



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
LABORATORIO DE CARDIOLOGÍA MOLECULAR**

Evaluación *in vitro* de la respuesta proliferativa y migratoria de la línea celular L6 de mioblastos de rata ante el estímulo del extracto de hojas de orquídea *Prosthechea Karwinskii*.

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
Licenciada en Biomedicina

**PRESENTA:**  
Patricia Camacho Romero

**DIRECTOR:**  
D. en C. José Everardo Avelino Cruz

Puebla, Puebla. mayo 2024



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
LABORATORIO DE CARDIOLOGÍA MOLECULAR**

Evaluación *in vitro* de la respuesta proliferativa y migratoria de la línea celular L6 de mioblastos de rata ante el estímulo del extracto de hojas de orquídea *Prosthechea Karwinskii*.

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
Licenciada en Biomedicina

**PRESENTA:**  
Patricia Camacho Romero

**DIRECTOR:**  
D. en C. José Everardo Avelino Cruz

Puebla, Puebla. mayo 2024

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Plantas medicinales</b>	<b>7</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Antecedentes Generales</b>	<b>9</b>
3.1.1 Mioblastos	9
3.1.2 Prosthechea Karwinski	11
<b>3.2 Antecedentes Particulares</b>	<b>14</b>
3.2.1. Compuestos con actividad biológica	14
3.2.2. Migración celular	22
3. 2.3. Líneas celulares como modelo de estudio in vitro	28
3.2.4. Línea celular L6	29
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>32</b>
<b>5. HIPÓTESIS CIENTÍFICA</b>	<b>34</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>6.1 Objetivo General</b>	<b>34</b>
<b>6.2 Objetivos Particulares</b>	<b>34</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>35</b>
<b>7.1 Cultivo celular</b>	<b>35</b>
<b>7.2 Dilución del extracto</b>	<b>35</b>
<b>7.3 Ensayo de herida</b>	<b>36</b>
7.3.1 Fijación y tinción.	37
7.3.2 Captura de imágenes	37
<b>7.4 Proliferación celular</b>	<b>38</b>
7.4.1 Conteo celular	38
<b>7.5 Análisis de datos</b>	<b>39</b>
7.5.1 Análisis de imágenes	39
7.5.2 Análisis conteo celular	39
<b>7.6 Análisis estadístico</b>	<b>40</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<b>8.1. Migración celular</b>	<b>41</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>PERSPECTIVAS.</b>	<b>53</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>54</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>56</b>

## **ABREVIATURAS.**

ACG: Acido Clrogenico

ME2: Enzima malica 2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosín trifosfato

AZA: Acido azelaico

AZA: Ácido azelaico

BHK: Baby Hamster Kidney

CCl<sub>4</sub> : Cloruro de carbono

CGA: Ácido Clorogenico

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico

CHO: Chinese Hamster Ovary

CIIDIR: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional

CONEVAL: Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social

COX: Ciclooxygenasa

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

NHEK: Normal Human Epidermal Keratinocytes

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

AML: Leuemia meloide aguda

GDP: Guanosín difosfato

GMP:Guanosín monofosfato

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

GTP: Guanosín monofosfato

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HS-CRP: Prueba de proteína C-reactiva de alta sensibilidad

IF: Filamentos intermedios

MEC: Matriz Extracelular

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

NHDF: Normal Human Dermal Fibroblasts

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Buffer fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PLA2: Fosfolipasa A2

QA: Ácido quinico.

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa1.

UPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography

## 1. RESUMEN

La orquídea *Prosthechea Karwinskii*, endémica de Oaxaca, es utilizada en diferentes preparados (tés, ungüentos) por los pobladores de la Mixteca Oaxaqueña para tratar padecimientos como tos, diabetes, heridas y quemaduras leves. Además, se le atribuyen propiedades anti-abortivas según los habitantes de la región. Dada la necesidad de evaluar estas propiedades empíricas desde una perspectiva científica, se han llevado a cabo investigaciones para conocer los compuestos bioactivos presentes en el extracto de las hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*.

En colaboración entre el Laboratorio de Cardiología Molecular del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, se estableció un proyecto para evaluar la actividad del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* en la migración y proliferación de una línea celular de mioblastos.

Los resultados mostraron que el tratamiento con 30  $\mu$ l extracto de las hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*, con una concentración de 15.625  $\mu$ g/ $\mu$ L, tiene un efecto favorable sobre la migración de mioblastos L6, sugiriendo que los compuestos activos presentes en el extracto, como el ácido quínico, ácido málico, guanosina, rutina, kaempferol-3-O-rutinosido y ácido azelaico, promueven la migración celular.

Además de la evaluación de la migración celular, también se realizaron estudios de proliferación celular. Sin embargo, los resultados indicaron que el extracto no favorece la proliferación celular, lo cual puede estar relacionado con la presencia de compuestos como el ácido succínico, la L-fenilalanina, el ácido neoclorogénico y la embelina, los cuales tienden a inhibir la proliferación celular o favorecer la apoptosis en ciertos casos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Plantas medicinales

Las plantas han abastecido las necesidades de la humanidad desde tiempos remotos, principalmente como fuente de alimento y nutrientes, pero también como parte del tratamiento de enfermedades en las primeras poblaciones. En Mesopotamia, mediante un sistema de escritura sobre tablillas, se conoce acerca de la utilización de plantas desde el año 2600 a.c. Por otro lado, en China se tienen los primeros registros del uso de la medicina tradicional desde hace más de 3000 años [43]. Dentro de la medicina moderna, en el siglo XVIII, el uso de la corteza de sauce era utilizada para aliviar el dolor y la fiebre. La amplia diversidad de las plantas es una valiosa fuente de información que puede ser aprovechada para adquirir nuevo conocimiento; los compuestos activos y las estructuras presentes en las plantas son recursos que aún no han sido explorados en su totalidad [59].

A lo largo de los años y con los avances tecnológicos que permiten identificar de manera más precisa los compuestos presentes en las plantas, la investigación nos ha brindado una variedad de compuestos benéficos, tales como antioxidantes, antiinflamatorios y analgésicos, derivados de diversas plantas. Además, se ha observado que el número de patentes de pequeñas moléculas derivadas de las plantas se mantuvo relativamente constante desde 1984 hasta 2003 [57]. Además de proporcionar compuestos activos como base para diferentes tratamientos, las plantas medicinales también pueden actuar como potenciadores para tratamientos preexistentes. En algunos casos favorecen la distribución y absorción de diferentes fármacos [57].

Si bien el uso de la medicina tradicional permanece hasta la actualidad, no es un secreto que la incidencia en este tipo de prácticas ha variado respecto a tiempo, en parte por los avances científicos que brindan nuevas y mejores alternativas respecto a la medicina tradicional. Datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) de 2012 refieren que casi la mitad de la población en muchos países industrializados utiliza alguna forma de medicina tradicional; en Estados Unidos un 42%, en Australia un 48%, y en muchos otros países también se hace un uso importante de alguna de

sus modalidades, en Chile un 71% y Colombia un 40%. Con esto, podemos concluir que, si bien, en algunos países la incidencia es poca, en otros países representa una alternativa altamente utilizada entre la población.

Datos de Sen y colaboradores, indican que del 56% de las drogas prescritas en la actualidad, el 24% son derivados de especies vegetales, 9% son productos sintéticos modelados a partir de productos naturales, 6% se extraen directamente de especies vegetales y el 5% son de origen animal; esto refuerza la importancia de la investigación de plantas y sus propiedades para el enriquecimiento de la medicina actual [59].

En 2018, las publicaciones relacionadas con el análisis de plantas aumentaron de 4,686 en 2008 a 14,884, triplicando su cantidad. Durante los últimos 10 años, la información de la investigación sobre plantas medicinales proviene principalmente de países como China, India, Estados Unidos y Corea del Sur, que representan alrededor del 58% de la información total. Asimismo, China tiene una de las farmacopeas más extensas a nivel mundial [14].

Por su parte, México es el segundo país más importante en conocimientos tradicionales, donde el uso de plantas no solo se limita a la ornamentación o ceremonias, sino que también en el tratamiento de enfermedades. Con una amplia biodiversidad, México cuenta con aproximadamente 4,500 especies de plantas medicinales [33].

En el contexto nacional, Oaxaca es un estado con un vasto conocimiento tradicional de plantas medicinales, gracias a la herencia de 19 grupos étnicos. Estas plantas medicinales han llenado de conocimiento médico a lo largo de la historia a los pobladores, pues para los oaxaqueños, los usos tradicionales de las plantas medicinales se conservan y se continúan transmitiendo de generación en generación [33].

La orquídea *Prosthechea Karwinskii* endémica de Oaxaca, es utilizada por los pobladores en el ámbito médico para el tratamiento de tos, diabetes, quedarás,

heridas leves y la prevención de abortos. El estudio de esta flor es reciente, pues la literatura científica muestra una considerable ausencia de conocimiento relacionado con sus propiedades biológicas. La presente investigación surge de la necesidad de explorar a fondo los efectos biológicos de este extracto a nivel celular. Los resultados obtenidos podrían no solo enriquecer el conocimiento actual del extracto de la orquídea, sino también brindar información en el camino de compuestos que pueden favorecer la migración y proliferación celular.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Antecedentes Generales**

##### **3.1.1 Mioblastos**

La capacidad del músculo esquelético de regenerarse fue descubierta en el siglo XIX, pero fue hasta un siglo después que se dio a conocer la base de la generación y regeneración de las miofibrillas musculares, la unidad contráctil del músculo. Se demostró que la miofibrilla está formada por la fusión de mioblastos [69].

Durante el desarrollo embrionario a finales de la tercera semana, en el proceso de gastrulación, las células mesoblásticas dan lugar al mesodermo para-axial, intermedio y lateral. Es en el mesodermo para-axial donde se da lugar a los somitas y en su interior, las células migran hacia los bordes dorsomedial y ventrolateral del somita formando los precursores de las células musculares o mioblastos. Durante la diferenciación celular, los mioblastos se fusionan y forman fibras musculares largas y multinucleadas. Al final del desarrollo fetal, la población progenitora de las fibras musculares generan células en una posición satélite alrededor de las miofibras [55].

En el adulto, las células satélite se encuentran en la superficie de las miofibrillas, por debajo de la membrana basal; estas células descritas en 1961, son las encargadas de la regeneración de las fibras musculares. Las células satélite se encuentran en estado quiescente hasta que son activas por el estrés inducido bajo algún tipo de trauma o bien por la presencia de alguna distrofia muscular [55, 69]. El daño en la fibra muscular es un desencadenante de activación de diversos factores de crecimiento en el microambiente que logran sacar a la célula de su estado de inactivación. Una vez iniciado el proceso de activación, las células se mueven fuera de la lámina basal, y dan lugar a la formación de mioblastos, los cuales pasan por múltiples rondas de división para después fusionarse y formar miofibrillas musculares (Figura 1). El proceso de entrada y salida de las células satélite de su estado activo e inactivo aún no está bien esclarecido, pero se sabe que algunos factores como la presencia de esfingosina-1-fosfato es necesaria para

la entrada de las células al ciclo celular, asimismo la presencia de algunos factores de transcripción como Pax7 participan en la regulación negativa de la división de los mioblastos. Finalmente, la presencia de MyoD parece ser también fundamental para el buen funcionamiento de las células satélite [31].

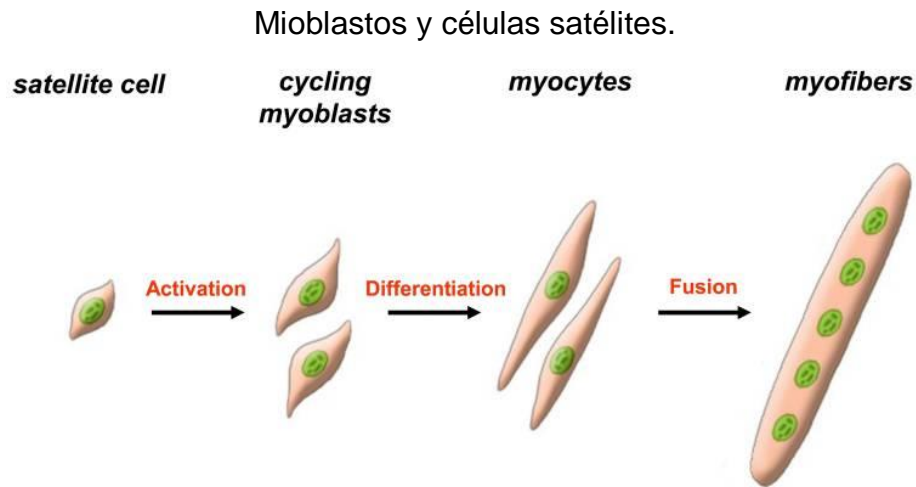


Figura 1. Formación de mioblastos. Imagen obtenida de Fabien Le Grand y colaboradores [31].

Se estima que hay alrededor de 81 núcleos por mm de fibra muscular en la tibia de ratas Sherman de 14 a 17 días de edad, de los cuales el 12% corresponden a núcleos de células satélite. En el humano se calcula que cada célula satélite puede generar al menos  $1 \times 10^7$  células musculares y de una biopsia de  $0.1 \text{ cm}^3$  podrían obtenerse hasta  $5 \times 10^3$  células satélites viables. La obtención de mioblastos provenientes de una biopsia de tejido para la caracterización de su morfología muestran que los mioblastos presentan cinco estadios diferentes que tienden a la homogeneidad con el paso del tiempo. Esférico, cónico irregular, triangular y huso/fusiforme son los estadios que el mioblasto tiene durante su migración para la formación de las fibras musculares; los mioblastos además presentan una curva de crecimiento rápida y las condiciones para su mantenimiento no suelen ser complicadas [20].

El estudio de los mioblastos ha permitido demostrar su capacidad para reconstruir tejido muscular en casos de destrucción muscular aguda, severa e irreversible en ratones, además de identificar que el trasplante de mioblastos también puede dar origen a células satélite.

Los mioblastos también han sido utilizados por su facilidad de crecimiento para el estudio de las cardiopatías isquémicas y se demostró su capacidad para mejorar la función del ventrículo izquierdo después de una inyección intramiocárdica, esto puede estar dado por la mejora en el efecto del andamiaje mecánico. Sin embargo, también se ha demostrado que los mioblastos no se integran electromecánicamente con el tejido miocardio preexistente y favorecen el desarrollo de arritmias [9].

### 3.1.2 *Prosthechea Karwinskii*

Las plantas medicinales forman parte de un recurso importante para el tratamiento terapéutico en diversas comunidades indígenas o en aquellas alejadas de los servicios de salud. En la región mixteca de Oaxaca, al sur de México, se encuentra un tipo de orquídea endémica llamada *Prosthechea Karwinskii*, que crece en bosques de encino o de roble. Esta orquídea, de flores amarillas y un agradable aroma, se compone de flores, hojas y pseudobulbos (Figura 2). Dentro del ámbito de sus aplicaciones se encuentra el uso medicinal, cosmético y principalmente en la decoración de altares durante las celebraciones de Pascua [15].

Orquídea *Prosthechea Karwinskii*



**Figura 2. Fotografía de identificación de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*.** Imagen obtenida de Gabriela Cruz García y colaboradores [15]

Un estudio realizado en 2014 por Gabriela García Cruz y colaboradores reportó que entre la población del municipio de Tlaxiaco, Oaxaca, el uso y conocimiento sobre la orquídea *P. Karwinskii* no es específico, ya que esta orquídea en particular suele ser confundida con una especie hermana llamada *Prosthechea Citrina* a la cual también se le atribuyen propiedades medicinales. Por otro lado, en el mismo estudio, la población que reconoció hacer uso continuo de la orquídea *P. Karwinskii* en el ámbito medicinal, refieren que sus propiedades funcionan en el tratamiento de tos, diabetes, quemaduras y heridas leves [15]. De manera específica, cada parte de la orquídea *P. Karwinskii* se emplea bajo condiciones particulares: los pseudobulbos, combinados con las hojas, se emplean para controlar la hiperglucemia; los pseudobulbos solos se utilizan en el tratamiento de quemaduras; tanto las flores como los pseudobulbos son empleados para aliviar la tos, mientras que las hojas se destinan al manejo de la diabetes. Finalmente, las flores se usan para prevenir o tratar abortos espontáneos [53]. El uso seccionado de la orquídea *P. Karwinskii* puede estar influenciado por los compuestos bioactivos presentes en las flores, hojas y pseudobulbos de la planta, mismos que fueron identificados por Barragan y colaboradores mediante el sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC por sus siglas en inglés)(Anexos 1, 2 Y 3)[3]. En las hojas, podemos encontrar Kaempferol-3-O-rutinoside y Embelina, identificados únicamente en esta parte de la planta. Ácido 3-metilglucárico, ácido 2-hidroxi-sebácico, floridzina y giberelina A7 únicamente se encuentran en el extracto de los pseudobulbos; y finalmente en las flores se encuentran D-tagatosa, 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-deoxihexopiranososa, 1-O-salicil-D-glucosa, 1-O-vanilo-beta-D-glucosa, calaliukiuenosido, 2-metil-2-propanoyl2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosido, (+)-éster  $\beta$ -D-glucopiranosílico del ácido abscísico, miricitrina-5-metil éter, ácido abscísico y (1R,3S,4R)-1-[(3R-4S-6R)-3,4,5,6-tetrahidroxi-6-metoxi-hexoxi]hexano-1,2,3,4,6-pentol [5].

Si bien algunos compuestos son exclusivos de cada estructura de la orquídea, como se mencionó anteriormente, otros se comparten entre hojas, pseudobulbos y flores; entre hojas y flores, y entre hojas y pseudobulbos (Tabla 1) [5]. Son estos compuestos activos de la orquídea *P. Karwinskii* y su actividad biológica, los

posibles responsables de los beneficios del uso de la planta en la medicina tradicional.

Compuestos bioactivos compartidos en *Prosthechea Karwinskii*.

Compuesto	Hojas	Pseudobulbos	Flores
Ácido quínico	•	•	•
Ácido Malico	•	•	•
Ácido Succínico	•	•	•
L-(-) Fenilalanina	•		•
Guanosina	•		•
Ácido Neoclorogenico	•	•	
Ácido Clorogénico	•	•	
Rutina	•	•	
Ácido Azelaico	•	•	•
Ácido sebácico	•	•	
N-Undeconoilglicina	•	•	
Ácido Pinelico	•	•	•

Tabla 1. Compuestos compartidos entre las diferentes partes de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*. Tabla creada con la información de Barragán Zarate y colaboradores [5].

La exploración para confirmar el potencial terapéutico de la orquídea y sus compuestos se ha llevado a cabo a través de diversos estudios, uno de ellos

enfocado en evaluar la administración oral del extracto de la orquídea *P. Karwinskii* en ratas Wistar demostrado ser benéfico en el tratamiento de los síntomas del Síndrome Metabólico. Los resultados revelaron su capacidad para reducir los niveles de glucosa, así como los niveles de tejido adiposo abdominal y epididimal en las ratas. Además, se constató su participación en la disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos [53]. Otro estudio respaldó la noción de que el extracto favorece el aumento de los niveles de adiponectina, reduce los niveles de TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral alfa) y HS-CRP (Prueba de proteína C-reactiva de alta sensibilidad por sus siglas en inglés) y además disminuye la presencia de grasa pericárdica y abdominal. Estos resultados son significativos, ya que estos parámetros están vinculados al desarrollo del síndrome metabólico y los riesgos cardiovasculares en ratas Wistar [4]

Adicionalmente, se ha examinado la actividad antioxidante, antiinflamatoria y los efectos gastroprotectores del extracto. Los resultados indicaron que el extracto de las hojas, en concentraciones bajas y en cultivo celular, puede reducir el porcentaje de expresión de especies reactivas de oxígeno. La evaluación de su actividad antiinflamatoria y gastroprotectora en ratas Wistar hembra reveló una respuesta dosis-dependiente favorable en comparación con el efecto inducido por naproxeno; asimismo, su actividad gastroprotectora fue comparable al efecto del omeprazol [4]. Estos descubrimientos resaltan el potencial terapéutico de la orquídea *P. Karwinskii*, instando a una búsqueda activa en la confirmación de sus beneficios.

## **3.2 Antecedentes Particulares**

### **3.2.1. Compuestos con actividad biológica**

La identificación de los compuestos activos en las plantas medicinales es crucial para entender la eficacia terapéutica, la seguridad en su utilización y el desarrollo de tratamientos. En esta sección, se busca ofrecer una introducción a los compuestos activos presentes en las hojas de la orquídea *P. Karwiinskii*, que presentan información bibliófila y actividad biológica.

### Ácido azelaico

El ácido azelaico (AZA), es un ácido dicarboxílico saturado (Figura 3) que se produce naturalmente en la levadura *Malassezia spp*, pero también se encuentra en varias plantas. En humanos se sintetiza mediante omega-oxidación a partir de ácidos grasos, siendo un componente fisiológico presente en la orina humana. Su metabolismo da lugar a la formación de malonil-CoA o acetil-CoA. Su estructura química le confiere la capacidad de actuar como inhibidor de diversas enzimas oxidorreductoras, incluyendo aquellas involucradas en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN). El ácido azelaico presenta propiedades antibacterianas y antiinflamatorias y se utiliza comúnmente en el tratamiento de afecciones dermatológicas como el acné, la rosácea y condiciones asociadas con la hiperpigmentación [56].

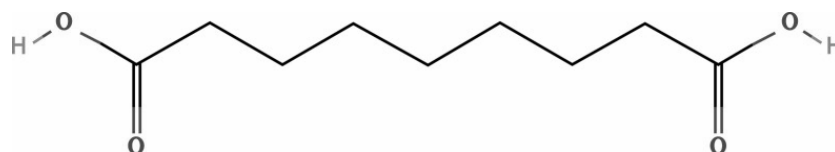


Figura 3. Estructura del ácido azelaico [56].

### Ácido clorogénico

El ácido clorogénico (CGA) (Figura 4), es un fenol presente en una variedad de verduras, frutas y café. Es importante mencionar que uno de sus isómeros, el ácido neoclorogénico, también se encuentra presente en las hojas del extracto de la orquídea *P. Karwinskii*. Dentro de sus actividades biológicas, se encuentra su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antibacterianas y antiviral. En estudios epidemiológicos y ensayos clínicos, el CGA ha demostrado regular el metabolismo de glucolípidos, mejorar la resistencia a la insulina y reducir riesgos asociados con la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. [72].

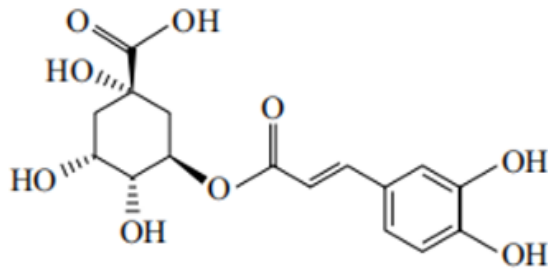


Figura 4. Estructura del ácido clorogénico [72]

En un ensayo clínico con pacientes hipertensos, el CGA, administrado oralmente a través de un extracto de café verde, demostró reducir significativamente la presión arterial en una relación dosis-tiempo, lo que sugiere un papel potencial en la prevención y manejo de enfermedades cardiovasculares [72].

#### Ácido málico

El ácido málico (Figura 5) es un ácido que tiene un papel como regulador de la acidez de los alimentos y como metabolito secundario. El ácido málico es un intermediario en el ciclo del ácido cítrico, aunque también se metaboliza a ácido pirúvico mediante la enzima málica que está presente en muchos sistemas biológicos [45].

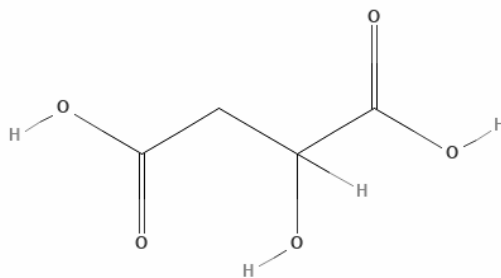


Figura 5. Estructura del ácido málico [45].

El ácido málico y su participación con la enzima málica 2 (ME2) promueve la proliferación y migración de células de glioma. Por otro lado, también se ha observado que la administración oral del ácido málico puede mejorar los síntomas

relacionados con el estrés en ratas, según pruebas de comportamiento animal, como la prueba de campo abierto [29].

### Ácido pinélico

El ácido pinélico (Figura 6) es un ácido trihidroxiociclohexanoico que desempeña un papel como adyuvante. Aunque la revisión bibliográfica no ha revelado estudios que evalúen su mecanismo de acción de forma aislada, se ha registrado su presencia como compuesto activo en otros extractos de plantas [47].

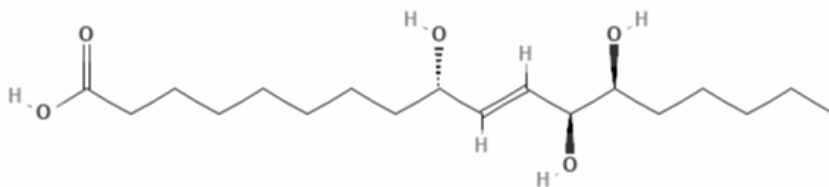


Figura 6. Estructura del ácido pinélico [47].

### Ácido quínico

El ácido quínico (QA) (Figura 7), es un ácido tetrahidroxiciclohexanocarboxílico, que se encuentra en la corteza de la quina, los granos de café y en plantas y frutas como las manzanas y los duraznos [48]

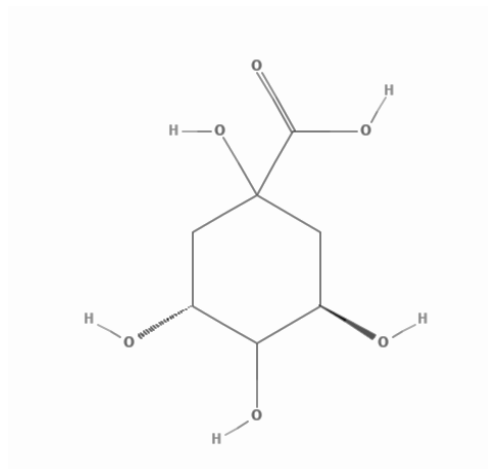


Figura 7. Estructura del ácido quínico[48].

En ratas con padecimiento de colitis ulcerosa, la administración de ácido quínico favorece la reducción de la inflamación, la apoptosis y las lesiones histológicas de colon en ratas Wistar [18].

### Ácido sebácico

Si bien no hay mucha información respecto a este compuesto activo, el ácido sebácico es un ácido dicarboxílico de ocho carbonos (Figura 8) que surge de la  $\beta$ -oxidación de ácidos dicarboxílicos de cadena más larga que provienen de una dieta rica en vegetales. Debido a su ligera solubilidad en agua, el 46% para el ácido sebácico, se elimina a través de la orina. En estudios de una dieta suplementada con ácido sebácico, reportó mejoras significativas del control glucémico en ratones con diabetes tipo 2. Este efecto se asoció con una reducción en la glucosa plasmática en ayunas y la hemoglobina glicosilada, así como un aumento en la sensibilidad a la insulina [35].



Figura 8. Estructura del ácido sebácico [35].

### Ácido succínico

El ácido succínico (Figura 9), es intermediario en el ciclo del ácido cítrico, que ha demostrado tener funciones farmacológicas, pues induce la termogénesis, mejorando la obesidad y la tolerancia a la glucosa. Además, se ha explorado su potencial para el tratamiento de la sepsis y el cáncer.[23]

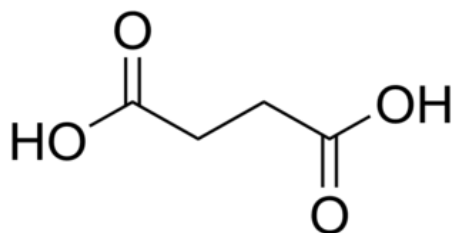


Figura 9. Estructura del ácido succínico [23]

## Embelina

La embelina (Figura 10), proveniente de la planta *Embelia ribes Burm*; también conocida como pimienta negra falsa, ha sido históricamente empleada en el tratamiento de la fiebre, inflamación y trastornos gastrointestinales. Además de sus propiedades analgésicas, se ha observado que favorece la reducción de la insulina plasmática en ratas diabéticas al activar la vía de señalización PI3K/p-AKT. Por otro lado, este compuesto ha demostrado inducir apoptosis mediante vías de señalización, como la inhibición de la acetilación de histonas mediada por enzimas [7].

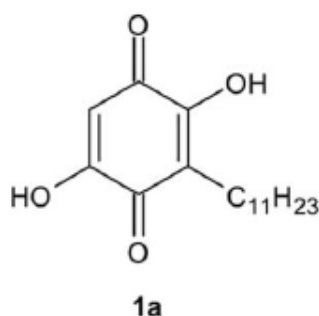


Figura 10. Estructura de la embelina[7].

## Guanosina

La guanosina es un nucleósido compuesto por una guanina unida a un anillo de ribosa (Figura 11). La guanosina se puede fosforilar para convertirse en GMP (guanosin monofosfato), cGMP (guanosin monofosfato cíclico), GDP (guanosin difosfato) y GTP (guanosin trifosfato), que son segundos mensajeros que participan en diferentes vías de transducción de señales[44].

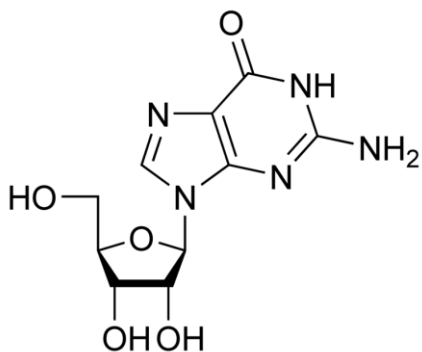


Figura 11. Estructura de la guanosina [44].

De forma aislada, la guanosina se considera un agente neuroprotector, ejerce un efecto antidepresivo en ratas en las pruebas de suspensión de la cola y nado forzado gracias a la activación de las vías de señalización de PI3K/Akt y mTOR.[54].

#### Kaempferol 3-O-rutinósido

El Kaempferol-3-O-rutinoside (Figura 12) pertenece a los flavonoides, un conjunto de compuestos polifenólicos comunes en las plantas, que presentan una amplia diversidad de actividades biológicas, que incluyen propiedades antivirales, antitumorales, antiinflamatorias y vasodilatadoras. En un estudio de hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en ratones, se examinó el efecto hepatoprotector del kaempferol 3-O-rutinósido que demostraron que el kaempferol puede mejorar la estabilidad de la membrana plasmática y contribuir a la reparación del daño en el tejido hepático causado por el CCl<sub>4</sub>. Además se ha observado que el Kaempferol-3-O-rutinoside tiene capacidad cardioprotectora en roedores [67].

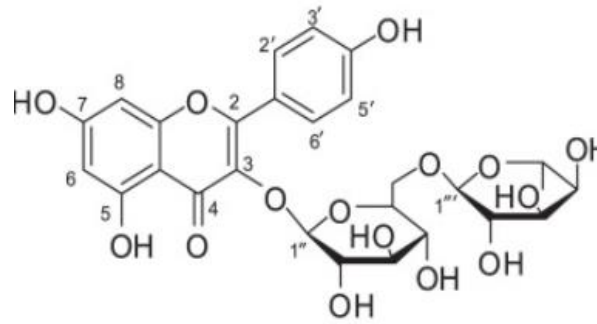


Figura 12. Estructura del Kaempferol-3-O-rutinoside [67].

### L(-) Fenilalanina

La L-fenilalanina es el enantiómero L del aminoácido fenilalanina (Figura 13), y desempeña un papel importante como micronutriente y metabolito en *Escherichia coli*, plantas y algas, áreas en las cuales la información es extensa [45]. Por otro lado, la literatura informa la evaluación de este enantiómero como un agente atenuante de la hipertensión inducida en ratas sensibles a la sal, debido a su capacidad para revertir el complejo inhibitor GCH1-BH4, lo que probablemente contribuye al aumento de la producción de óxido nítrico y a la disminución de la presión arterial [68].

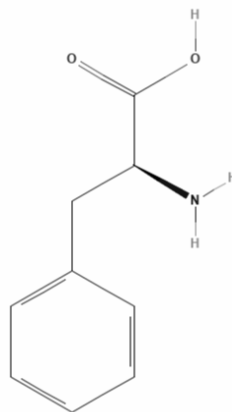


Figura 13. Estructura de la L-fenilalanina [68].

La bibliografía también proporciona información sobre la participación de la L-fenilalanina en la inhibición de procesos metastásicos. Sin embargo, esta acción no es directa, sino que se lleva a cabo a través de la síntesis de diversos derivados de la L-fenilalanina.

### Rutina

La rutina es un flavonoide polifenólico también conocido como quercetina-3-O-rutinosido y vitamina P, que posee una estructura química lipofílica (Figura 14). Este compuesto se extrae de diversas plantas, como *Labisia pumila* y *Sophora japonica*. Su capacidad antioxidante destaca por neutralizar radicales libres y quelar metales de transición. Su eficacia se ve influenciada por la concentración de rutina, tanto como antioxidante como inhibidor de la peroxidación lipídica [38].

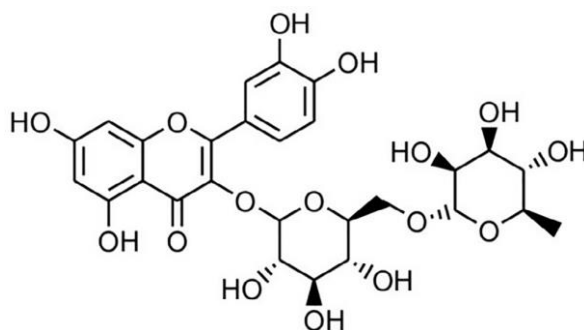


Figura 14. Estructura de la rutina [38].

### 3.2.2. Migración celular

El desplazamiento celular es fundamental en la fisiología de un organismo, pues participa en eventos como la gastrulación durante la embriogénesis, en la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas. La formación de nuevos capilares y la respuesta inmunitaria, donde células como los leucocitos migran hacia sitios de infección o inflamación, son otros de los procesos donde se involucra. Más allá de su función cotidiana, esta característica celular en procesos fisiopatológicos como lo es la formación de metástasis resulta de gran interés [16].

Las células tienen una notable capacidad de respuesta a una amplia variedad de señales y estímulos extracelulares. Estas señales se transmiten de manera eficiente a la maquinaria celular, desencadenando y mediando así el proceso de migración celular. En resumen, este fenómeno se divide en cuatro pasos esenciales: 1) Generación de la señal. 2) Detección de la señal por parte de receptores celulares. 3) Transmisión de la señal hacia la maquinaria celular. 4) Cambios en el citoesqueleto que desencadenan el movimiento celular [16].

Las señales que desencadenan la migración celular abarcan diferentes categorías, como quimiotácticas, haptotácticas, durotácticas y topotácticas. Entre estas, las quimiotácticas, donde las señales provienen de pequeñas moléculas químicas, han sido ampliamente estudiadas. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) destacan como los principales sensores quimiotácticos, responsables de detectar moléculas como el AMPc (Adenosín monofosfato cíclico), quimiocinas, ATP (Adenosín trifosfato) y ADP (Adenosín difosfato). Por otro lado, los receptores de tirosina quinasa pueden interactuar con diversos factores de crecimiento, como los son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), posicionándose así como el segundo tipo de receptor con mayor participación en la quimiotaxis. Las múltiples señales de migración una vez detectadas pueden converger río abajo, lo que resulta en la reorganización de la maquinaria del citoesqueleto, promoviendo su polaridad y dando inicio al proceso de migración [16, 60].

La maquinaria citoesquelética se compone de tres tipos distintos de filamentos: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada uno de estos elementos posee características particulares y desempeñan actividades específicas durante el proceso de migración. Otro componente son las adhesiones focales, un tipo de conexión entre la célula y la matriz extracelular (MEC). Finalmente, los centros organizadores de microtúbulos (MTOC) también juegan un papel importante dentro de la migración (Figura 15) [64]

## Maquinaria relevante para el proceso de migración celular

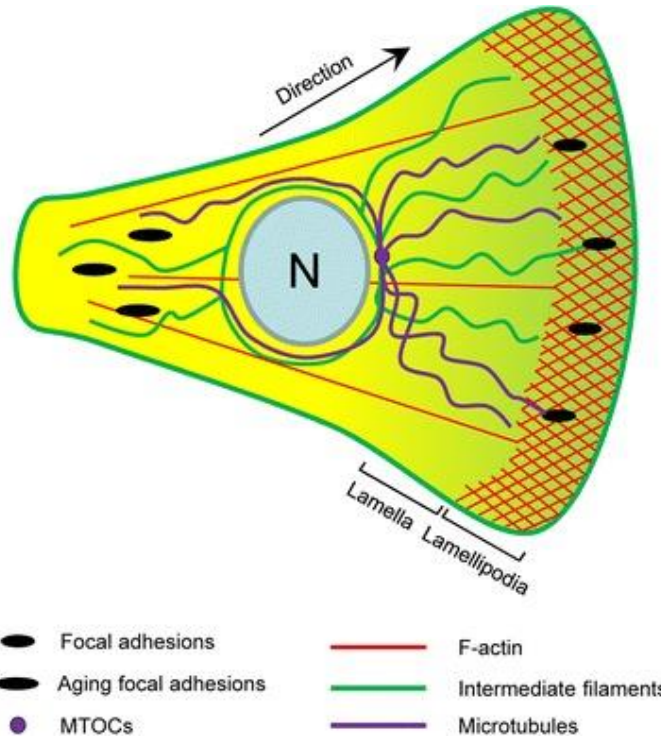


Figura 15. Componentes que participan en la migración celular. Imagen obtenida de Dale D. Tan y colaboradores [64]

Cada uno de estos componentes cumple un papel significativo dentro de este proceso, el cual se comprende como un ciclo de cuatro pasos: primero, la formación de una protuberancia celular llamada lamelipodio; segundo, la creación de nuevas adhesiones focales en la parte frontal de la célula; tercero, la retracción de la célula; y cuarto, la eliminación de las adherencias focales en la parte posterior de la célula. Este proceso permite desmontar la célula y da paso al movimiento del cuerpo celular [64, 32].

Los lamelipodios son extensiones transitorias de la membrana celular, se destacan por su estructura ancha y plana de forma laminar, generada por los filamentos de actina, la formación de esta extensión de la membrana es la responsable de proporcionar direccionalidad durante el proceso de migración celular [42].

La actina, que existe en dos formas, globular (G) y filamentosa (F), forma los filamentos de actina a partir de monómeros de actina G. Estos monómeros se polimerizan para formar estructuras helicoidales asimétricas conocidas como actina

F. El filamento, compuesto por trímeros de actina G, presenta una polarización, con un extremo menos dinámico (-) y un extremo más dinámico (+). La identificación de estos extremos también se puede realizar por la unión existente de ATP al extremo (+) y ADP al extremo (-). La polimerización de estos filamentos es facilitada por la proteína Perilina, la cual regula los procesos de formación de dímeros y trímeros de actina, además de desempeñar un papel crucial en la transición de ATP a ADP [21].

La ramificación de los filamentos de actina es un proceso mediado por el complejo Arp2/3, el cual, al ser activado por la familia de proteínas WASP, tiene la capacidad de unirse a un filamento primario. Este proceso induce el crecimiento de filamentos secundarios en un ángulo aproximado de 70° respecto del filamento primario, dando lugar a la formación de mallas dentro del lamelipodio. Esta dinámica de ramificación contribuye a la generación de fuerza en la parte frontal de la célula y facilita la formación de nuevas adherencias focales en ese mismo sitio [21].

Para lograr una migración celular eficiente, no solo es crucial que la parte delantera de la célula se movilizan adecuadamente, sino que también es esencial que la parte posterior se contraiga de manera activa. Este proceso de contracción activa implica el uso de filamentos de actina, los cuales emplean la miosina para deslizarse antiparalelamente entre sí, generando una fuerza contráctil de tracción delantera. Adicionalmente, la despolimerización controlada de los filamentos de actina en la parte posterior de la célula está mediada por la unión de ADF/cofilina, de esta forma con la polimerización y despolimerización controlada de los filamentos de actina, se favorecen los primeros pasos del proceso de migración celular [64].

Dentro de este contexto, las adhesiones focales facilitan las interacciones específicas entre la célula y la matriz extracelular, mediadas por proteínas como selectinas, integrinas y cadherinas. Además, proteínas como la alfa-actina, talina y tensina establecen la conexión entre las integrinas y el citoesqueleto de actina. Estas adhesiones dinámicas atraviesan un proceso de montaje donde, los dominios citoplasmáticos de la subunidad  $\beta$  de la integrina se vinculan con el dominio de unión a fosfotirosina de la talina, activando así la integrina, la cual se une a los componentes de la matriz extracelular. Simultáneamente, el dominio citoplasmático

recluta proteínas de señalización para la formación de estas adhesiones. Por otro lado, el proceso inverso, el desmontaje, comienza liberando las adherencias mediante la degradación de la matriz extracelular. Posteriormente, se produce un cambio en la adhesión, mediado por el citoesqueleto, y finalmente, se lleva a cabo el desmontaje gracias a la acción coordinada de cinasas y proteasas [66,30].

Los microtúbulos, compuestos por dímeros de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , adoptan la forma de cilindros huecos y se polimerizan en uno o varios centros organizadores de microtúbulos (MTOC). Similar a los filamentos de actina, exhiben una polarización con la  $\beta$ -tubulina en el extremo positivo (+) y la  $\alpha$ -tubulina en el extremo negativo (-). Aunque el crecimiento de los microtúbulos tiende a ser más rápido en el extremo positivo (+) dirigido hacia la periferia celular, este proceso también puede ocurrir en el extremo negativo (-). Este proceso se ve favorecido por proteínas de seguimiento del extremo positivo de los microtúbulos [64].

En el contexto de la migración celular, los microtúbulos y sus proteínas motoras son los encargados de transportar componentes fundamentales para la extensión celular, como componentes de membrana, moléculas de señalización y ARNm codificante de  $\beta$ -actina y subunidades Arp2/3, hacia el frente celular. Un aspecto destacado es la dirección específica de crecimiento de los microtúbulos hacia las adherencias focales en el frente celular, ya que este fenómeno acelera la maduración de las adhesiones focales al permitir el transporte eficiente de integrinas. Se ha observado que en la mayoría de las células, los microtúbulos se acumulan en el frente celular, con los MTOC situados en la dirección de la migración. A diferencia de los filamentos de actina, los microtúbulos no invaden en gran medida al lamelipodio, y son consideradas estructuras de soporte y encargadas de la coordinación espacial y temporal de estos eventos [21, 16].

Finalmente, los filamentos intermedios, con un diámetro de 10 nm, tienen cinco conformaciones distintas, las primeras cuatro citoplasmáticas y la quinta nuclear. Independiente a ello, los filamentos citoplasmáticos comparten una estructura similar, que consiste en unidades de monómeros, que son proteínas específicas llamadas monómeros de filamentos intermedios (IF), dos monómeros de filamentos

intermedios giran entre para formar un dímero y dos dímeros de filamentos intermedios se asocian para formar un tetrámero [21].

Estos filamentos intermedios se encuentran generalmente en el espacio perinuclear o la corteza celular, formando redes específicas según el tipo de filamento. Debido a su capacidad para formar andamios desde la membrana nuclear hasta la periférica, los filamentos intermedios proporcionan un andamiaje esencial para los organelos en su posicionamiento dentro de la célula. Estos filamentos intermedios interactúan con los microtúbulos y filamentos de actina a través de proteínas plaquinas, y aunque no generan fuerza como otros componentes del citoesqueleto durante la migración celular, actúan como un anclaje mecánico dentro del citoplasma para traducir fuerzas a través de toda la célula [21, 64]. Un ejemplo destacado de filamentos intermedios es la vimentina que se ha asociado a la vimentina con la formación, maduración, tamaño y fuerza de las adherencias focales; por ejemplo, bajo la membrana plasmática, interactúa con las colas citoplasmáticas de la integrina  $\beta 3$ , regulando la participación de las integrinas con ligandos extracelulares y la agrupación de las mismas [21].

En conclusión, durante la migración celular, los componentes mencionados desempeñan funciones cruciales en un proceso integral y dinámico y son los cambios moleculares, químicos y físicos los que caracterizan este fenómeno. El conocimiento acumulado ofrece una base para establecer protocolos que permitan comprender la intervención de fármacos, procesos y patologías, influyendo así en el desempeño adecuado de la migración celular.

### 3. 2.3. Líneas celulares como modelo de estudio in vitro

El cultivo celular es una de las técnicas más aplicadas en la investigación. Esta metodología permite la evaluación de diversos procesos y mecanismos celulares, tales como la migración celular, la síntesis de macromoléculas y la diferenciación celular. Además, en el ámbito de la investigación biomédica, proporciona información valiosa sobre el comportamiento de las células bajo el tratamiento con diversos fármacos, hormonas o compuestos activos.

El cultivo celular se relaciona con la forma de obtención de las células. Se habla de un cultivo primario cuando las células se extraen directamente del organismo o de un tejido específico, y de un cultivo secundario cuando las células provienen de un cultivo previo [24]. Un cultivo celular primario es aquel que tiene una alta capacidad de multiplicarse in vitro, se establece a partir de un cultivo primario y tiene las mismas características que el tejido de origen, estos cultivos tienen una capacidad limitada de subcultivos que generalmente ronda entre los 60 y 70 pasajes. En contraste, las líneas celulares continuas son células que, como su nombre indica, tienen la posibilidad de ser subcultivadas in vitro por más de 70 pasajes. Estas líneas pueden originarse a partir de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario que ha perdido la regulación de la proliferación [65].

La primera línea celular inmortal humana tuvo lugar en 1952 debido a una mujer afroamericana llamada Henrietta Lacks, quien desarrolló un carcinoma de cuello uterino maligno. Las células fueron extraídas del tumor y enviadas para su cultivo a la Universidad de Johns Hopkins, donde el investigador George Gay logró obtener las primeras células humanas inmortales capaces de dividirse de manera continua y perpetua fuera del cuerpo. La aparición de esta línea celular permitió grandes avances médicos, como el desarrollo de la vacuna contra el virus de la polio, estudios sobre la respuesta a factores ambientales, perturbaciones genéticas, entendimiento de procesos biológicos y más de 70,000 publicaciones. En la actualidad, las células HeLa pueden encontrarse en una gran cantidad de laboratorios alrededor del mundo, pues siguen siendo parte importante de la investigación médica [10].

Un poco antes de la aparición de las células HeLa, en 1943 se estableció la primera línea celular continua de fibroblastos de rata. Las líneas celulares derivadas de tejidos u órganos animales también han sido de gran importancia en el estudio de la actividad intracelular, la interacción célula-célula y, principalmente, para la producción de fármacos complejos, como vacunas recombinantes y anticuerpos monoclonales. En 1960, se establecieron dos de las líneas provenientes de animales más utilizadas en la producción de fármacos: la línea CHO (Chinese

Hamster Ovary) y la línea BHK12 (Baby Hamster Kidney), que proviene de riñones de cría de hámster. Sin embargo, en la actualidad, existe una gran variedad de líneas celulares que se utilizan dentro de la investigación [65].

Las líneas celulares son de gran importancia, ya que los beneficios derivados de estudiar con esta metodología son evidentes. Contribuyen al desarrollo de vacunas contra enfermedades como la Hepatitis A, la influenza, el sarampión, las paperas, la rabia, la rubéola y la fiebre amarilla. También han sido fundamentales para la producción de anticuerpos, como el Natalizumab-Tysabri, cuyo antígeno es la Integrina y se utiliza en el tratamiento de la esclerosis múltiple [65]. Además, las líneas celulares han sido clave en la investigación de inmunosupresores, algunas hormonas y han brindado un profundo conocimiento sobre enfermedades como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y genéticas.

#### 3.2.4. Línea celular L6

En estudios previos, David Yaffe, profesor emérito del Instituto Weizmann, fue un investigador apasionado por el proceso de desarrollo celular fuera del embrión. Su interés lo llevó a reconocer el potencial del músculo esquelético como objeto de estudio, dado que los mioblastos tienen la capacidad de diferenciarse y fusionarse para formar fibras musculares. La contribución más significativa del Dr. David Yaffe fue la creación de cultivos de mioblastos obtenidos de músculos de ratas recién nacidas, demostrando que los cultivos de mioblastos en proliferación pueden diferenciarse en fibras musculares. Continuando con su investigación, fue en 1967, cuando desarrolló la línea celular muscular conocida como mioblastos de rata L6, la cual lleva ese nombre en conmemoración a la guerra de los Seis Días ocurrida en ese mismo año [7].

La línea celular L6 presenta una herramienta de estudio favorable cuando se habla de procesos de regeneración y/o de relación con el músculo esquelético. Hoy en día los trabajos relacionados con esta línea han permitido tener información sobre las propiedades de la planta *Alectra parasitica subsp. chitrakutensis* como potenciador

en la actividad de captación de glucosa intracelular, además de la seguridad y biocompatibilidad celular del uso del compuesto en las comunidades de la India [52].

Esta línea celular también ha permitido hacer la evaluación de fármacos como el gemfibrozilo, una sustancia derivada del ácido fíbrico que se utiliza para disminuir los niveles de triglicéridos en sangre; un estudio publicado por Liu y colaboradores (2011) demostró que el gemfibrozilo tiene la capacidad de regular las concentraciones de calcio intracelular en los mioblastos L6 e inhibir su capacidad de diferenciación provocando mitotoxicidad [32] planteando una posible identificación de los mecanismos de mitotoxicidad presentes en otros fármacos como los que se utilizan en quimioterapia e inmunoterapia.

De interés particular, los mioblastos muestran ser una prometedora alternativa para su trasplante y participación en la regeneración de afecciones cardíacas, como es el caso del infarto de miocardio. Durante un infarto de miocardio, la función cardíaca se ve afectada por los procesos de inflamación, muerte celular y necrosis, dando como consecuencia la presencia de un tejido fibrótico, inactivo y disfuncional. Un estudio de Siltanen y colaboradores demuestra que el cultivo de láminas de mioblastos transfectados con HGF (Factor de crecimiento hepatocitario) humano mejora la angiogénesis en el miocardio tanto sano como lesionado. Llegando a la conclusión de que el uso de las láminas de mioblastos como vehículo para factores paracrinos de estimulación de la miogénesis permite una mayor concentración y duración de la terapia comparada con inyecciones intramiocárdicas de células o citocinas [62].

A pesar de que estas son solo algunas de las ventajas de la línea celular, la participación de mioblastos en estudios relacionados con la regeneración celular o reparación de daño en áreas localizadas posibilita un planteamiento de nuevas y mejores formas de investigación. Sus propiedades proliferativas y migratorias y su facilidad de manejo en los cultivos celulares propician una línea celular más eficiente.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El empleo de plantas medicinales en el tratamiento de diversas enfermedades es una práctica extendida mundialmente. Esta tendencia se atribuye principalmente a la falacia de que todo lo natural es beneficioso para el ser humano. Esto conduce a la población a afrontar enfermedades de manera alternativa, utilizando infusiones, ungüentos, aceites y pomadas elaborados con plantas o extractos de las mismas. Estos productos, comúnmente conocidos como "remedios de la abuela", forman parte de la tradición y se cree empíricamente que pueden tratar diversas enfermedades. Aunque el uso de estas alternativas puede resultar beneficioso, también plantea riesgos y desafíos para la población.

Muchas plantas medicinales no han sido sometidas a estudios que demuestren su funcionamiento, lo que implica que su eficacia, efectividad y seguridad no estén completamente demostradas. La importancia de realizar estudios previos radica en identificar la toxicidad, los efectos secundarios y las contraindicaciones médicas que estas plantas pueden presentar. Aunque estas prácticas podrían ser contrarrestadas mediante un sistema de salud robusto, lamentablemente en México, según datos del Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL) en 2010, el 33.2% de la población total carecía de acceso a los servicios de salud. En Puebla, para el mismo año, el porcentaje era del 50.4%, y en Oaxaca, del 44.3% [1]. Si bien esta carencia en los servicios de salud desempeña un papel significativo en la población en general, son las zonas rurales las más afectadas. Estas comunidades, debido a la falta de infraestructura y los desafíos con la distancia geográfica, enfrentan mayores dificultades para acceder a los sistemas básicos de salud. Esto lleva a la población a recurrir a remedios tradicionales y habituales de la zona para el tratamiento de enfermedades menores, como es el caso de las infusiones y preparados de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* en el tratamiento de tos, quemaduras leves, heridas y en la regulación de los niveles de insulina.

Aunque el uso de la herbolaria tiene una larga historia, es fundamental respaldar su aplicación con conocimientos sólidos. El uso de plantas en el tratamiento de enfermedades puede ser nulo o contraproducente, pudiendo desencadenar

complicaciones en la enfermedad que se intenta tratar o bien causar daños a largo plazo por su consumo desmesurado.

## **5. HIPÓTESIS CIENTÍFICA**

El extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* favorece la migración y proliferación celular de la línea celular L6.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Determinar el efecto del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*, en la migración y proliferación de la línea celular L6.

### **6.2 Objetivos Particulares**

1. Evaluar el efecto in vitro del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* sobre la migración celular.
2. Evaluar el efecto in vitro del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* sobre la proliferación celular.
3. Identificar la concentración del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* con la mayor eficacia en la migración celular.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.1 Cultivo celular**

La línea celular L6 mioblastos de rata fue donada por el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Fisiología. Para la estandarización del cultivo, el vial de la línea celular fue transportado en hielo desde el tanque de nitrógeno líquido al baño María para descongelar a 37 °C. Una vez descongeladas, las células se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo DMEM-FBS (Medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero fetal bovino) 10% y se sembraron en una caja Petri de 35 mm. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 85-90%, las células se tripsinizaron (Tripsina 0.25%) y fueron nuevamente sembradas. Este procedimiento se repitió según fue necesario para lograr un crecimiento homogéneo y constante. Las condiciones de incubación para todos los cultivos realizados durante la experimentación fueron constantes, manteniendo una temperatura de 37 °C y una atmósfera saturada al 5 % de CO<sub>2</sub>

### **7.2 Dilución del extracto**

El extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*, se obtuvo mediante una colaboración con el Instituto Politécnico Nacional a través del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca.

La obtención del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* se realiza de la recolección de las flores, hojas y pseudobulbos que son secadas, molidas y tamizadas para posteriormente hacer la extracción de los compuestos activos. La extracción de los compuestos se explica por Barragan y colaboradores en su artículo "Prosthechea karwinskii, an orchid used as traditional medicine, exerts antiinflammatory activity and inhibits ROS" La extracción se realiza en un procesador de ultrasonidos de 750 W (VCX 750, Scientific SENNA), con una frecuencia de 20 KHz y una amplitud del 30%. El disolvente empleado es una mezcla de etanol-agua (1:1). Diez gramos de la muestra vegetal en polvo se mezclan con 180 mL de disolvente y la extracción se lleva a cabo a una temperatura

de 40 °C durante 20 minutos, con una duración del pulso de 5 segundos de encendido y 5 segundos de apagado.

Del extracto obtenido por el CIDIIR se pesaron 1.1535 gramos y se colocaron en un tubo cónico de 15 ml. Posteriormente, se agregaron 9.228 ml de PBS 1x estéril y se diluyó con ayuda de un agitador tipo vórtex hasta que se formó una suspensión del extracto (Tubo 1).

A partir de este punto, se trabajó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Se realizó un primer filtrado en un filtro de tipo canasta Corning de 40 µm. Se tomaron 500 µl del primer filtrado y se colocaron en un tubo cónico de 15 ml nuevo, al cual se le agregaron 3500 µl de PBS 1x estéril (Dilución 1:8) (Tubo 2).

Con la dilución del tubo 2, se cargó una jeringa de 3 ml a la cual se le colocó un filtro de pirinola, MILLEX-FG de 20 µm. Se filtró esta solución sobre un nuevo tubo cónico de 15 ml (tubo 3) y se recuperaron 2 ml a los cuales se les añadió 3.6 µl de CaCl<sub>2</sub> (Cloruro de calcio) 1M para obtener una concentración final de 1.8 mM. La dilución final con una concentración de 15.625 µg/µl estéril se rotuló y se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **7.3 Ensayo de herida**

Trabajando en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar, se sembraron células L6 a una densidad de 23 0000 células/cm<sup>2</sup> en una placa de cultivo Costar de 12 pozos, se ajustó a un volumen final de 2 ml de medio de cultivo DMEM-FBS 10% para cada pozo. La placa se mantuvo en incubación durante un periodo de 48 horas en una incubadora húmeda a 37°C y saturada al 5% con CO<sub>2</sub>.

Después del periodo de incubación, se verificó la formación de una monocapa celular uniforme. Posteriormente, se creó una herida sobre la capa confluyente utilizando una punta de micropipeta estéril de 200 µl. Se retiró el medio de cultivo preexistente y se realizaron dos lavados con PBS 1x estéril con la finalidad de eliminar las células suspendidas.

Posteriormente, se añadieron 2 ml de medio de cultivo DMEM-FBS 10% a cada pozo y se llevó a cabo el tratamiento de los cultivos con la dilución del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* estéril. De manera aleatoria, se seleccionaron dos pozos para cada condición: control, 1 µl, 3 µl, 10 µl, 30 µl y 50 µl / 2ml de medio de cultivo. Finalmente, la placa se incubó durante un periodo de 24 horas. Este procedimiento se realizó por triplicado.

#### 7.3.1 Fijación y tinción.

Después de transcurrir las 24 horas, se llevó a cabo la fijación y tinción de las placas. Fuera del entorno estéril, se eliminó el medio de cultivo preexistente y se realizaron dos lavados con 1 ml de PBS 1x para cada pozo. Posteriormente, se añadió 1 ml de solución fijadora (acetona-metanol en proporción 1:1) y se dejó reposar durante 20 minutos a 4 °C. Después de este periodo, se retiró la solución fijadora y se agregó 1 ml de cristal violeta a cada pozo, se dejó reposar durante 10 minutos. Al concluir este tiempo, se retiró el cristal violeta y se realizaron tres series de lavados con 1 ml de agua tridestilada cada uno. Las placas se conservaron con agua tridestilada y en refrigeración hasta el momento de la captura de imágenes.

#### 7.3.2 Captura de imágenes

Las placas multipozos fueron observadas en un microscopio invertido en campo claro con un objetivo 10x (Leica). Las fotografías de las heridas se tomaron acoplado al microscopio DM ILED (Leica) una cámara réflex digital (Nikon D300), tratando de mantener la zona de la herida paralela al eje x de la captura. Las imágenes se capturaron en formato JPEG con una resolución de 12MP.

### **7.4 Proliferación celular**

Trabajando en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar, se sembraron células L6 a una densidad de 34000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo Costar de 6 pozos. Se agregaron 2 ml de medio de cultivo DMEM-FBS 10% a cada pozo, y se incubaron durante un periodo de 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo preexistente y se realizó un lavado con 2 ml

de PBS 1x estéril para cada pozo. A continuación, se agregaron 2 ml de medio de cultivo DMEM-FBS 10% nuevo.

De acuerdo al protocolo, se asignaron cuatro pozos por procedimiento, permitiendo así hacer la evaluación por triplicado. De los cuatro pozos, dos se mantuvieron como condiciones control, mientras que a los dos restantes se les administró un tratamiento de 30  $\mu$ l de la dilución estéril del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*. Finalmente, las placas fueron incubadas durante un periodo de 24 horas.

#### 7.4.1 Conteo celular

Transcurridas las 24 horas de incubación se realizó el conteo celular. Inicialmente, se retiró el medio de cultivo preexistente y se realizaron dos lavados con 2 ml de PBS 1x estéril cada uno. Posteriormente, se agregó 1 ml de Tripsina 1x a cada pozo, y después de un periodo de 5 minutos, se agregó 1 ml de DMEM-FBS 10% se resuspendió con la finalidad de desprender en totalidad las células adheridas a la placa y de detener la acción enzimática.

Para el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer. La muestra se preparó en tubos eppendorf de 2 ml, donde se colocaron 75  $\mu$ l de azul de tripano al 0.4% y posteriormente se agregaron 25  $\mu$ l de la suspensión celular tripsinizada (1:2). Las diluciones celulares se colocaron en la cámara de Neubauer (Marienfeld), misma que fue llevada al microscopio invertido y con un objetivo 10X y se evaluó el número de células presentes.

### 7.5 Análisis de datos

#### 7.5.1 Análisis de imágenes

Las imágenes fueron guardadas en formato JPEG de 12 MP. Con el uso del programa de procesamiento de imágenes Image J, se abrió la imagen, se realizó la conversión a 8 bit y se seleccionó un área de 1900  $\mu$ m de largo por 700  $\mu$ m de alto y finalmente se aplicó un valor constante en el contraste para cada imagen. Se midió el porcentaje de área no cubierta por las células (herida) en cada una de las

muestras. Los valores obtenidos fueron almacenados en una tabla de datos para su posterior análisis.

### 7.5.2 Análisis conteo celular

El conteo celular se realizó de forma manual tomando en cuenta las células presentes en los cuadrantes de la cámara de Neubauer (Figura 16). Se tuvieron en cuenta las especificaciones de uso del fabricante para hacer una selección adecuada de las células contabilizadas.

Cuadrantes observados en la cámara Neubauer

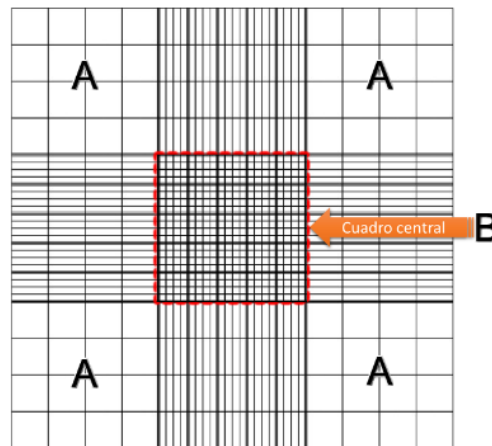


Figura 16. Cuadrantes presentes en la cámara de Neubauer utilizada para la contabilización celular

Una vez contabilizadas las células se aplicó la siguiente fórmula para obtener el número total de células por mililitro de suspensión.

$$\frac{\text{Número de células en los cuadrantes A} \times 10,000}{\text{Número de cuadrantes A}} = \text{Número de células por mililitro de suspensión}$$

### 7.6 Análisis estadístico

La información sobre el porcentaje de área cubierta por las células bajo cada condición que se obtuvo del análisis de imágenes en el programa ImageJ, fue analizado utilizando el software de procesamiento de datos GraphPad Prism. Se aplicó un ANOVA de una vía debido a su capacidad para comparar múltiples grupos

y determinar si existen diferencias significativas entre ellos, permitiendo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto sobre el porcentaje de área cubierta por las células, los resultados se presentaron con el promedio  $\pm$  error estándar y se consideró estadísticamente significativo los valores de  $*p < 0.05$ .

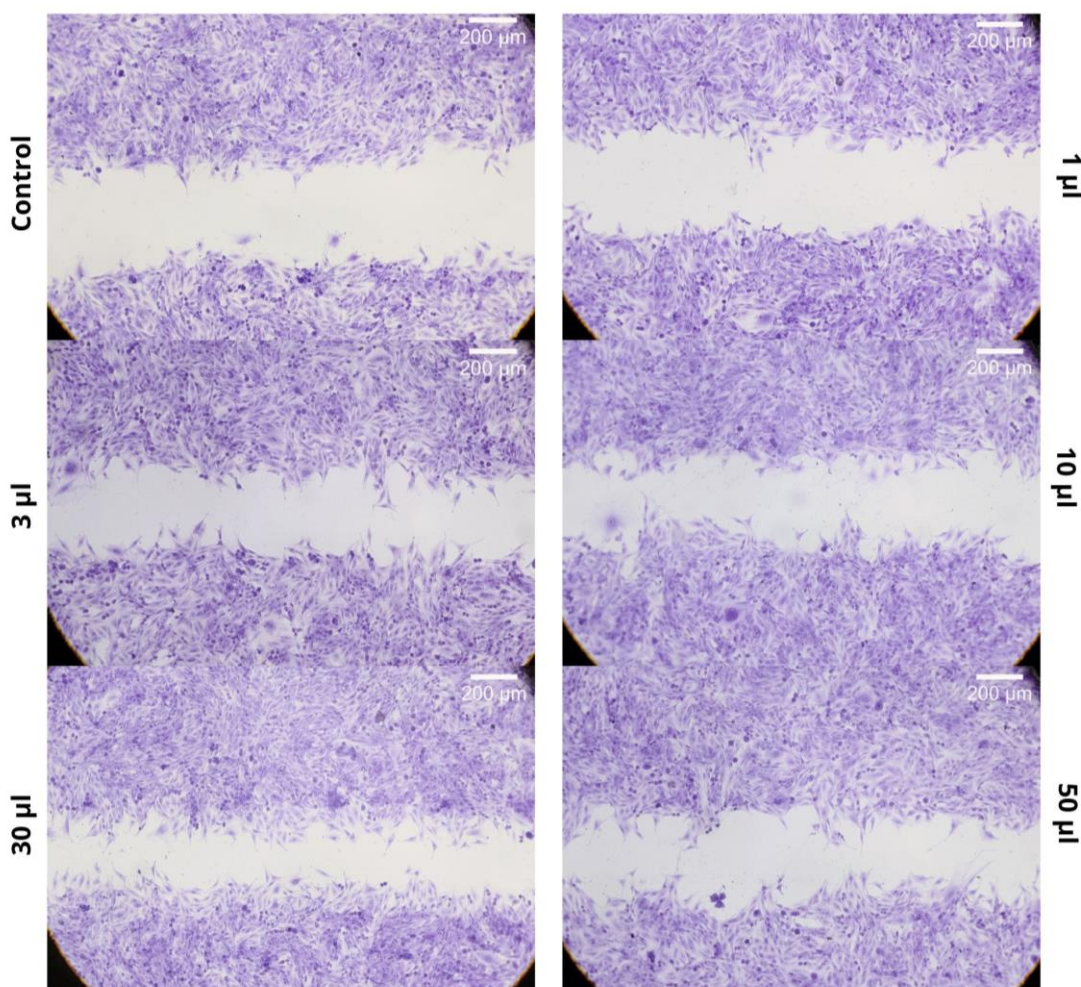
Para evaluar la proliferación celular, se utilizó la prueba t de Student debido a su capacidad para comparar dos grupos independientes y determinar si existen diferencias significativas entre ellos, los resultados se presentaron con el promedio  $\pm$  error estándar y se consideró estadísticamente significativo los valores de  $*p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Migración celular

Con el ensayo de migración celular evaluamos la capacidad de migración de las células L6 y los cambios de esta capacidad bajo la acción de diferentes tratamientos (1  $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$ ) del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*, la cual estaba diluida a una concentración a partir del concentrado de la planta de 15.625  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

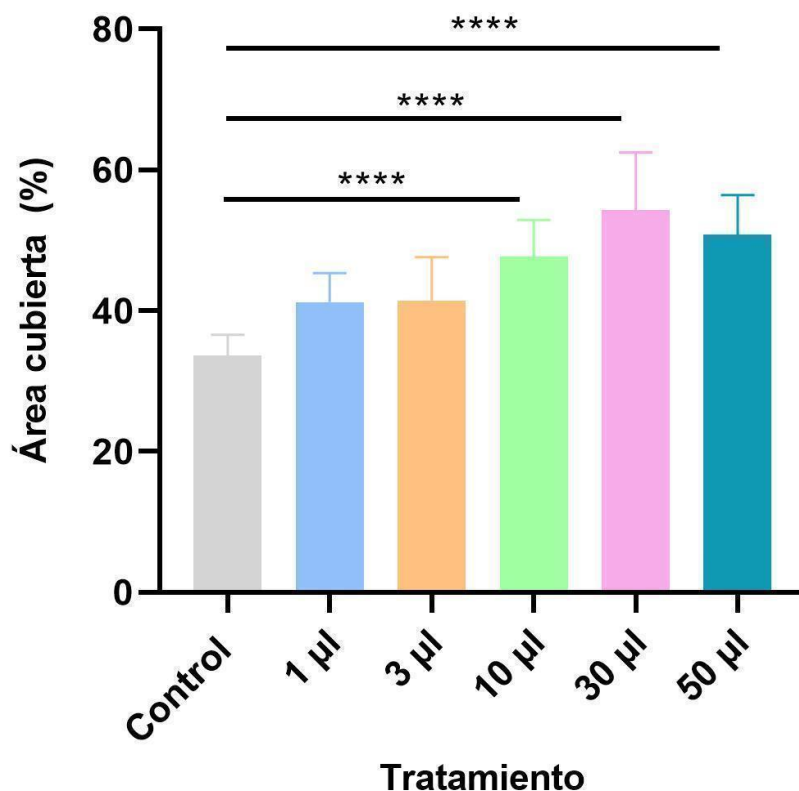
Después de realizar el ensayo de rasguño y el tratamiento de los cultivos con las diferentes concentraciones de *P. Karwinskii*, se procedió a fijar las células y a tomar las fotos representativas de cada condición (Figura 17)



**Figura 17. Migración celular línea L6.** Imágenes representativas del ensayo de migración celular bajo los diferentes tratamientos aplicados del extracto de las hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* con una concentración de 15.625  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

La evaluación del efecto de los tratamientos frente al grupo control reveló que, la capacidad migratoria de las células L6 aumenta en presencia de la *P. Karwinskii*. En la Figura 18, se puede apreciar un efecto dosis dependiente del extracto de la planta sobre la capacidad migratoria de las células L6. El efecto es estadísticamente significativo en los tratamientos con 10, 30 y 50  $\mu\text{l}$  del extracto ( $p < 0.0001$ ), al compararlos con la condición control.

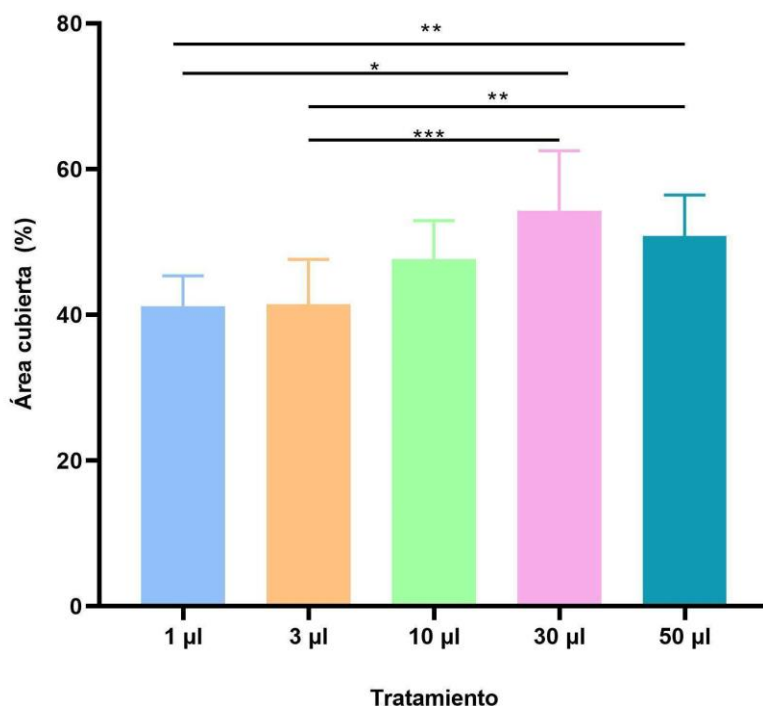
En la condición control, el área cubierta después del rasguño fue de un 33% en promedio, mientras que con los 10  $\mu\text{l}$  de tratamiento, el área cubierta aumentó hasta un 47%, aproximadamente. En el caso de la condición con 30  $\mu\text{l}$ , el área cubierta fue de 54% y con los 50  $\mu\text{l}$ , el porcentaje de cobertura llegó al 50%, en promedio (Figura 18).



**Figura 18. Medición del efecto de *P. Karwinskii* sobre la actividad migratoria de las células L6.** El análisis estadístico ANOVA de una vía dio como resultado que las células tratadas con 10  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$  del extracto de la orquídea con una concentración de 15.625  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  presentan una diferencia significativa en el porcentaje de área cubierta de \*\*\*\*  $p < 0.0001$

respectivamente respecto al grupo control. Los tratamientos con 1  $\mu\text{l}$  y 3  $\mu\text{l}$  del extracto no muestran diferencia significativa en el porcentaje de área cubierta respecto al grupo control.

Al comparar los distintos tratamientos entre sí, sólo se observó un aumento estadísticamente significativo en la recuperación del área levantada con los tratamientos de, 30  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$  del extracto, en comparación con los tratamientos con 1  $\mu\text{l}$  y 3  $\mu\text{l}$  (Figura 19).



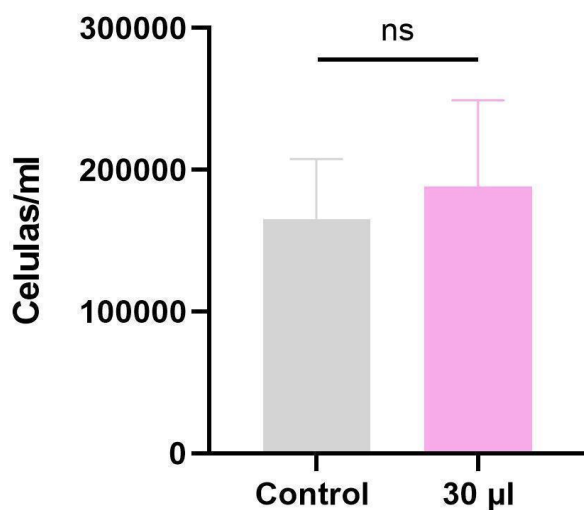
**Figura 19. Evaluación de los diferentes tratamientos entre sí.** El análisis estadístico ANOVA de una vía dio como resultado que las células tratadas con 30  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$  del extracto de las hojas de la orquídea con una concentración de 15.625  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  presentan una diferencia significativa en el porcentaje de área cubierta de \*  $p < 0.0006$  y \*\*  $p < 0.01$  respectivamente respecto al tratamiento con 1  $\mu\text{l}$  y de \*\*\*  $p < 0.0002$  y \*\*  $p < 0.007$  respectivamente en comparación con el tratamiento de 3  $\mu\text{l}$ .

El tratamiento con 1 y 3  $\mu\text{l}$  del extracto de la planta no mostró efecto significativo sobre la actividad migratoria con respecto al control. Sin embargo, sí hay diferencias estadísticas entre los tratamientos con concentraciones variables de *P. Karwinskii*. (Figura 19)

## 7.2. Proliferación celular

Una vez que observamos que el extracto de la *P. Karwinskii* tenía un efecto sobre la migración, quisimos evaluar su efecto sobre la actividad proliferativa, ya que ambos procesos suelen transcurrir de manera simultánea en las células. Para evaluar el efecto del extracto de la planta, utilizamos el volumen de 30  $\mu$ l (468 $\mu$ g/ml), el cual fue el que tuvo mayor efecto sobre la migración celular de la línea L6.

Al realizar los ensayos de proliferación, se realizó el tratamiento celular únicamente por 24 horas, debido a que un tiempo mayor provocaría que las células alcanzaran una mayor confluencia. De acuerdo al conteo realizado, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la proliferación, ocasionadas por el tratamiento del extracto de *Prosthechea Karwinskii*, con respecto al grupo control (Figura 20).



**Figura 20. Efecto del extracto de *Prosthechea Karwinskii* sobre la actividad proliferativa de la línea L6.** El análisis estadístico t de Student dio como resultado que no existe una diferencia significativa en la proliferación celular entre los grupos, control y tratamiento de 30  $\mu$ l del extracto con una concentración de (468 $\mu$ g/ml),

## 8. DISCUSIÓN

Las plantas han constituido la base de la medicina tradicional durante cientos de años. El uso de las plantas en el tratamiento de algunas enfermedades, como la tos, gripe, malestar estomacal, diabetes, etc., se fundamenta en el conocimiento empírico transmitido generacionalmente. En la actualidad, gracias al aislamiento y al estudio de los compuestos activos de una gran variedad de plantas, se conoce el potencial terapéutico de algunos compuestos o, en su defecto, su nula funcionalidad. Esto da relevancia a los estudios que brindan información sobre la comprensión detallada del funcionamiento de los compuestos activos encontrados en una gran variedad de plantas.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo saber la relación entre la migración o la proliferación celular de las células de la línea celular L6 con el extracto de las hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*. Los resultados muestran que existe una mayor proliferación celular cuando las células son tratadas con 10  $\mu$ l, 30  $\mu$ l y 50  $\mu$ l del extracto de la planta; incrementando el área total cubierta del 33% a un 47%, 54% y 50% respectivamente. Cabe destacar que los resultados se han mostrado como volúmenes de tratamiento y no como concentraciones debido a que tenemos un extracto, que es la mezcla de diferentes compuestos, y el modo como lo estamos utilizando es a partir de diluciones del extracto original. En este sentido, la concentración en microgramos del extracto, con respecto al volumen final de tratamiento del cada cultivo, es el siguiente: 10 $\mu$ l, 156  $\mu$ g/ml; 30  $\mu$ l, 468  $\mu$ g/ml; 50  $\mu$ l, 781  $\mu$ g/ml.

La obtención de la dilución del extracto que se realizó de la manera descrita previamente, presentó un grado de complejidad ligero, ya que la consistencia del extracto de las hojas requirió un volumen elevado de diluyente para lograr obtener una suspensión y posteriormente una mezcla homogénea. Durante los procedimientos de filtrado necesarios para alcanzar la esterilidad, la mezcla resultó ser extremadamente densa, lo cual dificultó estos procesos, teniendo como

consecuencia la obtención de un volumen reducido para su uso en los experimentos.

Gracias al espectro de masas obtenido de la cromatografía del extracto de las hojas de *Prosthechea Karwinskwii* sabemos que el eluido cuenta principalmente con 14 compuestos activos en su composición: ácido quínico, ácido málico, ácido succínico, L-fenilalanina, guanosina, ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, rutina, kaempferol-3-O-rutinoside, ácido azelaico, ácido sebácico, N-undecanoylglycina, ácido pinelico y embelina, mismos que fueron brevemente introducidos por sus capacidades biológicas en un apartado previo.

La relación entre la migración celular favorable y la falta de proliferación celular en respuesta al tratamiento con el extracto de hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinski* podría estar relacionada con las propiedades migratorias y antiproliferativas de los compuestos presentes en el extracto lo que podría dar una respuesta a los resultados obtenidos. Sin embargo, hay que considerar que para el experimento de proliferación, únicamente utilizamos una concentración y un solo tiempo de tratamiento de 24 horas. Esto pudiera influir de manera crítica en el resultado final, ya que se debe encontrar el tiempo de tratamiento óptimo en el cual el extracto haga efecto, además de realizar una curva de crecimiento de las células L6, para iniciar el tratamiento en la fase de crecimiento exponencial.

La evaluación del ácido quínico extraído del hueso de aguacate en fibroblastos gingivales humanos mostró que el tratamiento con concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  aumentó significativamente la migración celular, con incrementos del 53.0% y 69.1% en el área dañada. Además, el ácido quínico promovió la proliferación celular en comparación con los controles positivos tratados con PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) y redujo la liberación de TNF- $\alpha$ , implicado en procesos apoptóticos [17]

En otro estudio, el ácido quínico combinado con ácido clorogénico fue evaluado en líneas celulares de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), y queratinocitos humanos adultos (HaCaT). Los resultados mostraron que esta combinación inhibió significativamente la proliferación en células HaCaT, pero estimuló ligeramente la proliferación en NHDF. Además, la evaluación de la expresión génica en estas células reveló una regulación positiva de los genes STAT6 y EGFR, que están implicados en la proliferación celular [51].

El ácido málico, otro compuesto activo identificado en el extracto de la orquídea *P. karwinskii* puede ser convertido en piruvato por la enzima málica 2 (ME2), que está sobreexpresada en algunos tipos de cáncer y promueve la proliferación, migración e invasión celular en células de glioblastoma [70]. Además, en un ensayo de MTT para evaluar la proliferación celular en fibroblastos de piel humana, el tratamiento con ácido málico a una concentración de 0.01  $\mu$ M mejoró significativamente la proliferación en comparación con los grupos no tratados [26]. Sin embargo, estudios en líneas celulares de queratinocitos humanos (HaCaT) mostraron que el ácido málico causó daños celulares dependientes del tiempo y la dosis, con un aumento de células en las fases G0/G1, fragmentación del ADN y expresión de proteínas asociadas a la apoptosis, como la caspasa-3 [22].

El ácido succínico, por su parte, fue evaluado en la línea celular MRC-5 de fibroblastos y en células de leucemia MOLT-4. Se observó que el tratamiento con ácido succínico no tuvo ningún efecto citotóxico significativo en la línea celular MRC-5. Sin embargo, en la línea celular MOLT-4, disminuyó la viabilidad celular y favoreció la apoptosis [12]. De manera similar, Papurina y colaboradores encontraron que el tratamiento con ácido succínico a bajas concentraciones en cultivos primarios de fibroblastos no produjo efectos citotóxicos, y el nivel de proliferación celular fue comparable al de los fibroblastos no tratados con ácido succínico [40].

La L-fenilalanina, el isómero de la fenilalanina, tiene poca información bibliográfica debido a su uso infrecuente. Sin embargo, en ensayos de migración celular, invasión en cámara Transwell, proliferación y apoptosis evaluados en las líneas celulares de cáncer de endometrio, Ishikawa y AN3, se encontró que el tratamiento con L-fenilalanina inhibió la invasión, migración y proliferación celular en ambas líneas, aunque no indujo apoptosis. Esto podría deberse a que el exceso de fenilalanina protege a las células de la falta de nutrición y de la autofagia que conduce a la apoptosis [61].

La guanosina, que también está presente en el extracto de las hojas de la orquídea, se conoce por su participación como GTP, GDP y segundo mensajero. En estudios con células de melanoma B16F10, se encontró que el tratamiento con guanosina indujo detección del crecimiento e inhibición de la proliferación celular dependiente de la dosis [37]. Sin embargo, en la línea celular de glioma A172, dosis altas de guanosina redujeron la viabilidad celular, aunque en concentraciones bajas no alteraron la curva de crecimiento. Además, el tratamiento con 500 $\mu$ M de guanosina no afectó la migración celular de las células A172 [39].

Estos hallazgos difieren de los observados en estudios con queratinocitos (HaCaT) y fibroblastos (HUF), donde la guanosina indujo la migración celular en ensayos de curación de heridas in vitro y mejoró significativamente la capacidad de migración en ensayos de cámara Transwell, y en un modelo murino de herida punzante cutánea, donde se observó un cierre acelerado de las heridas tratadas con guanosina en comparación con las no tratadas [2].

El compuesto activo ácido clorogénico, al ser evaluado en células MC3T3-E1 en ensayos de migración inducida por EGF (Factor de crecimiento epidérmico) utilizando cámaras Transwell y el método de rasguño se observó que no afecta la migración inducida por EGF en estas células [25], sugiriendo que no mejora la migración celular a pesar de la inducción por EGF. En estudios con queratinocitos

humanos normales (NHEK), fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUEVEC), el ácido clorogénico mostró una mayor proliferación en NHDF y mejoró la viabilidad de HUEVEC. En ensayos de cierre de heridas con NHEK, el ácido clorogénico cerró aproximadamente el 40% de la brecha en 6 horas, mientras que en NHDF el efecto fue más evidente a las 20 horas después del tratamiento [36].

Por otro lado, el ácido neoclorogénico, un isómero del ácido clorogénico, contrarrestó la disminución en la viabilidad celular causada por la radiación UVB en fibroblastos HS68 sin mostrar citotoxicidad [3]. En estudios con células del músculo liso vascular utilizando la línea celular A7r5, las concentraciones de ácido clorogénico mayores a 20  $\mu$ M inhibieron la proliferación celular, redujeron significativamente la capacidad de cierre de heridas y disminuyeron la migración celular en ensayos con cámara Transwell [71].

La rutina, compuesto activo presente no solo en extracto de la orquídea *P. Karwinskii*, sino en muchas plantas, fue evaluada en dos líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231 y se observó un aumento en la proliferación celular en ambas líneas después de tratamientos de 24, 40 y 72 horas de rutina. Además, en ensayos de rasguño, la rutina mostró una tendencia a favorecer la migración celular, siendo más significativo el efecto con un tratamiento de 400  $\mu$ M [19]. Estos hallazgos pueden entenderse debido a que estudios han revelado que la rutina puede activar la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR al unirse al receptor GPR30, un receptor acoplado a proteína G que regula procesos celulares como la proliferación y diferenciación en células madre del ligamento periodontal [74].

Hay poca información disponible sobre el compuesto activo Kaempferol-3-o-rutinoside. En ensayos de migración celular, se observó que este compuesto promueve la migración celular de manera dosis dependiente en queratinocitos humanos. Este aumento en la migración estuvo asociado con una mayor formación

de lamelipodios celulares. Además, se encontró que el tratamiento con kaempferol aumentó los niveles de FAK y AKT fosforilada, sugiriendo la activación de la vía de señalización FAK/Akt, también presentó un aumento significativo en los niveles de Rac1, lo que sugiere que el kaempferol promueve la migración celular a través de la activación de Rac1 [41].

El compuesto activo ácido azelaico que comúnmente es utilizado en el tratamiento del acné, ha demostrado capacidades apoptóticas y la capacidad de detener el ciclo celular en las fases G1/G0 en células malignas, principalmente de leucemia mieloide aguda (AML) [73]. Se sugiere que la actividad apoptótica del ácido azelaico puede estar relacionada con la presencia de Notch, ya que las células de AML tratadas previamente para eliminar Notch no muestran actividad apoptótica. Por otro lado, en células inmunitarias como las Natural Killer y células T, el tratamiento con ácido azelaico promueve la proliferación y migración celular [11]. Este efecto también se ha observado en células de fibroblastos de ratón, específicamente en la línea 3T3 [42].

El ácido pinélico, comúnmente utilizado como aditivo, tiene información limitada sobre su efecto en la migración y proliferación celular, se sabe que el tratamiento con ácido pinélico en células de adenocarcinoma colorrectal humano en la línea HT29 no afecta la viabilidad celular [63]. Además, en un estudio que evaluó el extracto de los frutos "Oddi" en Corea, que son ricos en ácido pinélico, rutina y ácido clorogénico, el tratamiento en fibroblastos dérmicos humanos (HDF) tampoco mostró actividad apoptótica ni afectó la viabilidad celular [26].

Finalmente, la emelina, estudiada en varias líneas de cáncer, activa diversas vías apoptóticas, inhibe genes como TNF- $\alpha$ , TNF-1 y TRADD, y regula proteínas como TRIAL y XIAP. En estudios, se ha observado que induce apoptosis, reduce la proliferación celular y bloquea la migración metastásica en células cancerosas,

además de regular la expresión de caspasas y desencadenar la apoptosis a través de la vía de señalización de p53 [28].

Con base en la información recopilada sobre los compuestos activos presentes en el extracto de hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*, podemos inferir que algunos de ellos favorecen tanto la migración como la proliferación celular. Por ejemplo, el ácido quínico ha demostrado aumentar significativamente la migración celular en fibroblastos gingivales humanos. Del mismo modo, el ácido málico, aunque muestra efectos diversos según la línea celular evaluada, mejora la proliferación celular en fibroblastos de piel humana, lo que podría estar asociado con la migración celular. La guanosina es otro compuesto activo que parece favorecer la migración celular, ya que mejora este proceso en queratinocitos, fibroblastos y en un modelo murino de herida cutánea. Además, la rutina, debido a su efecto en la proliferación celular y su tendencia a favorecer la migración en estudios de rasguño, junto con el kaempferol-3-O-rutinoside, que promueve la migración celular, dosis-dependiente en queratinocitos humanos, podrían contribuir a estos efectos observados. Por último, el ácido azelaico, que promueve la migración celular en células malignas de leucemia mieloide aguda, así como en células inmunitarias y de fibroblastos, también podría estar involucrado en este proceso.

Por otro lado, algunos compuestos como el ácido succínico, que aunque no mostró efecto citotóxico significativo en ciertas líneas celulares, favoreció la apoptosis en células de leucemia MOLT-4, y la L-fenilalanina, que inhibió la invasión, migración y proliferación celular, podrían ser responsables de que el extracto de hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* no presente actividad proliferativa. Además, el ácido neoclorogénico, que redujo la migración celular en ciertas líneas celulares, y la embelina, que activa diversas vías apoptóticas y reduce la proliferación celular, podrían también contribuir a este efecto.

Si bien la literatura científica proporciona información para comprender los posibles efectos de ciertos compuestos en la migración y proliferación de los mioblastos de la línea celular L6, es importante tener en cuenta que aún queda mucho por descubrir en cuanto a los mecanismos exactos de acción de estos compuestos. Nuestro conocimiento actual se basa en los estudios previos y en la evidencia disponible, pero los procesos de migración y proliferación celular son complejos y dinámicos, por lo que hacer más estudios es de importancia para poder comprender de forma clara y completa los mecanismos exactos de acción de estos compuestos.

Finalmente, es indispensable mencionar que dentro de los usos del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* se encuentra el tratamiento de heridas y quemaduras leves. Este uso arraigado resalta la importancia de garantizar la seguridad en su aplicación y de investigar cómo este extracto influye en la migración celular, proceso que participa en la mejora de estas afectaciones.

## 9. CONCLUSIONES

- La *Prosthechea Karwinskii*, tiene un efecto pro migratorio y no encontramos efecto sobre la actividad proliferativa.
- La *Prosthechea Karwinskii* incrementa la migración de la línea celular L6, de manera dependiente de la dosis.
- El extracto de las hojas de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* a una concentración de 468 µg/ml no tiene efecto sobre la proliferación celular de la línea celular L6 mioblastos.

Esta evidencia resalta la complejidad de los efectos del extracto de *Prosthechea Karwinskii*, subrayando la necesidad de futuras investigaciones para comprender mejor los mecanismos de acción específicos de cada compuesto y su interacción celular.

## **10. PERSPECTIVAS.**

El presente estudio es un punto de partida para la investigación sobre los efectos celulares del extracto de la orquídea *P. Karwinskii* con la finalidad de entender mejor su uso bajo los diferentes contextos dentro de las comunidades de Oaxaca.

Considerando que el extracto de la orquídea *P. Karwinskii* presenta diferentes compuestos activos, así como el tipo de experimentos realizados, proponemos las siguientes perspectivas de trabajo:

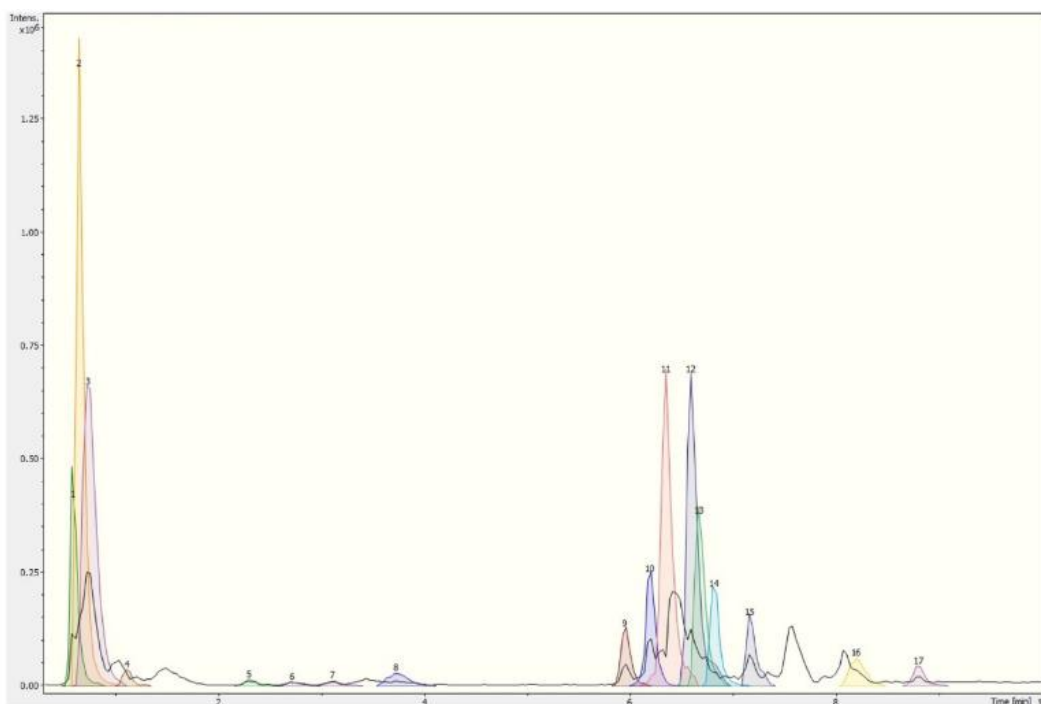
- Evaluar de manera independiente, el efecto celular, de cada uno de los componentes activos del extracto de la orquídea *P. Karwinskii*.
- Realizar una curva dosis efecto del extracto de *P. Karwinskii* sobre la actividad migratoria y proliferativa de las células L6.
- Realizar una curva tiempo-efecto del extracto de *P. Karwinskii*, sobre la actividad proliferativa de las células L6.

## 11. ANEXOS

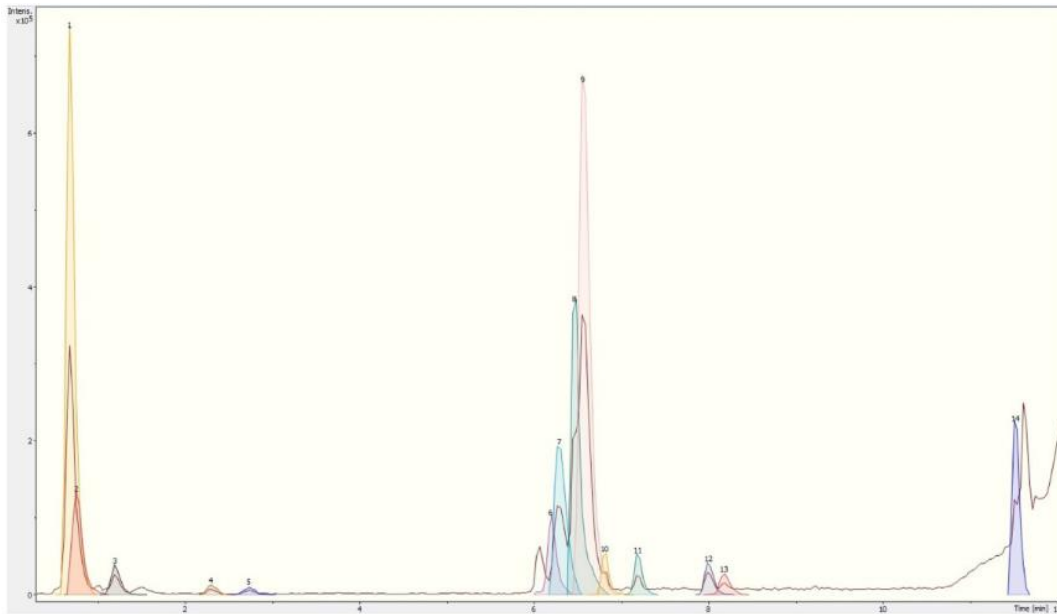
### 10.1 Caracterización del extracto de la orquídea *Prosthechea Karwinskii*.

La caracterización, identificación y cuantificación de los compuestos químicos en los extractos de la orquídea *Prosthechea Karwinskii* se llevaron a cabo por Barragan y colaboradores mediante el sistema de cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC por sus siglas en inglés), esto con la finalidad de tener información detallada sobre la naturaleza y propiedades de los diferentes compuestos químicos.

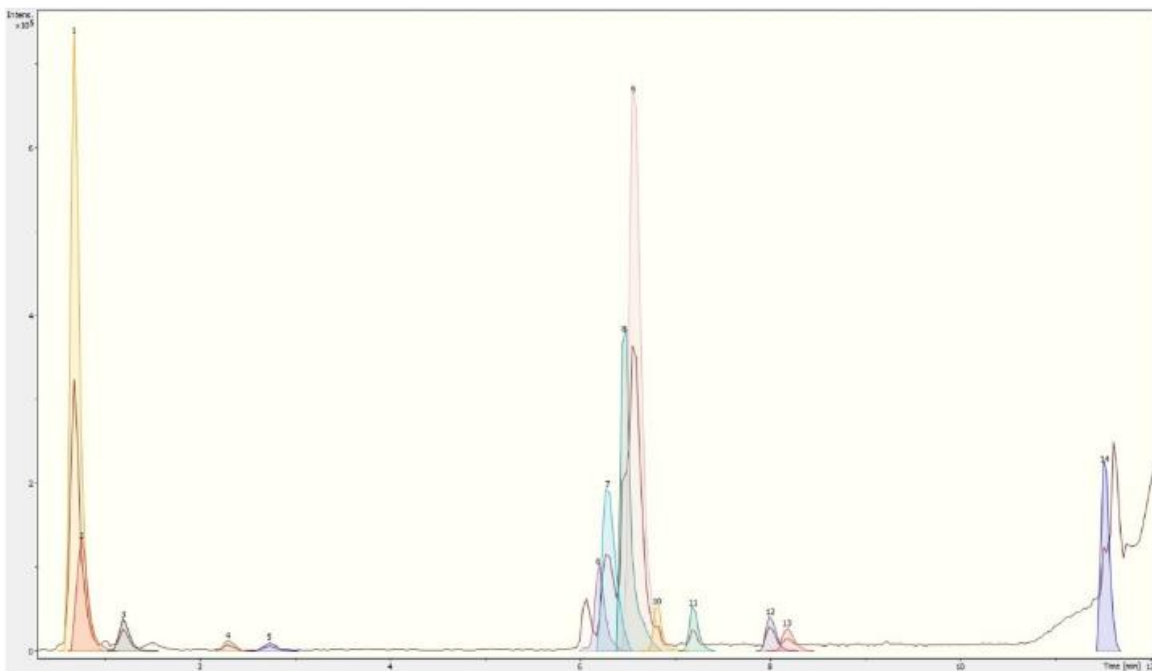
A continuación, se muestran los espectros de masas que muestra las intensidades de los iones detectados para los extractos de flores (anexo 1A), hojas (anexo 2A) y pseudobulbos (3A) de la orquídea *Prosthechea Karwinski* [4]



**Anexo 1A. Espectro de masas obtenido de la cromatografía del extracto de flores de *Prosthechea Karwinski* obtenida mediante UPLC.** 1 (D-Tagatose), 2 (Quinic acid), 3(Malic acid), 4(Succinic acid), 5(L-(-)-Phenylalanine), 6(Guanosine), 7 (1,3,4, 6-tetra-O-acetyl-2-deoxyhexopyranose), 8(1-O-salicyl-D-glucose), 9(1-O-vanillyl-beta-D-glucose), 10(Calaliukiuenoside), 11(2-Methyl-2-propanoyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranoside), 12 ((p)-abscisic acid  $\beta$ -D-glucopyranosyl ester), 13(Myricitrin-5-methyl ether), 14 (Azelaic acid), 15 (Abscisic acid), 16 (Pinellic acid), 17 ((1R,3S,4R)-1-[(3R-4S-6R)-3,4,5,6-tetrahydroxy-6-methoxy-hexoxy]] hexane-1,2,3,4,6-pentol).[4]



**Anexo 2A. Espectro de mamas obtenido de la cromatografía del extracto de hojas de Psithechea Karwinskwi obtenida mediante UPLC.** 1 (Quinic acid), 2 (Malic acid), 3 (Succinic acid), 4 (L-(-)-phenylalanine), 5 (Guanosine), 6 (Neochlorogenic acid), 7 (Chlorogenic acid), 8 (Rutin), 9 (Kaempferol-3-O-rutinoside), 10 (Azelaic acid), 11 (Sebacic acid), 12 (N-undecanoylglycine), 13 (Pinellic acid), 14 (embelin).[4]



**Anexo 3A. Espectro de mamas obtenido de la cromatografía del extracto de pseudobulbos de Psithechea Karwinskwi obtenida mediante UPLC.** 1 (Quinic acid), 2 (Malic acid), 3 (Succinic acid), 4 (3-Methylglutaric acid), 5 (Neochlorogenic acid), 6 (Chlorogenic acid), 7 (Rutin), 8 (2-Hydroxysebacic acid), 9 (Azelaic acid), 10 (Phloridzin), 11 (Sebacic acid), 12 (N-undecanoylglycine), 13 (Pinellic acid), 14 (Gibberellin A7).[4]

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Acceso a los servicios de salud [Internet]. Org.mx. [citado el 8 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.coneval.org.mx/Medicion/Paginas/Medici%C3%B3n/Acceso-a-los-servicios-de-salud.aspx>
2. Ahmad, M., Yu, J., Cheng, S., Khan, Z. A., Luo, Y., & Luo, H. (2023). Guanosine and deoxyinosine structural analogs extracted from chick early amniotic fluid promote cutaneous wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12817. <https://doi.org/10.3390/ijms241612817>
3. Ahn, H. S., Kim, H. J., Na, C., Jang, D. S., Shin, Y.-K., & Lee, S. H. (2021). The protective effect of *Adenocaulon himalaicum* Edgew. And its bioactive compound neochlorogenic acid against UVB-induced skin damage in human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Plants*, 10(8), 1669. <https://doi.org/10.3390/plants10081669>
4. Barragán-Zarate GS, Alexander-Aguilera A, Lagunez-Rivera L, Solano R, Soto-Rodríguez I. Bioactive compounds from *Prosthechea karwinskii* decrease obesity, insulin resistance, pro-inflammatory status, and cardiovascular risk in Wistar rats with metabolic syndrome. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2021;279(114376):114376. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2021.114376>
5. Barragán-Zarate GS, Lagunez-Rivera L, Solano R, Carranza-Álvarez C, Hernández-Benavides DM, Vilarem G. Validation of the traditional medicinal use of a Mexican endemic orchid (*Prosthechea karwinskii*) through UPLC-ESI-qTOF-MS/MS characterization of its bioactive compounds. *Heliyon* [Internet]. 2022;8(7):e09867. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09867>
6. Barragán-Zarate GS, Lagunez-Rivera L, Solano R, Pineda-Peña EA, Landa-Juárez AY, Chávez-Piña AE, et al. *Prosthechea karwinskii*, an orchid used as traditional medicine, exerts anti-inflammatory activity and inhibits ROS. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2020;253(112632):112632. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2020.112632>
7. Basha NJ, Basavarajaiah SM, Baskaran S, Kumar P. A comprehensive insight on the biological potential of embelin and its derivatives. *Natural Product Research* [Internet]. 2022;36(12):3054–68.
8. Buckingham M, Tzahor E. In remembrance of David Yaffe. *Skelet Muscle* [Internet]. 2020;10(1):31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13395-020-00246-1>
9. Chen, C.-H., Sereti, K.-I., Wu, B. M., & Ardehali, R. (2015). Translational aspects of cardiac cell therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(8), 1757–1772. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12632>

10. DeMaria AN. Problems with immortality. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2010;56(25):2140–2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.008>
11. Dongdong Z, Jin Y, Yang T, Yang Q, Wu B, Chen Y, et al. Antiproliferative and immunoregulatory effects of azelaic acid against acute myeloid leukemia via the activation of notch signaling pathway. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019;10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2019.01396>
12. Ertugrul, B., Iplik, E. S., & Cakmakoglu, B. (2021). In vitro inhibitory effect of succinic acid on T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Archives of Medical Research*, 52(3), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.022>
13. Fitzgerald, M., Heinrich, M., & Booker, A. (2020). Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Frontiers in pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01480>
14. Fitzgerald, M., Heinrich, M., & Booker, A. (2020). Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Frontiers in pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01480>
15. García GC, Gómez RS, Rivera LL. Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico. *Rev Bras Farmacogn* [Internet]. 2014;24(2):153–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.002>
16. Garcin C, Straube A. Microtubules in cell migration. *Essays Biochem* [Internet]. 2019;63(5):509–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1042/ebc20190016>
17. Geller, F. C., Teixeira, M. R., Pereira, A. B. D., Dourado, L. P. A., Souza, D. G., Braga, F. C., & Simões, C. M. O. (2015). Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves: *Hancornia speciosa*. *Phytotherapy Research: PTR*, 29(12), 1887–1893. <https://doi.org/10.1002/ptr.5438>
18. Ghasemi-Dehnoo M, Lorigooini Z, Amini-Khoei H, Sabzevary-Ghahfarokhi M, Rafieian-Kopaei M. Quinic acid ameliorates ulcerative colitis in rats, through the inhibition of two TLR4- NF- κB and NF- κB- INOS- NO signaling pathways. *Immun Inflamm Dis* [Internet]. 2023 [citado el 12 de abril de 2024];11(8). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/iid3.926>
19. Hajimehdipoor, H., Tahmasvand, Z., Nejad, F. G., Maresca, M., & Rajabi, S. (2023). Rutin promotes proliferation and orchestrates epithelial–mesenchymal transition and angiogenesis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Nutrients*, 15(13), 2884. <https://doi.org/10.3390/nu15132884>
20. Hernández-Almaraz P, Lugo-Lugo O, Brassea-Pérez E, Gaxiola-Robles R, Zenteno-Savín T. Morphometric characteristics of human skeletal muscle cells in primary culture. *Int J Morphol* [Internet]. 2022;40(2):521–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-95022022000200521>

21. Hohmann T, Dehghani F. The cytoskeleton-A complex interacting meshwork. *Cells* [Internet]. 2019;8(4):362. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cells8040362>
22. Hsiao, Y.-P., Lai, W.-W., Wu, S.-B., Tsai, C.-H., Tang, S.-C., Chung, J.-G., & Yang, J.-H. (2015). Triggering apoptotic death of human epidermal keratinocytes by Malic acid: Involvement of endoplasmic reticulum stress- and mitochondria-dependent signaling pathways. *Toxins*, 7(1), 81–96. <https://doi.org/10.3390/toxins7010081>
23. Jung Y, Song JS, Ahn S. Pharmacokinetics and tissue distribution of <sup>13</sup>C-labeled succinic acid in mice. *Nutrients* [Internet]. 2022;14(22):4757. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/nu14224757>
24. Karp G. *Biología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana; 2000
25. Kawabata, T., Otsuka, T., Fujita, K., Sakai, G., Matsushima Nishiwaki, R., Kozawa, O., & Tokuda, H. (2018). (-)-Epigallocatechin gallate but not chlorogenic acid suppresses EGF-stimulated migration of osteoblasts via attenuation of p38 MAPK activity. *International journal of molecular medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3884>
26. Kim, K. S., Kim, R., Son, S.-R., Kang, K. S., Jang, D. S., & Lee, S. (2022). Oddioside A, a new phenolic glycoside isolated from the fruits of *Morus alba* (mulberry), protects TNF- $\alpha$ -induced human dermal fibroblast damage. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(10), 1894. <https://doi.org/10.3390/antiox11101894>
27. Kim, S. J., & Won, Y. H. (1998). The effect of glycolic acid on cultured human skin fibroblasts: cell proliferative effect and increased collagen synthesis. *The Journal of Dermatology*, 25(2), 85–89. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1998.tb02355.x>
28. Ko JH, Lee SG, Yang W, Um JY, Sethi G, Mishra S, et al. La aplicación de embelina para la prevención y terapia del cáncer. *Moléculas* [Internet]. 2018;23(3):621. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23030621>
29. Koriem KMM, Tharwat HAK. Malic acid improves behavioral, biochemical, and molecular disturbances in the hypothalamus of stressed rats. *J Integr Neurosci* [Internet]. 2023;22(4):98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.31083/j.jin2204098>
30. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* [Internet]. 1996;84(3):359–69. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81280-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81280-5)
31. Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2007;19(6):628–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.012>
32. Liu A, Yang J, Gonzalez FJ, Cheng GQ, Dai R. Biphasic regulation of intracellular calcium by gemfibrozil contributes to inhibiting L6 myoblast differentiation: implications for clinical myotoxicity. *Chem Res Toxicol*

- [Internet]. 2011;24(2):229–37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/tx100312h>
33. Lucía, C.-P. A., Jacqueline, B.-R., Alberto, B.-R. L., David, B.-A., & Beatriz, R.-A. (2021). Actualized inventory of medicinal plants used in traditional medicine in Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13002-020-00431-y>
  34. Medicina tradicional [Internet]. Who.int. [citado el 8 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/traditional-medicine>
  35. Mingrone G, Castagneto-Gissey L, Macé K. Use of dicarboxylic acids in type 2 diabetes: Dicarboxylic acids for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2013;75(3):671–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04177.x>
  36. Moghadam S, Ebrahimi S, Salehi P, Moridi Farimani M, Hamburger M, Jabbarzadeh E. Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-O- $\beta$ -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. *Molecules* [Internet]. 2017;22(9):1501. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22091501>
  37. Naliwaiko, K., Luvizon, A. C., Donatti, L., Chammas, R., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., & Nakao, L. S. (2008). Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC–ERK 1/2 pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 173(2), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.03.010>
  38. Negahdari R, Bohlouli S, Sharifi S, Maleki Dizaj S, Rahbar Saadat Y, Khezri K, et al. Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytother Res* [Internet]. 2021;35(4):1719–38. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6904>
  39. Oliveira, K. A., Dal-Cim, T. A., Lopes, F. G., Nedel, C. B., & Tasca, C. I. (2017). Guanosine promotes cytotoxicity via adenosine receptors and induces apoptosis in temozolomide-treated A172 glioma cells. *Purinergic Signalling*, 13(3), 305–318. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9562-7>
  40. Papurina, T., Barsukov, O., Zabuga, O., Krasnienkov, D., & Denis, E. (2023). Effects of succinic acid on dermal fibroblasts during cultivation under extremely hypoxic conditions. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 33(101429), 101429. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101429>
  41. Petpiroon N, Suktap C, Pongsamart S, Chanvorachote P, Sukrong S. Kaempferol-3-O-rutinoside from *Afgekia mahidoliae* promotes keratinocyte migration through FAK and Rac1 activation. *J Nat Med* [Internet]. 2015;69(3):340–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-015-0899-3>
  42. Picardo M, Passi S, Sirianni MC, Fiorilli M, Russo GD, Cortesi E, et al. Activity of azelaic acid on cultures of lymphoma- and leukemia-derived cell lines,

- normal resting and stimulated lymphocytes and 3T3 fibroblasts. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1985;34(10):1653–8. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90630-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(85)90630-6)
43. Prieto-González S, Garrido-Garrido G, González-Lavaut J. A, Molina-Torres J. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* [Internet]. 2004;35(1):19-36 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226086004>
  44. PubChem. Guanosine [Internet]. Nih.gov. [citado el 8 de abril de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398635>
  45. PubChem. Malic Acid [Internet]. Nih.gov. [citado el 8 de abril de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/525>
  46. PubChem. Phenylalanine [Internet]. Nih.gov. [citado el 9 de abril de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylalanine>
  47. PubChem. Pinellic acid [Internet]. Nih.gov. [citado el 8 de abril de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pinellic-acid>
  48. PubChem. Quinic acid [Internet]. Nih.gov. [citado el 8 de abril de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6508>
  49. Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)* [Internet]. 2013;3(8):1213–24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1534/g3.113.005777>
  50. Ramos-Jerz, M. del R., Villanueva, S., Jerz, G., Winterhalter, P., & Deters, A. M. (2013). *Persea americanamill.* Seed: Fractionation, characterization, and effects on human keratinocytes and fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/391247>
  51. Ranjana, Binwal M, Verma AK, Bawankule DU, Tiwari N, Shanker K. Stimulation of glucose uptake by glycosides from *Alectra parasitica* subsp. *chitrakutensis* (M.A. Rau) K.K. Khanna & An. Kumar: An in-vitro study of TNF- $\alpha$  induced insulin resistance in L6 myoblasts. *Nat Prod Res* [Internet]. 2023;37(12):2024–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2022.2112957>
  52. Rojas-Olivos A, Solano-Gómez R, Alexander-Aguilera A, Jiménez-Estrada M, Zilli-Hernández S, Lagunez-Rivera L. Effect of *Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) on obesity and dyslipidemia in Wistar rats. *Alex J Med* [Internet]. 2017;53(4):311–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2016.11.004>
  53. Rosa PB, Bettio LEB, Neis VB, Moretti M, Kaufmann FN, Tavares MK, et al. Antidepressant-like effect of guanosine involves activation of AMPA receptor and BDNF/TrkB signaling. *Purinergic Signal* [Internet]. 2021;17(2):285–301. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-021-09779-6>
  54. Rosero Doris H, Salazar Liliana, Tovar Maria Ana. Músculo esquelético y lesión por reperfusión. *Ultraestructura, alteración y regeneración: Revisión*

- sistemática. Revista médica Risaralda [Internet]. 2015 Dec [cited 2024 Feb 11];21(2):58-68. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-06672015000200012&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-06672015000200012&lng=en)
55. Sauer N, Oślizło M, Brzostek M, Wolska J, Lubaszka K, Karłowicz-Bodalska K. The multiple uses of azelaic acid in dermatology: mechanism of action, preparations, and potential therapeutic applications. *Postepy Dermatol Alergol* [Internet]. 2023;40(6):716–24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5114/ada.2023.133955>
  56. Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57, S3–S9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.001>
  57. Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57, S3–S9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.001>
  58. Sen, T., & Samanta, S. K. (2014). Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. En *Biotechnological Applications of Biodiversity* (pp. 59–110). Springer Berlin Heidelberg.
  59. Sen, T., & Samanta, S. K. (2014). Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. En *Biotechnological Applications of Biodiversity* (pp. 59–110). Springer Berlin Heidelberg.
  60. SenGupta S, Parent CA, Bear JE. The principles of directed cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2021;22(8):529–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-021-00366-6>
  61. Shi, K., Wang, Q., Su, Y., Xuan, X., Liu, Y., Chen, W., Qian, Y., & Lash, G. E. (2018). Identification and functional analyses of differentially expressed metabolites in early stage endometrial carcinoma. *Cancer Science*, 109(4), 1032–1043. <https://doi.org/10.1111/cas.13532>
  62. Siltanen A, Kitabayashi K, Lakkisto P, Mäkelä J, Pätilä T, Ono M, et al. HHGF Overexpression in myoblast sheets enhances their angiogenic potential in rat chronic heart failure. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(4):e19161. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019161>
  63. Sowa, I., Paduch, R., Mołdoch, J., Szczepanek, D., Szkutnik, J., Sowa, P., Tyszczyk-Rotko, K., Blicharski, T., & Wójciak, M. (2023). Antioxidant and cytotoxic potential of *Carlina vulgaris* extract and bioactivity-guided isolation of cytotoxic components. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(9), 1704. <https://doi.org/10.3390/antiox12091704>
  64. Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration.

- Respir Res [Internet]. 2017;18(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-017-0544-7>
65. Távira Montalván C. A, Ortega García A, Dávila González I, Estrada Mondaca S, , Meneses Acosta A. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Internet]. 2009;40(4):35-46. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006>
  66. Trepát X, Chen Z, Jacobson K. Cell Migration [Internet]. *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2012. p. 2369–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c110012>
  67. Wang Y, Tang C, Zhang H. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl4-induced oxidative liver injury in mice. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2015;23(2):310–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.002>
  68. Wang Z, Cheng C, Yang X, Zhang C. L-phenylalanine attenuates high salt-induced hypertension in Dahl SS rats through activation of GCH1-BH4. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(4):e0250126. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0250126>
  69. Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50: Still young and fascinating at 50. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2011;59(12):1041–59. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1369/0022155411426780>
  70. Yang, M., Chen, X., Zhang, J., Xiong, E., Wang, Q., Fang, W., Li, L., Fei, F., & Gong, A. (2021). ME2 promotes proneural-mesenchymal transition and lipogenesis in glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 11, 715593. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.715593>
  71. Yang, T.-Y., Wu, Y.-L., Yu, M.-H., Hung, T.-W., Chan, K.-C., & Wang, C.-J. (2022). Mulberry leaf and neochlorogenic acid alleviates glucolipotoxicity-induced oxidative stress and inhibits proliferation/migration via downregulating Ras and FAK signaling pathway in vascular smooth muscle cell. *Nutrients*, 14(15), 3006. <https://doi.org/10.3390/nu14153006>
  72. Yu Y, Zhang Z, Chang C. Chlorogenic acid intake guidance: Sources, health benefits, and safety. *Asia Pac J Clin Nutr* [Internet]. 2022;31(4):602–10. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.6133/apjcn.202212\\_31\(4\).0003](http://dx.doi.org/10.6133/apjcn.202212_31(4).0003)
  73. Zhang D, Luo Z, Jin Y, Chen Y, Yang T, Yang Q, et al. Azelaic acid exerts antileukemia effects against acute myeloid leukemia by regulating the Prdxs/ROS signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020;2020:1–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/1295984>
  74. Zhao, B., Xiong, Y., Zhang, Y., Jia, L., Zhang, W., & Xu, X. (2020). Rutin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the GPR30-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental*

Biology and Medicine (Maywood, N.J.), 245(6), 552–561.  
<https://doi.org/10.1177/1535370220903463>