M., & Schiraldi, C. (2020). Molecular mechanisms at the basis of pharmaceutical grade triticum vulgare extract efficacy in prompting keratinocytes healing. *Molecules*, 25(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules25030431>
- D'Agostino, A., Maritato, R., La Gatta, A., Fusco, A., Reale, S., Stellavato, A., Pirozzi, A. V. A., De Rosa, M., Donnarumma, G., & Schiraldi, C. (2019). In vitro evaluation of novel hybrid cooperative complexes in a wound healing model: A step toward improved bioreparation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms20194727>
- Del pozo, J., & Vieira, V. (2016a). Láser y cicatrices. *Revista de la Sociedad Española de Heridas*, 6(3), 6–28.
- Del pozo, J., & Vieira, V. (2016b). Láser y cicatrices. *Revista de la Sociedad Española de Heridas*, 6(3), 6–28.
- Eguskiza, L. I., Pardo, M., & Villanueva, M. (2002a). Heridas, contusiones y pequeños traumatismos. *Farmacia Profesional*, 16(8), 58–71.
- Eguskiza, L. I., Pardo, M., & Villanueva, M. (2002b). Heridas, contusiones y pequeños traumatismos. *Farmacia Profesional*, 16(8), 58–71.

- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- Enciso, E., & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(4), 231–237.
- Esquivel-García, R., Pérez-Calix, E., Ochoa-Zarzosa, A., & García-Pérez, M. E. (2018). Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 2018(125), 95–132. <https://doi.org/10.21829/abm125.2018.1339>
- Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., & De Boer, J. (2013). Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*, 31(2), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003>
- Fernández-Aparicio, Á., Correa-Rodríguez, M., Castellano, J. M., Schmidt-RioValle, J., Perona, J. S., & González-Jiménez, E. (2022). Potential Molecular Targets of Oleanolic Acid in Insulin Resistance and Underlying Oxidative Stress: A Systematic Review. En *Antioxidants* (Vol. 11, Número 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11081517>
- Flores Macías, R. (2017). *Evaluación biológica in vitro de biomateriales de PLA-PCL-nHA aplicables a la regeneración de tejidos óseos*. 80.
- Folquitto, D. G., Swiech, J. N. D., Pereira, C. B., Bobek, V. B., Halila Possagno, G. C., Farago, P. V., Miguel, M. D., Duarte, J. L., & Miguel, O. G. (2019). Biological activity, phytochemistry and traditional uses of genus *Lobelia* (Campanulaceae): A systematic review. *Fitoterapia*, 134(December 2018), 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.12.021>
- Gawronska-Kozak, B., & Bukowska, J. (2017). Animal Models of Skin Regeneration. *Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition*, 343–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00014-0>
- Ghiulai, R., Roșca, O. J., Antal, D. S., Mioc, M., Mioc, A., Racoviceanu, R., Macașoi, I., Olariu, T., Dehelean, C., Crețu, O. M., Voicu, M., & Șoica, C. (2020). Tetracyclic and pentacyclic triterpenes with high therapeutic efficiency in wound healing approaches. *Molecules*, 25(23), 1–38. <https://doi.org/10.3390/molecules25235557>
- Gioanetto, F., & Blas Cacari, M. (1998). Etnobotánica y herbolaria p'urepecha. *Bioagricoop*, 1, 1–80.
- Gioanetto, F., & Cacari, M. B. (1991). Medicina tradicional, herbolaria y etnobotánica de las comunidades purépecha de la Meseta. *Acta Botánica Mexicana*, 14, 3–21.
- Godinez-Orozco, J. (2020). *Obtención de metabolitos secundarios de Lobelia laxiflora variedad patzquarensis con actividad antiinflamatoria en fitodermatitis*

por contacto inducida por *Toxicodendron radicans*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- Gomes, R. N., Manuel, F., & Nascimento, D. S. (2021). The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. En *NPJ Regenerative Medicine* (Vol. 6, Número 1, pp. 1–12). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00153-z>
- Gómez, A. E. (2009a). Primeros auxilios (y II) Contusiones. *Farmacia Profesional*, 23(6), 50–51.
- Gómez, A. E. (2009b). Primeros auxilios. Quemaduras, heridas y contusiones. *Farmacia Profesional*, 23(5), 42–45.
- Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P., & Landínez-Parra, N. S. (2013). Proceso de cicatrización de heridas, campos endógenos y su relación con heridas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 61(4), 441–448. <https://doi.org/10.5833/jjgs.37.1743>
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Gutiérrez, Á., & Estevés, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S.XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España)*, 103(2), 409–419.
- Hernández Ramírez, P. (2010). Regeneración biológica. Secretos de la naturaleza. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 26(2), 1.
- Hernández-Pasteur, G., Silva-Bermúdez, P. S., Reyes-Chilpa, R., Vibrans, H., & Soto-Hernández, M. (2019). EVALUACIÓN in vitro DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE *Buddleja cordata* KUNTH Y *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(2), 93–99. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.2.93-99>
- Ipav, S. S., Igoli, J. O., Tor-Anyiin, T. A., & Anyam, J. V. (2022). Isolation and characterisation of alpha and beta amyryns from Propolis obtained from Benue State. En *J. Chem. Soc. Nigeria* (Vol. 47, Número 2).
- Jiang, Y., Tsoi, L. C., Billi, A. C., Ward, N. L., Harms, P. W., Zeng, C., Maverakis, E., Michelle Kahlenberg, J., & Gudjonsson, J. E. (2020). Cytokocytes: The diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*, 5(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142067>
- Kaivola, S., Parantainen, J., Österman, T., & Timonen, H. (1983). Hangover Headache and Prostaglandins: Prophylactic Treatment with Tolfenamic Acid. *Cephalalgia*, 3(1), 31–36. <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1983.0301031.x>
- Killick, D. J. B. (1964). CAMPANULACEAE. *Bothalia*, 8(2), 164–165. <https://doi.org/10.4102/abc.v8i2.1621>

- Kwon, H. H., Yoon, J. Y., Park, S. Y., Min, S., Kim, Y. Il, Park, J. Y., Lee, Y. S., Thiboutot, D. M., & Suh, D. H. (2015). Activity-guided purification identifies lupeol, a pentacyclic triterpene, as a therapeutic agent targeting multiple pathogenic factors of acne. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(6), 1491–1500. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.29>
- Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Le Bitoux, M.-A., & Haftek, M. (2008). Fisiología cutánea: queratinización epidérmica. *EMC - Podología*, 10(3), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s1762-827x\(08\)70695-3](https://doi.org/10.1016/s1762-827x(08)70695-3)
- Liu, Y., Yang, L., Wang, H., & Xiong, Y. (2022). Recent Advances in Antiviral Activities of Triterpenoids. En *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Número 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15101169>
- Loyola-Vargas, V. M., Sánchez-Iturbe, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L. C., Moreno-Valenzuela, Ó., & Galaz-Ávalos, R. M. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1), 67–94.
- Lucha Fernández, V., Muñoz Mañez, V., Fornes Pujalte, B., & Garcia Garcerá, M. (2008). La cicatrización de las heridas. *Enfermería Dermatológica*, 2(3), 8–15.
- Luchnikova, N. A., Grishko, V. V., & Ivshina, I. B. (2020). Biotransformation of oleanane and ursane triterpenic acids. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235526>
- Manteca Martín, A. (2013). *Biología de la piel y cáncer*. Universidad de Cantabria.
- Marcos, V., & Ruiz, A. (2009a). Cambios en la cicatrización de heridas durante el envejecimiento cutáneo. *Advances in Skin & Wound Care*, 17(4), 8–16. <https://doi.org/10.5833/jjgs.37.1743>
- Marcos, V., & Ruiz, A. (2009b). Cambios en la cicatrización de heridas durante el envejecimiento cutáneo. *Advances in Skin & Wound Care*, 17(4), 8–16. <https://doi.org/10.5833/jjgs.37.1743>
- Martín, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Martínez, C., & Domínguez, J. (2018). *Endocrinología de la piel*. 16(3), 149–166.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Flavonoides: propiedades y acciones anti-oxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271–278. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514919>
- Martínez-Santamaría, L., Guerrero-Aspizua, S., & Del Río, M. (2012). Bioingeniería cutánea: aplicaciones preclínicas y clínicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 103(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2011.03.006>

- Meléndez-Gómez, C., & Kouznetsov, V. (2005). ALCALOIDES QUINOLÍNICOS: IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y ESFUERZOS SINTÉTICOS. *Revista de la Facultad de Ciencias*, 10(2), 5–18.
- Merino Pérez, J., & Noriega Borge, M. J. (s/f). *La piel: Estructura y funciones. Fisiología general*.
- Misra, A. K., & Varma, S. K. (2017). Effect of an Extract of Agave americana on Wound Healing Model in Experimental Animals. *J Basic Clin Pharma*, 8(2), 45–48. www.jbclinpharm.org
- Mlala, S., Oyedeji, A. O., Gondwe, M., & Oyedeji, O. O. (2019). Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules24152751>
- Mori, H. M., Kawanami, H., Kawahata, H., & Aoki, M. (2016). Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- β in a rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1128-7>
- Múzes, G., & Sipos, F. (2022). Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. En *Cells* (Vol. 11, Número 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11152300>
- Navarrete, G. (2003). Histología de la piel. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 46(4), 130–133.
- Ojito-Ramos, K., & Portal, O. (2017). *Metabolitos secundarios de las plantas, una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés económico*. Editorial Académica Española.
- Park, Y., Huh, K. M., & Kang, S. W. (2021). Applications of biomaterials in 3D cell culture and contributions of 3D cell culture to drug development and basic biomedical research. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22052491>
- Pascual Casamayor, D., Pérez Campos, Y. E., Morales Guerrero, I., & Castellanos Coloma, Ivett González Heredia, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *Medisan*, 18(10), 1444–1451.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68–81.
- Perdomo, E., Pérez, M. F., Benítez, M. D., & Ruiz, C. (2018). Los detritos en el proceso para una correcta preparación del lecho de la herida. *Gerokromos*, 29(3), 141–144.

- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 11(4), 195–211. <https://doi.org/10.1109/ICGCloT.2015.7380510> M4 - Citavi
- Petkovic, M., Vangmouritzen, M., Mojsoska, B., & Jenssen, H. (2021). Immunomodulatory properties of host defence peptides in skin wound healing. En *Biomolecules* (Vol. 11, Número 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom11070952>
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. En *Cell* (Vol. 184, Número 15, pp. 3852–3872). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Rex Jeya, R. S., Muthukumar Nadar, M., & Selvakumar, P. M. (2018). Phytochemicals as a potential source for anti-microbial, anti-oxidant and wound healing - a review. *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry*, 2(2). <https://doi.org/10.15406/mojboc.2018.02.0058>
- Rodriguez Saenz, A. A., Martínez-Carreño, M. A., & Munévar-Niño, J. C. (2018). El potencial terapéutico del secretoma de las células troncales. *CES Odontología*, 31(2), 36–47. <https://doi.org/10.21615/cesodon.31.2.4>
- Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 8(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>
- Samdavid Thanapaul, R. J. R., Ranjan, A., Manikandan, S. K., & Nadar, M. S. A. M. (2020). Efficacy of Lobelia alsinoides Lam ethanolic extract on a third-degree burn: An experimental study on rats. *Dermatologic Therapy*, August, 1–10. <https://doi.org/10.1111/dth.14242>
- Sami, D. G., Heiba, H. H., & Abdellatif, A. (2019). Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine*, 24(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.12.001>
- Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2003a). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363.
- Serna, J., Vitales, M., López, M. C., & Molina, A. (2012a). Dermatología. En *Abordaje y Manejo de las Heridas*. (pp. 841–875).
- Serna, J., Vitales, M., López, M. C., & Molina, A. (2012b). Dermatología. En *Abordaje y Manejo de las Heridas*. (pp. 841–875).
- Serrato Rodríguez, J., & Ruiz Marines, A. (2017). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 9(17), 49. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58151>

- Smits, J. P. H., Niehues, H., Rikken, G., Van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Van De Zande, G. W. H. J. F., Zeeuwen, P. L. J. M., Schalkwijk, J., & Van Den Bogaard, E. H. (2017). Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12041-y>
- Socarrás-Ferrer, B. B., Del Valle-Pérez, L. O., De la Cuétara-Bernal, K., Marsán-Suárez, V., Sánchez Segura, M., & Macías-Abraham, C. (2013). Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa. *Revista Cubana Inmunología y Hemoterapia*, 29(1), 16–23. <http://scielo.sld.cu>
- Sreedevi, P., Ijnu, T. P., Anzar, S., Bincy, A. J., George, V., Rajasekharan, S., & Pushpangadan, P. (2013). Ethnobiology , ethnobotany , ethnomedicine and traditional knowledge with special reference to India. *Annals of Phytomedicine*, 2(2), 4–12.
- Tavira, C. A., Ortega, A., Dávila, I., Estrada, S., & Meneses, A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(4), 35–46.
- Tolstikova, T. G., Sorokina, I. V., Tolstikov, G. A., Tolstikov, A. G., & Flekhter, O. B. (2006). Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. En *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* (Vol. 32, Número 1, pp. 37–49). <https://doi.org/10.1134/S1068162006010031>
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>
- Ud-Din, S., & Bayat, A. (2017). Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration*, 25(2), 164–176. <https://doi.org/10.1111/wrr.12513>
- Vedula, S. R. K., Ravasio, A., Lim, C. T., & Ladou, B. (2013). Collective cell migration: A mechanistic perspective. *Physiology*, 28(6), 370–379. <https://doi.org/10.1152/physiol.00033.2013>
- Vela Romera, A. (2018). *Caracterización histológica, histoquímica e inmunohistoquímica de la piel palmoplantar humana*.
- Viesca, C. (2017). *Medicina del Mexico antiguo* (Vol. 91, pp. 399–404).
- Villamizar, V. E. M., Caballero, J. M. Á., & Gómez, H. S. (2010). Terpenos con actividad biológica anti-VIH. *Duazary*, 72(2), 257.
- Wilhelm, K. P., Wilhelm, D., & Bielfeldt, S. (2017). Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Research and Technology*, 23(1), 3–12. <https://doi.org/10.1111/srt.12317>

Zhang, X. N., Ma, Z. J., Wang, Y., Sun, B., Guo, X., Pan, C. Q., & Chen, L. (2017). Angelica Dahurica ethanolic extract improves impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes. *PLoS ONE*, *12*(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177862>

Zheng, Q., Wang, Y., & Zhang, S. (2021). Beyond Alkaloids: Novel Bioactive Natural Products From Lobelia Species. *Frontiers in Pharmacology*, *12*(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.638210>

11. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

LIBROS:

- Hesequio, R. (2015). Cicatrización. En: Lecciones de Dermatología (págs. 392-395). McGraw Hill Interamericana
- Higashida, B. (2013). Órganos de los sentidos y la piel. En: Ciencias de la Salud. (págs. 120-125). McGraw Hill Interamericana
- Majumdar, M. & Roy N.D. (2019). Terpenoids: the biological key molecules. En: Terpenoids against Human Diseases (págs. 39-60). CCR Press.
- Ross, M.H. & Wojciech, P. (2016). Sistema tegumentario. En: Histología. texto y atlas. Correlación con Biología celular y molecular. (Págs. 545-586). Wölters Kluwer.
- Saladin, K. (2013). El Sistema Tegumentario. En: Anatomía y Fisiología: la unidad entre forma y función, 6e. McGraw Hill Education.
- Silva R. (2015). Cicatrización. Saúl A(Ed.), Saúl. Lecciones de dermatología, 16e. McGraw Hill.
- Tórtora, G.J. & Derrickson, B. (2006). Principios de Anatomía y fisiología. Editorial Médica Panamericana.

PÁGINAS WEB:

- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 92097, Taraxerol. Retrieved January 1, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Taraxerol>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 64945, Ursolic Acid. Retrieved January 1, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ursolic-Acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 73145, beta-Amyrin. Retrieved January 1, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Amyrin>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 10494, Oleanolic Acid. Retrieved January 4, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleanolic-Acid>.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 259846, Lupeol. Retrieved January 1, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lupeol>.

12. ANEXOS

ANEXO I: PARÁMETROS Y CONDICIONES A ESTABLECER PREVIOS AL MONTAJE DE UNA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Antes de llevar a cabo la separación del extracto de hoja de *Lobelia laxiflora var. patzquarensis* obtenido en hexano y acetato de etilo mediante cromatografía en columna, se establecerán los parámetros y condiciones a emplear para el montaje de la columna:

W_m = peso del extracto seco
d = diámetro de la columna a utilizar
h = altura de la corrida
V_f = volumen de la fracción
N_f = número de fracciones
V_p = volumen por polaridad a emplear ($V_p = V_f$)

Primeramente se determinó la cantidad de extracto a utilizar, la cual fue de al menos 10 gramos y, considerando que la actividad regenerativa de la planta observada de manera empírica se produce una vez sometida a cocción, se estableció establecer que los metabolitos de interés son termorresistentes, además de tratarse de moléculas con carácter lipofílico (apolares), por lo que para su separación se seleccionaron 2 disolventes orgánicos de baja polaridad: hexano y acetato de etilo, los cuales fueron manejados en diferente proporciones, con la finalidad de facilitar la fragmentación del extracto para su posterior purificación, y facilitar el número de las fracciones a obtener, tal como se indica en las siguientes tabla:

Tabla 5. Disolventes por emplear como fase móvil en cromatografía en columna en extracto acetato de etilo (%).

Disolvente	Proporciones para manejar								Total de fracciones
Hexano	100	90	70	50	30	10			8
Acetato de etilo		10	30	50	70	90	100		
Metanol								100	
Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H	

Nota: el metanol se adicionó con la finalidad de “arrastrar” compuestos que pudiesen quedar atrapados en el gel de sílice posterior a la cromatografía en columna.

Tabla 6. Disolventes por emplear como fase móvil en cromatografía en columna en extracto hexano (%)

Disolvente	Proporciones para manejar											Total de fracciones
Hexano	10 0	90	8 0	7 0	6 0	5 0	40	30	2 0	1 0		12
Acetato de etilo		10	2 0	3 0	4 0	5 0	60	70	8 0	9 0	10 0	
Metanol											10 0	
Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	

Posteriormente, se estableció el diámetro de columna a utilizar (*d*), por lo que se seleccionó una columna de mínimo 4 cm de diámetro. Una vez conocido el diámetro de la columna a manejar, se determinó la altura ideal para la corrida de nuestro extracto, recordando que para garantizar una separación eficaz la altura deberá de ser mínimo de 4 pulgadas, por lo que se determinó que *h* ideal para la corrida sería de 6 pulgadas (15.24 centímetros).

Luego se calculó el volumen “muerto” (*V_p*) a recolectar al inicio de la corrida:

Primero se estableció la fórmula para calcular el volumen de un cilindro, correspondiente al lugar donde se encontrará el gel de sílice con el disolvente, ya que la columna utilizada tiene forma cilíndrica:

$$V_{cil} = a_b * h$$

donde *a_b* = área de un círculo y *h* = altura del cilindro

Sin embargo, para calcular el área de un círculo usando la fórmula *a_b* = π * *r*², por lo que la fórmula se modifica de la siguiente manera:

$$V_{cil} = (\pi * r^2) * h$$

Una vez determinada la fórmula se procedió a calcular el volumen de la zona de la columna a manejar, tomando en cuenta los parámetros previamente establecidos,

donde V_{cil} corresponde al 100% de volumen a emplear para llevar a cabo la cromatografía en la columna (gel de sílice con disolvente). Una vez conocido el valor de V_{cil} , se calculó el volumen de disolvente a utilizar por fracción (V_p) mediante la siguiente relación:

$$V_p = 60\% \text{ disolvente y } 40\% \text{ gel de sílice}$$

No obstante, el número obtenido se multiplicó por 3, que corresponde al número de veces que se adicionó el disolvente dando así un volumen “muerto” o volumen libre de productos naturales, correspondiente además al valor de V_f .

Asimismo, tomando en cuenta la proporción de los solventes a utilizar, se calculó la cantidad necesaria de disolventes para llevar a cabo la cromatografía en columna:

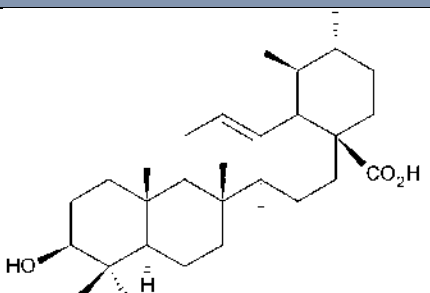
Hex 100% Hex-AcOEt 9:1

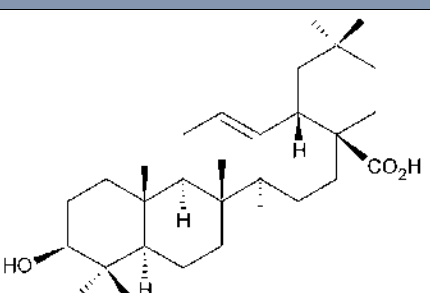
Hex-AcOEt 7:3 Hex-AcOEt 5:5

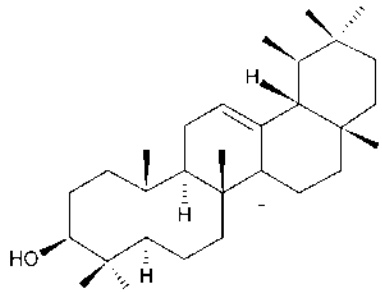
Hex-AcOEt 3:7 Hex-AcOEt 1:9

AcOEt 100%= Hex 100% Vol. Total Hex/ AcOEt= _____

ANEXO II: FICHAS DESCRIPTIVAS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS

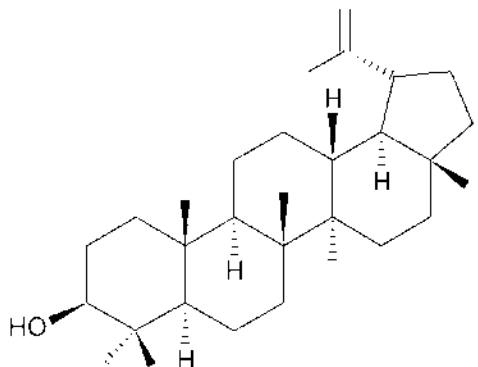
ÁCIDO URSÓLICO	
	NOMBRE CIENTÍFICO Ácido 3 beta-hidroxi-12-ursen-28-ico
	CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Peso molecular: 456.711 g/mol Apariencia: Agujas prismáticas finas blanquecinas. Punto de fusión: 284°C Punto de ebullición: 556.9°C
DESCRIPCIÓN El ácido ursólico es un triterpeno pentacíclico de la familia de los ursanos.	APLICACIONES Antineoplásico, antiinflamatorio (inhibidor de la ciclooxigenasa), antibiótico, emulsificante.

ÁCIDO OLEANÓLICO	
	NOMBRE CIENTÍFICO Ácido 3 beta-hidroxioleano-12-en-28-oico
	CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Peso molecular: 456.711 g/mol Apariencia: Agujas prismáticas finas blanquecinas. Punto de fusión: 310 °C Punto de ebullición: 553.5°C
DESCRIPCIÓN El ácido oleanólico es un triterpeno pentacíclico de la familia de los oleananos, obtenido del metabolismo del ácido mevalónico. Se distingue de su isómero ácido ursólico	APLICACIONES Antineoplásico, antiinflamatorio, antibiótico, emulsificante.

β-AMIRINA	
	NOMBRE CIENTÍFICO 3β-Hidroxiolean-12-eno
	CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Peso molecular: 426.729 g/mol Apariencia: Punto de fusión: Punto de ebullición: 553.5°C
DESCRIPCIÓN La beta amirina es un triterpeno pentacíclico de la familia de los oleananos, que se caracteriza por presentar un grupo funcional hidroxilo	APLICACIONES En general este compuesto es aislado junto con su isómero alfa amirina, por lo que ambos han sido estudiados como antiinflamatorios.

en posición 3 beta y un doble enlace entre los carbonos C12 y C13.

LUPEOL



NOMBRE CIENTÍFICO

Lup-20(29)-en-3beta-ol, Fargasterol.

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

Peso molecular: 426.729 g/mol

Apariencia: Cristales en forma de agujas

Punto de fusión: 215–216 °C

Punto de ebullición: 488.1°C

Densidad: 0.9457 g/ cm³ a 218°C

Muy soluble en etanol, acetona y cloroformo. Soluble en éter, benceno, éter de petróleo, alcohol tibio.

Insoluble en ácidos y álcalis diluïdos.

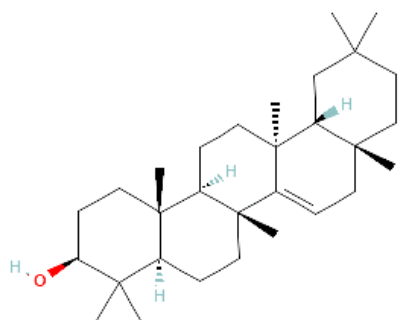
DESCRIPCIÓN

El lupeol es un triterpeno pentacíclico de la familia de los lupanos. Se caracteriza por tener un grupo hidroxilo en su posición 3β, que sustituye un grupo hidrógeno.

APLICACIÓN BIOLÓGICA

Antiinflamatorio, antiacné, antineoplásico.

TARAXEROL



NOMBRE CIENTÍFICO

D-Friedoolean-14-en-3beta-ol, Alnulina.

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

Peso molecular: 426.729 g/mol

Apariencia:

Punto de fusión:

Punto de ebullición: 553.5°C

DESCRIPCIÓN

El taraxerol es un triterpeno pentacíclico de la familia de los ursanos, que se distingue por carecer de un grupo metilo en C14 y presenta un grupo alfa metilo en C13, así como un doble enlace entre los carbonos C14 y C15.

APLICACIONES

No se han descrito aplicaciones de este compuesto; sin embargo, algunos derivados de este han sido estudiados con el propósito de encontrar una actividad farmacológica relevante.

ANEXO III: LECTURAS TOMADAS PARA LOS ENSAYOS DE CON AZUL DE ALAMAR.

Porcentaje de alamarBlue® reducido			TIEMPO: 0 HORAS									
			ARLW = ALW – (AHW x RO) x 100									
AO 50	AO 10	AO 5	AO 1	AO 0.1	TLB 50	TLB 10	TLB 5	TLB 1	TLB 0.1	DMS O 2UL	medio+ AA	
0.038890283	0.17434746	0.02884526	0.15826321	0.17615762	0.17214894	0.18552955	0.17489086	0.1898271	0.19194652	0.093343589	0	
EX 50	EX 10	EX 5	EX 1	EX 0.1	AU 50	AU 10	AU 5	AU 1	AU 0.1	XV	medio	
0.11318296	0.18449715	0.18481754	0.17679771	0.19882605	0.14980967	0.20270014	0.19011871	0.19681979	0.19778422	0.212907856	0	

Porcentaje de alamarBlue® reducido			TIEMPO: 24 horas									
			ARLW = ALW – (AHW x RO) x 100									
AO 50	AO 10	AO 5	AO 1	AO 0.1	TLB 50	TLB 10	TLB 5	TLB 1	TLB 0.1	DMS O 2UL	medio+ AA	
0.180741914	0.27063297	0.12633347	0.284312	0.29209035	0.28578706	0.27815135	0.27971925	0.280162	0.27473317	0.285376091	0	
EX 50	EX 10	EX 5	EX 1	EX 0.1	AU 50	AU 10	AU 5	AU 1	AU 0.1	XV	medio	
0.296614931	0.30101222	0.33566243	0.33847597	0.33113003	0.32073018	0.30498355	0.30735494	0.29341933	0.28990477	0.293936833	0	

ANEXO IV:

AMPLICONES Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO DE RT-PCR DE CITOQUERATINAS 1 Y 10

- ARNm citoqueratina 1= 9 EXONES

- AMPLICON - 6-7 EXONES

ATTCTGAGCTGAATCGTGTGATCCAGAGACTTAGATCTGAAATCGACAATGTC
AAGAAGCAGATCTCCAATTGCAGCAGTCCATCAGTGATGCAGAGCAGCGTGG
CGAG**AATGCCCTCAAGGATGCCAA**

OLI Inicio → **ATTCTGAGCTGAATCGTGTGAT**

OLI Reverso → **CTTGGCATCCTTGAGGGCATT**

Producto = 131 bases

Ligas

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_006121.4
- http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;q=ENSG00000167768;r=12:52674736-52680407;t=ENST00000252244

- ARNm Citoqueratina 10 = 8 EXONES

- AMPLICÓN (2 -3,4)

CATCCTGCTTCAGATCGACAATGCCAGGCTGGCAGCTGATGACTTCAGGCTGA
AGTATGAGAATGAGGTAGCTCTGCGCCAGAGCGTGGAGGCTGACATCAACGGC
CTGCGTAGGGTGCTGGATGAGCTGACCCTGACCAAGGCTGACCTGGAGATGCA
AATTGAGAGCCTGACTGAAGAGCTGGCCTATCTGAAGAA**GAACCACGAGGAGG**
AAATGA

OLI Inicio EXON (2) → **CATCCTGCTTCAGATCGACA**

OLI Reverso **EXÓN (3Y4)** → **TCATTCCTCCTCGTGGTTC**

Producto = 218 bases

Ligas

- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_000421.5?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=VP39MXCG01N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_000421.5?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=VP39MXCG01N)