



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la actividad cicatrizante del látex de *Euphorbia ingens* en un modelo de cultivo in vitro de células.

JONATHAN DAVID PALMA RAMIREZ

Foz do Iguaçu
2024



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación de la actividad cicatrizante del látex de Euphorbia ingens en un
modelo de cultivo in vitro de células.**

JONATHAN DAVID PALMA RAMIREZ

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Biotecnología.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz

Foz do Iguaçu
2024

JONATHAN DAVID PALMA RAMIREZ

Evaluación de la actividad cicatrizante del látex de *Euphorbia ingens* en un modelo de cultivo in vitro de células.

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Dr. Andrés Mojoli Le-quesne
UNILA

Foz do Iguaçu, 29 de abril de 2024

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Jonathan David Palma Ramirez

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento	
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: Evaluación de la actividad cicatrizante del látex de Euphorbia ingens en un modelo de cultivo in vitro de células

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Data da Defesa: 29/04/2024

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 29 de abril de 2024.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabajo a mi
Madre

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a mi Madre y mis dos hermanos por darme siempre el apoyo incondicional para continuar con mis estudios desde que era niño, y por mostrarme que a pesar de las situaciones, es posible salir adelante.

Le agradezco mucho al profesor Jorge Luis Maria Ruiz, por orientarme y enseñarme lo bonito e interesante que es la ciencia, también quiero agradecer por todos los consejos y los aprendizajes que me dio durante los años de graduación.

Agradezco mucho a mi compañera de vida, aventuras y ciencia, Grecia Antonella Nina Flores, por su apoyo incondicional durante estos años de mi graduación y por todos los momentos que me sacó de su tiempo para darme una ayuda sin ella esta etapa no hubiera sido tan bonita.

Agradezco a mis dos grandes amigos y hermanos de vida, Bruno Javier Zepeda, por ser un buen veterano y amigo y por todos los consejos que me dio como veterano de biotecnología, Mateo Espitia Navarrete por tantos trabajo y tareas que hicimos y nunca me abandono en ellos. también le agradezco a ambos por todas las guerras durante la graduación.

Agradezco también a mis otros hermanos de vida, Bernie Rolando Reyes Lopez, Lucas Daniel Ovelar, Marcel da Silva Valverdes y Susana Patricia Lotero por todo el apoyo que me dieron en todos los sentido durante estos 5 años de graduación, sin lugar a dudas no hubieran sido tan divertidos y bien vividos sin ellos.

Agradezco mucho también a todas las personas que me han ayudado durante mis estudios, sin lugar a dudas los recuerdos siempre a todos ellos y lo mucho que con su ayuda cambiaron mi vida.

Por último quiero agradecer a la UNILA y todas las personas involucradas en ella por darme la oportunidad de ser un biotecnólogo, y por todos esos lindos momentos que pase en ella.

PALMA RAMIREZ, Jonathan David. **Evaluación de la actividad cicatrizante del látex de *Euphorbia ingens* en un modelo de cultivo in vitro de células.** 2024. 57 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Biotecnología) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024.

RESUMEN

La cicatrización de las lesiones cutáneas es un proceso complejo que implica una serie de etapas, incluyendo la hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. La activación de las células endoteliales es el primer proceso que ocurre en la angiogénesis, un fenómeno crucial en la cicatrización de heridas, ya que se necesitan nuevos vasos sanguíneos para llevar los recursos necesarios a las áreas lesionadas. Las heridas crónicas representan un importante problema económico y social a nivel mundial, por lo que se buscan activamente nuevos compuestos regenerativos. Las plantas medicinales, como *Euphorbia ingens*, han sido utilizadas históricamente para tratar heridas, pero su potencial cicatrizante no ha sido completamente estudiado. Este trabajo evaluó la capacidad cicatrizante del látex de *E. ingens* en un modelo in vitro utilizando líneas celulares HBMEC y MRC-5, realizando experimentos de citotoxicidad, migración celular y análisis morfológicos. Los resultados de este estudio demostraron que el látex no causa toxicidad en ambas líneas celulares y promovió una reducción significativa del área de la cicatrización. En el análisis de fluorescencia, las células tratadas mostraron una estructura en el citoesqueleto más ramificada que en el control; aparentemente estas extensiones son filopodios y lamelipodios, estructuras celulares clave en la migración celular. Estos resultados incentivan a futuras pesquisas para comprender mejor el mecanismo y cuáles compuestos específicos del látex son responsables de esta estimulación de la migración celular.

Palabras clave: Euphorbia, Cicatrización, *Euphorbia ingens*, Heridas.

PALMA RAMIREZ, Jonathan David. **Avaliação da atividade cicatrizante do látex de *Euphorbia ingens* em um modelo de cultura de células in vitro**. 2024. 57 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024.

RESUMO

A cicatrização de lesões cutâneas é um processo complexo que envolve uma série de etapas, incluindo a hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. A ativação das células endoteliais é o primeiro processo que ocorre na angiogênese, um fenômeno crucial na cicatrização de feridas, pois são necessários novos vasos sanguíneos para transportar os recursos necessários para as áreas lesionadas. As feridas crônicas representam um importante problema econômico e social em nível mundial, então novos compostos regenerativos estão sendo ativamente procurados. Plantas medicinais, como a *Euphorbia ingens*, foram historicamente usadas para tratar feridas, mas seu potencial cicatrizante não foi completamente estudado. Este trabalho avaliou a capacidade cicatrizante do látex de *E. ingens* em um modelo in vitro usando linhagens celulares HBMEC e MRC-5, realizando experimentos de citotoxicidade, migração celular e análises morfológicas. Os resultados deste estudo demonstraram que o látex não causa toxicidade em ambas as linhagens celulares e promoveu uma redução significativa na área de cicatrização. Na análise de fluorescência, as células tratadas mostraram uma estrutura no citoesqueleto mais ramificada do que no controle; aparentemente, essas extensões são filopódios e lamelipódios, estruturas celulares-chave na migração celular. Estes resultados incentivam futuras pesquisas para uma melhor compreensão do mecanismo e quais compostos específicos do látex são responsáveis por esse estímulo à migração celular.

Palavras-chave: Euphorbia, Cicatrização, *Euphorbia ingens*, Feridas.

PALMA RAMIREZ, Jonathan David. **Evaluation of the wound healing activity of *Euphorbia ingens* latex in an in vitro cell culture model.** 2024. 57 pages. Undergraduate Thesis (Bachelor's Degree in Biotechnology) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024.

ABSTRACT

The healing of skin injuries is a complex process involving several stages, including hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. The activation of endothelial cells is the first process that occurs in angiogenesis, a crucial phenomenon in wound healing, as new blood vessels are needed to deliver necessary resources to the injured areas. Chronic wounds represent a significant economic and social problem worldwide, thus actively seeking new regenerative compounds. Medicinal plants, such as *Euphorbia ingens*, have historically been used to treat wounds, but their healing potential has not been fully studied. This study evaluated the healing capacity of *E. ingens* latex in an in vitro model using HBMEC and MRC-5 cell lines, conducting experiments on cytotoxicity, cell migration, and morphological analysis. The results of this study demonstrated that the latex did not cause toxicity in both cell lines and promoted a significant reduction in the scar area. In the fluorescence analysis, treated cells showed a more branched cytoskeleton structure than the control; apparently, these extensions are filopodia and lamellipodia, key cellular structures in cell migration. These findings encourage further research to better understand the mechanism and which specific compounds in the latex are responsible for this stimulation of cell migration.

Key words: Euphorbia, Wound healing, *Euphorbia ingens*, Wounds.

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 - Representación de la posición de las células endoteliales en un vaso sanguíneo.....	20
Figura 2 - Imagen de la especie <i>Euphorbia ingens</i>	22
Figura 3 - Placas de 96 pozos utilizadas para el ensayo de MTT en las células HBMEC y MRC-5.....	30
Figura 4 - Análisis de la viabilidad celular por ensayo de MTT en MRC-5 al ser tratados con distintas concentraciones del látex de <i>Euphorbia ingens</i>	33
Figura 5 - Análisis de la viabilidad celular por ensayo de MTT en HBMEC al ser tratados con distintas concentraciones del látex de <i>Euphorbia ingens</i>	33
Figura 6 - Fotografías de la cicatriz realizada en células HBMEC sin tratamiento (CT).....	34
Figura 7 - Fotografías de la cicatriz realizada en células HBMEC con presencia de la T1(5 mg/ml).....	35
Figura 8 - Fotografías de la cicatriz realizada en células HBMEC con presencia de la T2(2.5 mg/ml).....	36
Figura 9 - Análisis estadístico de los porcentajes de reducción de área después 12h y 24h con tratamiento.....	37
Figura 10 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células HBMEC sin tratamiento (CT).....	39
Figura 11 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células HBMEC con el T1 (5 mg/ml).....	40
Figura 12 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células HBMEC con el T2 (2.5 mg/ml).....	41
Figura 13 - Análisis estadístico del tamaño de área y intensidad del Dapi en los núcleos de células HBMEC en presencia de tratamiento (T1, T2).....	42
Figura 14 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células MRC-5 sin tratamiento (CT).....	43
Figura 15 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células MRC-5 con el T1 (5 mg/ml).....	44
Figura 16 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células MRC-5 con el T2 (2.5 mg/ml).....	45

Figura 17 - Análisis estadístico del tamaño de área y intensidad del Dapi en los núcleos de células MRC-5 en presencia de tratamiento (T1, T2).....46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Valores de viabilidad celular (%) HBMEC después del ensayo de MTT.....	31
Tabla 2 - Valores de viabilidad celular (%) MRC-5 después del ensayo de MTT.....	32
Tabla 3 - Valores de las reducciones de áreas en las cicatrices realizadas en CT, T1 (5 mg/ml) y T2 (2.5 mg/ml).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

MRC-5	Cepa celular #5 del Consejo de Investigación Médica de Reino Unido
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells
MEC	Matriz Extracelular
CE	Células Endoteliales
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfoxido
IC50	Concentración Inhibitoria 50 %
MTT	Ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Phosphate Buffered Saline
SFB	Suero Fetal Bovino

SUMARIO

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE LA PIEL EN LA REPARACIÓN DE HERIDAS.....	17
2.2.1 LAS 4 FASES DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.....	17
2.3 COSTOS Y TRATAMIENTOS HABITUALES PARA LAS HERIDAS CUTÁNEAS.....	18
2.4 CÉLULAS ENDOTELIALES MICROVASCULARES DEL CEREBRO HUMANO (HBMEC), COMO MODELO DE ESTUDIO IN VITRO.....	20
2.5 EUPHORBIA INGENS.....	21
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. METODOLOGÍA.....	25
5.1 OBTENCIÓN DEL LÁTEX DE EUPHORBIA INGENS.....	25
5.2 CULTIVO DE CÉLULAS.....	25
5.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.....	25
5.4 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN.....	27
5.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL CITOESQUELETO Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS.....	27
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
6. RESULTADOS.....	30
6.1 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.....	30
6.2 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN.....	34
6.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL CITOESQUELETO Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS.....	38
7. DISCUSIÓN.....	47
9. REFERENCIAS.....	53

1. INTRODUCCIÓN

Las lesiones cutáneas son ocasionadas por diferentes motivos, como quemaduras por altas temperaturas, radiación ultravioleta y heridas por objetos cortantes (PIAZZA *et al.*, 2020). La regeneración celular de la piel cuando se tiene una herida es un proceso formado por varios pasos. Estos tienen el objetivo de hacer que la parte de la herida expuesta sea recuperada. La cicatrización está dividida en 4 fases: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (PAZYAR *et al.*, 2014), y todas estas fases involucran muchos tipos celulares, mecanismos, así como mediadores químicos y matriz extracelular. Todo esto hace que la cicatrización sea considerada un proceso complejo (JUNEJA *et al.*, 2019).

La mayoría de las heridas cutáneas son superficiales, ya que pasan por el proceso de regeneración normal. Algunas de estas heridas cutáneas pueden ser crónicas, y esto se debe a que el proceso de cicatrización no progresa correctamente o a otra enfermedad subyacente que el paciente tiene y que no le permite realizar el proceso de cicatrización con normalidad. Una herida crónica representa un gran gasto económico en tratamientos para su curación (HAN *et al.*, 2017). Estas heridas crónicas representan una epidemia silenciosa que está afectando a una gran parte de la población mundial. En los países con un mayor desarrollo, la carga de los tratamientos de las heridas crónicas está aumentando rápidamente, y se vuelven cada vez más costosos (SEN *et al.*, 2009).

La búsqueda de nuevos compuestos con una mejor actividad regenerativa en las heridas ha sido un desafío para la salud. Por esta razón, se ha abierto un campo de búsqueda de nuevos compuestos naturales que posean potencial regenerativo en los diferentes tipos de heridas (GONÇALVES *et al.*, 2022). A pesar de que se realizan muchos estudios farmacológicos para la regeneración de las heridas, aún existen problemas por superar en el tratamiento de heridas abiertas (NILFOROUSHZADEH *et al.*, 2014). Los problemas derivados de las heridas causan un gran impacto económico y social. Debido a esto, se exige un mayor nivel de investigación en la búsqueda de tratamientos para las heridas cutáneas (SEN *et al.*, 2009).

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde la antigüedad por la sociedad en varias partes del mundo para diferentes tipos de tratamientos de heridas y quemaduras. Esto se debe a que muchas plantas poseen compuestos que ayudan en el proceso de cicatrización. Actualmente, se están investigando y descubriendo compuestos bioactivos que mejoran el proceso de cicatrización de heridas (MRABTI *et al.*, 2022). Estas investigaciones de compuestos a partir de plantas que funcionan como tratamiento de lesiones de la piel han demostrado ser una alternativa, ya que tienen muchas propiedades útiles, y su costo de uso es más económico, además de tener una eficacia significativamente alta (MALIK *et al.*, 2019).

Diferentes especies de plantas se han estudiado con el fin de encontrar nuevos compuestos para el uso medicinal. Del 1 al 3% de los medicamentos de las farmacopeas occidentales que se usan para heridas cutáneas, un tercio proviene de las plantas, y muchos de estos compuestos han demostrado ser farmacológicamente seguros por sus mecanismos de acción y su eficiencia, lo que justifica más estudios preclínicos y clínicos en compuestos provenientes de plantas (LORDANI *et al.*, 2019).

La planta *Euphorbia ingens* pertenece al género *Euphorbia*. Muchas de las plantas de este género son productoras de látex, el cual ha sido utilizado tradicionalmente para el tratamiento de heridas en la piel (BENJAMAA *et al.*, 2022). La *E. ingens* es una planta nativa de África del Sur, culturalmente importante para las poblaciones locales. A pesar de que su látex está reportado como tóxico, este mismo látex es tradicionalmente utilizado para el tratamiento de úlceras en la piel y cáncer (VAN DER LINDE *et al.*, 2017). A pesar de ser usado medicinalmente por pueblos de la región endémica de *E. ingens*, no hay estudios que demuestren la capacidad del látex como cicatrizante de heridas. Debido a la falta de estudios sobre la capacidad cicatrizante del látex de *E. ingens*, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de cicatrización del látex en un modelo *in vitro* en líneas celulares.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE LA PIEL EN LA REPARACIÓN DE HERIDAS.

La piel es un órgano especializado que tiene una mayor interacción con el entorno externo. Se encarga de funciones importantes como las homeostáticas y defensa. Es una barrera de defensa primaria que evita la desecación y el daño mecánico, químico y térmico a las estructuras internas (WILKINSON *et al.*, 2020). Consta de una epidermis externa, la dermis e hipodermis e incluye nervios, vasos sanguíneos, glándulas y folículos pilosos. En la piel, el 80% de las células son queratinocitos, mientras que el otro 20% está compuesto por células dendríticas, incluyendo melanocitos, células de Langerhans y Merkel (PROST-SQUARCIIONI *et al.*, 2020).

La piel ha desarrollado mecanismos eficientes y rápidos para cerrar las brechas en su barrera. Este proceso se conoce colectivamente como la respuesta de cicatrización de heridas. La reparación de heridas se divide clásicamente en cuatro fases principales: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación dérmica. Estas fases dan lugar a una restauración arquitectónica y fisiológica después del daño (WILKINSON *et al.*, 2020).

2.2.1 LAS 4 FASES DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.

1. Hemostasia: La primera fase de la cicatrización es la hemostasia. En esta fase, los vasos sanguíneos que fueron dañados se contraen para formar un coágulo y de esta manera evitar una exanguinación. En la hemostasia son importantes las plaquetas y proteínas trombinas, porque cuando las plaquetas entran en contacto con la matriz subendotelial básica, son activadas y adheridas al vaso sanguíneo. Seguidamente, la trombina realiza una activación plaquetaria que formará un coágulo insoluble de fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondina (WILKINSON *et al.*, 2020).
2. Inflamación: En esta fase se realiza el reclutamiento de los neutrófilos en el sitio de la lesión. Los neutrófilos son importantes en los primeros días

después de la lesión por su capacidad de fagocitosis y secreción de proteasas que matan las bacterias locales y ayudan a degradar el tejido necrótico. Después de 3 días, entran en acción los macrófagos en la zona de la lesión fagocitando patógenos y desechos celulares, además de ayudar en la secreción de factores de crecimiento como citocinas y quimiocinas (REINKE et al., 2012). Los neutrófilos también ayudan a reclutar fibroblastos y células epiteliales al sitio de la lesión (PAZYAR et al., 2014).

3. Proliferación: En esta fase, ocurre la reepitelización y angiogénesis de la herida. Para que ocurra la epitelización, los queratinocitos migran y se proliferan en la zona de la herida, además de ocurrir la diferenciación de las células madre de los bulbos restantes del folículo piloso. La angiogénesis se desarrolla por la migración, proliferación y formación de los tubos de células endoteliales que salen del vaso principal hacia otros (PAZYAR *et al.*, 2014).
4. Remodelación: En el último paso de la cicatrización, es necesario un equilibrio entre apoptosis de células que están y la producción de nuevas células. Además, es necesario la degradación gradual de la MEC y el colágeno tipo III y la formación de colágeno maduro tipo I. Esta fase es importante en la cicatrización de heridas porque si ocurre un problema en esta fase, puede que la herida pase a ser crónica (PAZYAR *et al.*, 2014).

2.3 COSTOS Y TRATAMIENTOS HABITUALES PARA LAS HERIDAS CUTÁNEAS.

Los tratamientos de las cicatrices cutáneas son una carga sanitaria y económica para los pacientes. En los Estados Unidos, en 2014, se estimó que el gasto en tratamientos de heridas cutáneas osciló entre \$28.100 millones y \$96.800 millones al año (SINGER *et al.*, 2022). En la actualidad, existen diferentes tratamientos para heridas en la piel, incluyendo procedimientos quirúrgicos, agentes farmacológicos y procesos no quirúrgicos. Estos tratamientos tienen un costo total de \$12 mil millones anuales, el cual se espera que alcance los \$35 mil millones en 2023 (GUSHIKEN *et al.*, 2021).

En heridas cutáneas diferentes fármacos son utilizados directamente en el sitio de las heridas. Unos de estos fármacos son (LEITE *et al.*, 2020):

- Antisépticos: utilizados para la limpieza y antisepsia de las heridas.
- Queratolíticos: estos fármacos son estimulantes de renovación celular.
- Revulsivos: estos provocan una irritación en la piel haciendo un aumento en el flujo sanguíneo ayudando en el transporte de oxígeno y nutrientes en las heridas.
- Queratoplásticos: son regeneradores del extracto córneo por medio del aumento de queratinización.
- Humectantes: retardan la evaporación y la pérdida de agua ya que hacen un filme hidrofóbico en la superficie de la piel.
- Astringentes: causan retracción en la área de la herida permitiendo absorción de exudados de la herida.
- Antimicrobianos: son fármacos muy utilizados para evitar y controlar la contaminación de bacterias en las heridas.

Las terapias quirúrgicas también se utilizan para el tratamiento de heridas, dependiendo del tipo de lesión. En estas terapias, los injertos de piel son la alternativa más común para quemaduras y heridas crónicas. Estos injertos se dividen en tres categorías: autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos (GUSHIKEN *et al.*, 2021). Los autoinjertos son los más utilizados, ya que implican la implantación de piel del mismo paciente. Los aloinjertos son una alternativa más, que consiste en la implantación de piel adecuada de otras personas, mientras que los xenoinjertos implican la implantación de piel proveniente de otros animales (SANTEMA *et al.*, 2016).

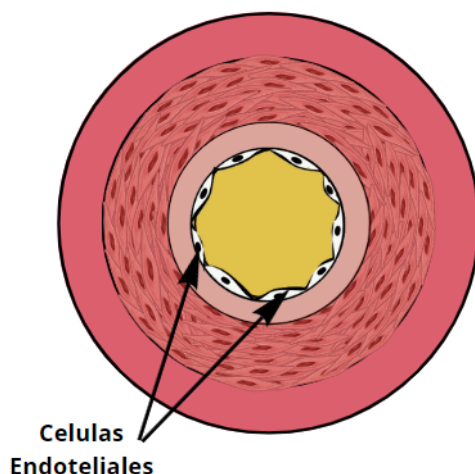
Una alternativa quirúrgica más es el desbridamiento quirúrgico. Este tratamiento consiste en la eliminación del tejido necrótico y la carga bacteriana del sitio de la herida, con el fin de disminuir la infección, el dolor, el mal olor y las complicaciones de las heridas agudas o crónicas (MENGARELLI *et al.*, 2013).

2.4 CÉLULAS ENDOTELIALES MICROVASCULARES DEL CEREBRO HUMANO (HBMEC), COMO MODELO DE ESTUDIO IN VITRO.

Las células endoteliales microvasculares del cerebro humano son una parte esencial de la barrera hematoencefálica, la cual actúa como un sistema de protección. Además, las células endoteliales cerebrales también participan en el transporte de nutrientes y moléculas necesarias para la función cerebral, en la comunicación celular y en la regulación de la presión osmótica en el cerebro. Asimismo, estas células están implicadas en la respuesta inmunitaria y en la migración de células inmunitarias al cerebro en caso de lesión o enfermedad (PERSIDSKY *et al.*, 2006). Las células HBMEC, son una linaje celular comercial, y son ampliamente utilizadas como modelo en experimentos de formación de tubos como método para estudiar estimulantes de angiogénesis (GOYAL & GOYAL, 2019; LIU *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2022).

La superficie interna de los vasos sanguíneos está formada por células endoteliales (**figura 1**). Estas células producen una variedad de sustancias, como vasoactivas, que regulan el tono vascular, la presión sanguínea y el flujo sanguíneo local. Una de las principales funciones de las células endoteliales (CE) es la regulación del flujo sanguíneo y la perfusión tisular. Esto se logra mediante la modulación del diámetro de los vasos y el tono vascular, en colaboración con las células musculares y los pericitos adyacentes (CARVAJAL *et al.*, 2017).

Figura 1. Representación de la posición de las células endoteliales en un vaso sanguíneo.



Fuente: Del Autor.

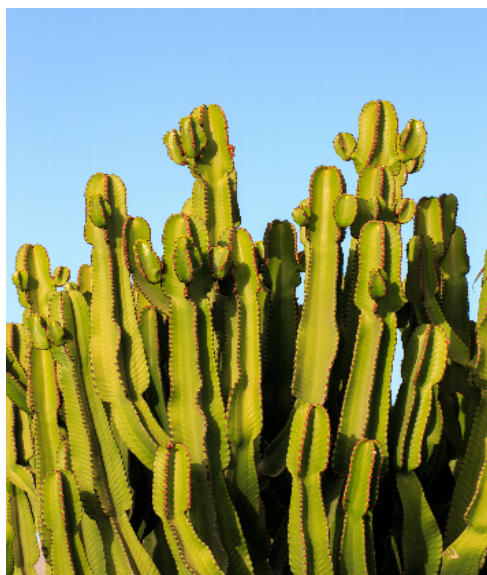
La activación de las células endoteliales es el primer proceso que ocurre en la angiogénesis. El incremento y la proliferación de células endoteliales son pasos importantes para la formación de nuevos vasos sanguíneos (REYNA-VILLASMIL *et al.*, 2010). Las células endoteliales migran durante la vasculogénesis, la angiogénesis y en respuesta a lesiones vasculares para reparar la integridad del vaso. Esta migración puede ocurrir de forma individual, en grupos o en láminas, y está regulada por una variedad de señales complejas tanto intracelulares como ambientales (MICHAELIS, 2014).

La presencia de una vasculatura funcional es esencial para la viabilidad de casi todos los tejidos multicelulares (DIPIETRO *et al.*, 2013). La angiogénesis es vital en la cicatrización de heridas, ya que se necesitan nuevos vasos sanguíneos para llevar los recursos necesarios a las áreas lesionadas. (DIPIETRO *et al.*, 2016). Las heridas crónicas y las cicatrizaciones deficientes en pacientes con diabetes, ancianos y estasis venosa se asocian con una respuesta angiogénica inadecuada o disfuncional (DIPIETRO *et al.*, 2013).

2.5 *EUPHORBIA INGENS*

La *Euphorbia Ingens* es una planta nativa del sur de África, se encuentra principalmente en las partes de sábanas. Este árbol es de gran tamaño con una copa ramificada y tiene un tallo principal con una estructura radicular extendida (figura 2) (VAN DER LINDE *et al.*, 2017). Esta planta prefiere áreas cálidas y puede sobrevivir en áreas que tienen grandes períodos de sequía y en afloramientos rocosos.

Figura 2. Imagen de la especie *Euphorbia ingens*



Fuente: (DAVISON, 2021).

El látex vegetal es encontrado en más de 20.000 especies de plantas. Este es un fluido que se encuentra en la planta y su coloración puede variar de colores como: blanco, amarillo, rojo y incoloro. En varias especies el látex contiene una gran variedad de compuestos bioactivos. Las especies de plantas del género *Euphorbia* han sido ampliamente estudiadas debido a sus potenciales aplicaciones medicinales. Se ha puesto especial atención en el látex de estas plantas, ya que se cree que contiene diversos compuestos con propiedades medicinales (BENJAMAA *et al.*, 2022).

Euphorbia ingens es una especie perteneciente a la familia Euphorbiaceae, la cual engloba una diversidad de plantas que producen látex (ROSS *et al.*, 2004). El látex de la planta *Euphorbia ingens* ha sido tradicionalmente utilizado para aplicaciones tópicas en el tratamiento de úlceras, cánceres externos y purgantes (SAGBO *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICATIVA

Existe una creciente demanda de nuevos tratamientos eficaces para la mejora de la cicatrización de heridas, ya que muchas de ellas, como las heridas crónicas y de lenta cicatrización, no siguen el proceso de curación normal, lo que genera una carga económica significativa para los sistemas de salud y la sociedad. El látex de la planta *Euphorbia ingens* se ha utilizado tradicionalmente como tratamiento para varias enfermedades, incluyendo úlceras epiteliales. Sin embargo, aún existen pocos estudios científicos que investiguen su capacidad cicatrizante en heridas. Los resultados de este estudio contribuirán a la búsqueda de nuevos medicamentos derivados de plantas medicinales, los cuales podrían actuar en mecanismos específicos de la cicatrización de heridas, como el estímulo de la angiogénesis, migración celular o la proliferación celular.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos del látex de la planta *Euphorbia ingens* en las líneas celulares fibroblastos y células endoteliales microvasculares del cerebro humano, utilizando un modelo *in vitro* como representación del proceso de cicatrización.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la capacidad de estímulo de proliferación celular del látex de *Euphorbia ingens* en las dos líneas celulares.
- Evaluar los efectos morfológicos del látex de *Euphorbia ingens*, en el citoesqueleto y núcleo de las células
- Analizar el estímulo de migración celular del látex de *Euphorbia ingens* en un modelo de cultivo celular *in vitro*.

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DEL LÁTEX DE *EUPHORBIA INGENS*

Para la obtención del látex de la *Euphorbia ingens* primeramente, se recolectó el látex directamente de los tallos en el mes de octubre del 2023 y después se hizo otra colecta en febrero del 2024 mediante el uso de una jeringa estéril. El látex se pesó con precisión, se disolvió con medio DMEM (Dubelco's Modified Minimal Essential Medium) (VitroCell, Brasil). La solución fue almacenada en el refrigerador a 4°C. Seguidamente, se realizó 8 diluciones a partir de esta concentración, las cuales fueron 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL, 0.3125 mg/mL, 0.15625 mg/mL, 0.078125 mg/mL y 0.0390625 mg/mL para su uso en los experimentos posteriores.

5.2 CULTIVO DE CÉLULAS

Los linajes fibroblastos MRC-5 y células endoteliales microvasculares del cerebro humano (HBMEC) fueron obtenidos del *Laboratorio de Biotecnología aplicada a la Salud* de la UNILA. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (VitroCell, Brasil), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina). El frasco se ubicó en la estufa en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 5% de CO₂ y 95% de aire humidificado). El crecimiento del cultivo fue supervisado cada 3 días.

5.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Para determinar la citotoxicidad, se realizó el ensayo de bromuro de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma- Aldrich, EEUU). Se aplicó el látex de *E. ingens* en el linaje celular de células endoteliales microvasculares del cerebro humano (HBMEC) y la línea celular de fibroblastos (MRC-5). Se verificó la viabilidad de las células, se llevó a cabo el recuento celular para determinar su densidad por mililitro de medio. Tanto el linaje celular HBMEC como el MRC-5 se llevaron al flujo laminar y se descartó el medio. A continuación, se lavaron dos veces

con 3 ml de PBS durante 3 minutos y se descartó el PBS. Posteriormente, se añadió 1ml de tripsina y se dejó durante 5 minutos en la estufa para que las células se despegaron del frasco. Luego, se añadieron 3 ml de medio para suspender nuevamente.

Después, se trasladó todo a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 1.200 rpm. A continuación, se descartó el líquido y se resuspendió el precipitado en 1 ml de medio, y se trasladó a un microtubo. Seguidamente, se tomó 10 μ l del microtubo con una pipeta y se mezclaron con 10 μ l de azul de tripán. Este análisis se realizó con colorante azul de tripán y fue utilizado la cámara de Neubauer, para así diferenciar entre células viables y células no viables.

Después de realizar el ensayo de viabilidad celular, se realizó el sembrado de las células en placas de 96 pocillos con una concentración de 1×10^4 células/pocillo y 50 μ l de medio DMEM suplementado con 0,5% de SFB. La placa se incubó a 37 °C durante 24 h para una fijación óptima de líneas adherentes. Posteriormente, las células fueron tratadas con concentraciones del compuesto de prueba que se obtuvieron de las 8 diluciones (5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,15625 mg/mL, 0,078125 mg/mL y 0,0390625 mg/mL). Cada concentración se realizó 6 veces y se incubó por 24 horas. A las 24 horas, se agregaron 10 μ L de MTT (5 mg/mL) en cada pocillo con una incubación a 37°C y un tiempo de 4 horas. Cuando finalizó la incubación, se eliminó el medio con MTT y se agregó 100 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich, EEUU) a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán mediante incubación durante 15 min a temperatura ambiente. El valor de absorbancia por pozo se determinó a través del lector de placas (LOCCUS LMR-96) a 492 nm y 630 nm.

Para el control de los pozos sin tratamiento se colocó 50 μ L de medio completo y el control negativo recibió DMSO al 20% para obtener la muerte celular. Los datos obtenidos de absorbancia se transformaron en el porcentaje utilizando como referencia los controles negativos, los cuales fueron considerados viables, con eso se hizo una curva de viabilidad celular en función a la concentración.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos en los ensayos MTT se utilizaron para calcular el IC50 de las células tratadas, que expresa citotoxicidad por la concentración de la muestra que inducirá la inhibición celular en el 50% de las células. El IC50 se calculó a partir de una curva de regresión no lineal donde el eje X consistirá en las concentraciones de tratamiento en una escala logarítmica y el eje Y los porcentajes de viabilidad celular.

5.4 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN

Las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (HBMEC) se cultivaron en una placa de 24 pozos con una concentración de $2,5 \times 10^5$ células. Se agregaron medios suplementados con SFB y penicilina/estreptomicina, y se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Una vez que el cultivo alcanzó la confluencia completa, se realizó una incisión en la capa celular utilizando una punta de pipeta plástica esterilizada. A continuación, se realizaron dos lavados con medio y se tomó una fotografía utilizando un microscopio invertido (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA).

Después, se aumentó el porcentaje de SFB en el medio para favorecer la migración celular y fue aplicado las concentraciones (5 mg/mL, 2.5 mg/mL) del látex de la *Euphorbia ingens*. Se realizaron análisis periódicos de 12h y 24h en el microscopio invertido (Nikon Instrument, Japón) de los cultivos para registrar la estimulación de las células por parte de los tratamientos investigados. Todos los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo en duplicado. Las fotos tomadas en los tiempos 12h y 24h fueron tratadas con el programa imageJ fiji 64 para calcular el área de reducción en pixels de cada cicatriz.

5.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL CITOESQUELETO Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS.

Para determinar posibles alteraciones causadas por el látex de *Euphorbia ingens*, en la morfología de las líneas celulares (MRC-5) y (HBMEC), se evaluó y examinó cualquier cambio en la morfología de las líneas celulares mencionadas.

Las células se cultivaron en una concentración de 2×10^5 células por pozo en una placa de 6 pozos (12-well Cell Culture Plate, Biofil®) que contenía cubreobjetos circulares. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C. Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 1,5 mL de las concentraciones predefinidas de los tratamientos en cada pozo. Después de transcurrir otras 24 horas, se eliminó el medio de cultivo y se fijaron las células con 1,5 mL de formaldehído al 4% durante 20 minutos. A continuación, se permeabilizó con Triton X-100 en PBS durante 5 minutos. Este proceso de permeabilización se repitió tres veces en total.

Los siguientes pasos fueron realizados en local protegido de luz fuerte. Posteriormente, las células fueron marcadas con 1 mL por pocillo de la solución de marcación DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) y faloidina a 2%, después se dejó en la nevera a una temperatura de 4°C toda la noche. Al día siguiente, se retiró el DAPI y la faloidina y se lavó con una solución de lavado (PBT) tres veces por pocillo cada 5 min. La solución se removió y se añadió PBS para el enjuague de los pocillos. Y finalmente, se observó en la microscopía de fluorescencia (NIKON ECLIPSE Ni H550L) por medio de las láminas y cubreobjetos en objetiva de 40x y 10x. Las imágenes fueron tratadas a través del software ImagenJ fiji 64 (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Fue realizado un análisis de partículas en imageJ fiji 64 para cuantificar el tamaño y la intensidad del DAPI en los núcleos de de MRC-5 y HBMEC para esto se tomaron 5 fotos en cada cubreobjetos de los grupos de control y tratamientos en el microscopio de fluorescencia a 10x de objetiva.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la significancia estadística de los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad y determinar el IC50, se empleó el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EEUU). Asimismo, este mismo programa se utilizó para determinar la reducción significativa del área en el ensayo de migración en cada grupo, utilizando el método de ANOVA de dos vías para comparaciones múltiples de los grupos. De manera similar, en el ensayo de fluorescencia, se utilizó el programa para evaluar la significancia de las diferencias en tamaño e intensidad del marcador

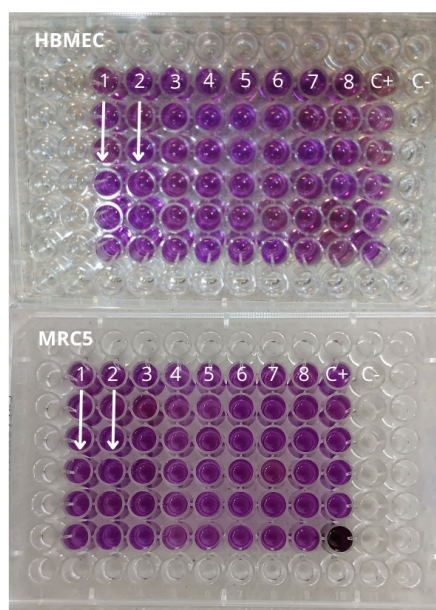
DAPI en los núcleos de ambas líneas celulares, realizando un análisis estadístico mediante ANOVA de una vía.

6. RESULTADOS

6.1 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se evaluó la citotoxicidad del látex de *Euphorbia ingens* en la línea celular HBMEC y MRC-5 mediante el ensayo MTT. El propósito era determinar el grado de viabilidad de las células expuestas al compuesto de prueba en todos los pozos de la placa. Como se muestra en la **Figura 3**, el ensayo se realizó sextuplicata y se utilizaron 8 concentraciones diferentes obtenidas a partir de una dilución seriada. Estas concentraciones fueron las siguientes (de mayor a menor): 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,15625 mg/mL, 0,078125 mg/mL y 0,0390625 mg/mL. Estas concentraciones se aplicaron de izquierda a derecha en orden decreciente. Los controles positivo y negativo corresponden a las dos últimas columnas.

Figura 3 - Placas de 96 pozos utilizadas para el ensayo de MTT en las células HBMEC y MRC-5.



Nota: Todas las concentraciones del látex de euphorbia ingens utilizadas en ambos experimentos se dejaron en cada pozo durante 24h. Las concentraciones en cada columna en los dos experimentos fue: 1 (5 mg/ml), 2 (2.5 mg/ml), 3 (1.25 mg/ml), 4 (0.625 mg/ml) 5 (0.3125 mg/ml), 6 (0.15625 mg/ml), 7 (0.078125 mg/ml) y 8 (0.0390625 mg/ml) C+ (sin tratamiento), C- (20% DMSO). En el último pozo del C+ se puede ver un color más oscuro debido a la contaminación. Fuente: Del autor.

Para obtener los valores de la viabilidad celular de cada una de las columnas tratadas con el tratamiento y de controles se realizó la lectura de la placa en el espectrofotómetro. La absorbancia de cada pozo fue determinada por su intensidad de color (**Tabla 1 y 2**).

Tabla 1. Valores de viabilidad celular (%) HBMEC.

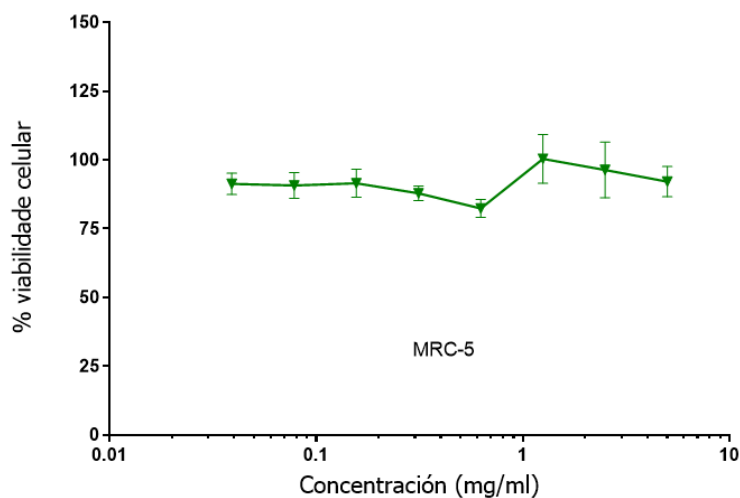
Concentraciones (mg/mL)	Media	Desvío Estándar
5 mg/mL	78,39	20,1
2.5 mg/mL	87,56	12,76
1.25 mg/mL	99,91	12,56
0.625 mg/mL	90,51	14,87
0.3125 mg/mL	94,31	8,91
0.15625 mg/mL	101,44	4,06
0.078125 mg/mL	92,69	11,9
0.0390625 mg/mL.	100,35	15,91
Control sin Tratamiento	100	15,3

Tabla 2. Valores de viabilidad celular (%) MRC-5.

Concentraciones (mg/mL)	Media	Desvío Estándar
5 mg/mL	91,54	5,17
2.5 mg/mL	96,29	10,14
1.25 mg/mL	98.1	9,73
0.625 mg/mL	81.55	3.45
0.3125 mg/mL	86,62	3,72
0.15625 mg/mL	90	5,66
0.078125 mg/mL	86,76	10,57
0.0390625 mg/mL.	90,33	4.16
Control sin Tratamiento	83,33	41,48

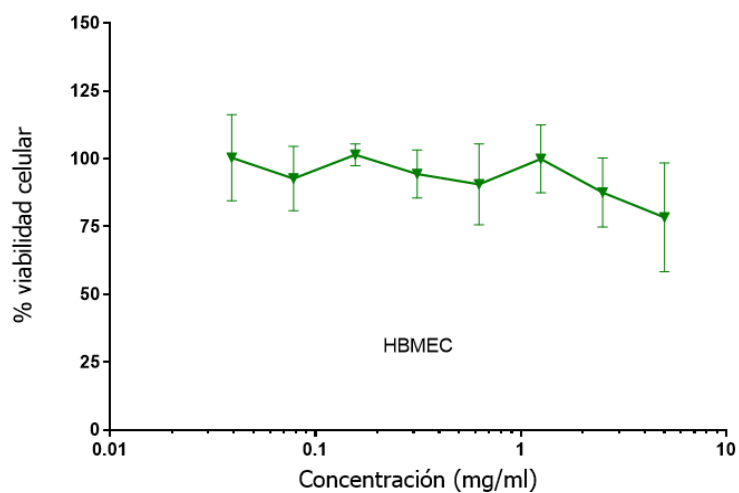
Los resultados del ensayo de MTT mostraron que las células HBMEC y MRC-5 cuando están en presencia del látex de *Euphorbia ingens* no tienen un aumento en la viabilidad celular en relación al control sin tratamiento. Como podemos ver en las **Figuras 4 y 5** , se muestra que en ninguna de las 8 concentraciones hubo un aumento significativo en la viabilidad celular.

Figura 4 - Análisis de la viabilidad celular por ensayo de MTT en MRC-5 al ser tratados con distintas concentraciones del látex de *euphorbia ingens*.



Nota: Cada punto representa el promedio acompañado de la desviación estándar (\pm).

Figura 5 - Análisis de la viabilidad celular por ensayo de MTT en HBMEC al ser tratados con distintas concentraciones del látex de *euphorbia ingens*.



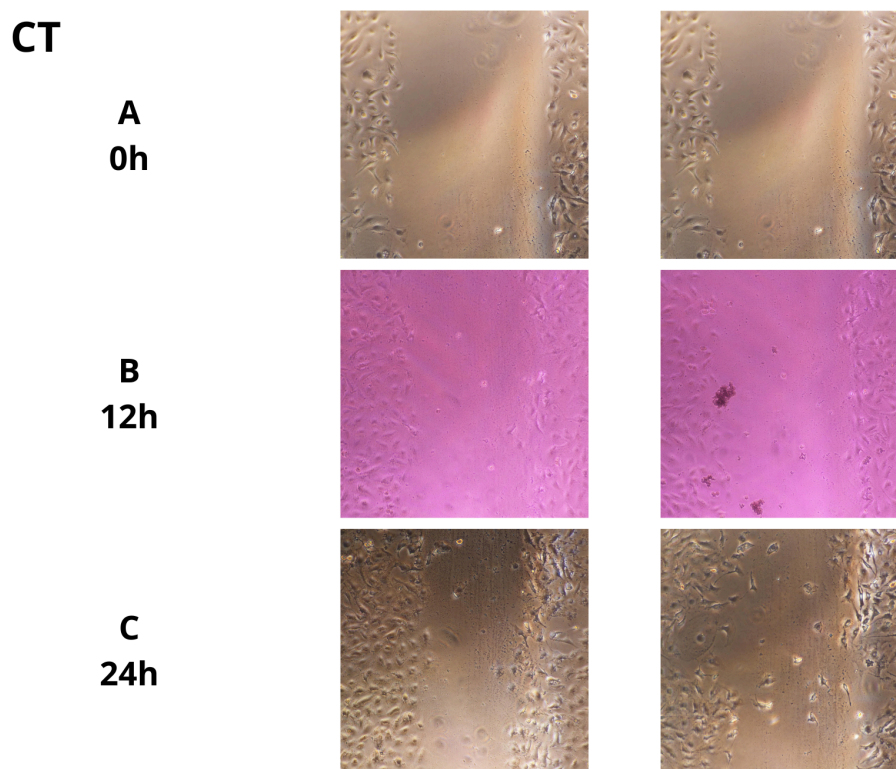
Nota: Cada punto representa el promedio acompañado de la desviación estándar (\pm).

La curva de crecimiento muestra que el látex de *Euphorbia Ingens* en todas sus concentraciones testadas no presentó un efecto tóxico en HBMEC y MRC-5, en el análisis estadístico hecho en el programa *GraphPad Prism 8*, no fue encontrado IC50 para ninguno de los dos experimentos.

6.2 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN

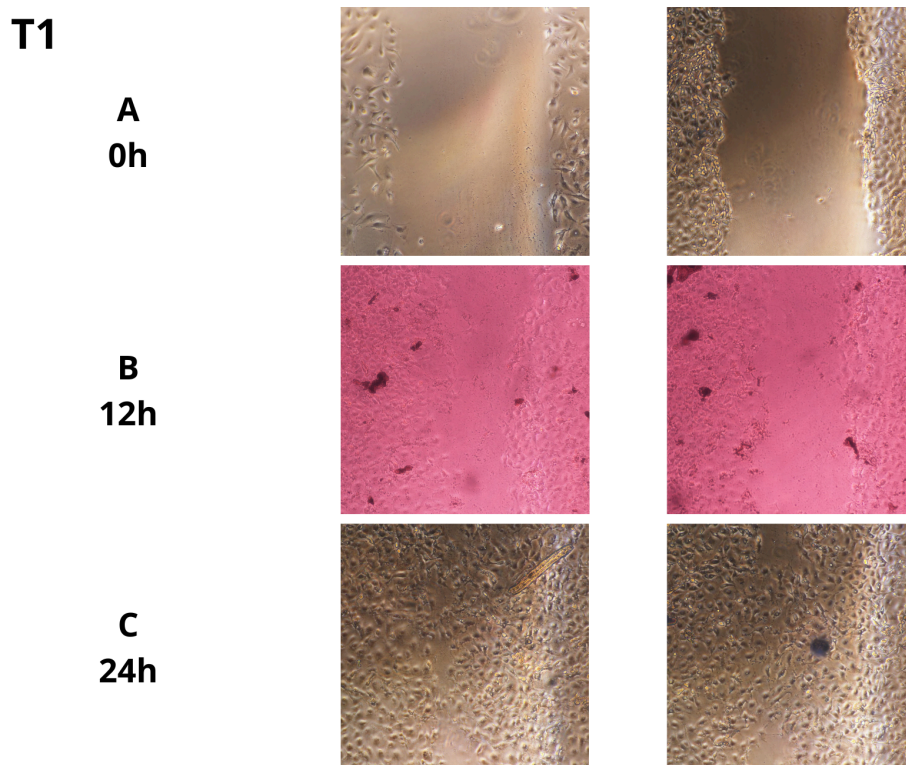
Se llevó a cabo un ensayo de cicatrización utilizando células HBMEC en cultivo in vitro. Se seleccionaron las dos primeras concentraciones altas de látex, dado que ninguna de ellas mostró efectos tóxicos en el ensayo de viabilidad celular mediante MTT.

Figura 6- Fotografías de la cicatriz realizada en células HBMEC sin tratamiento(CT).



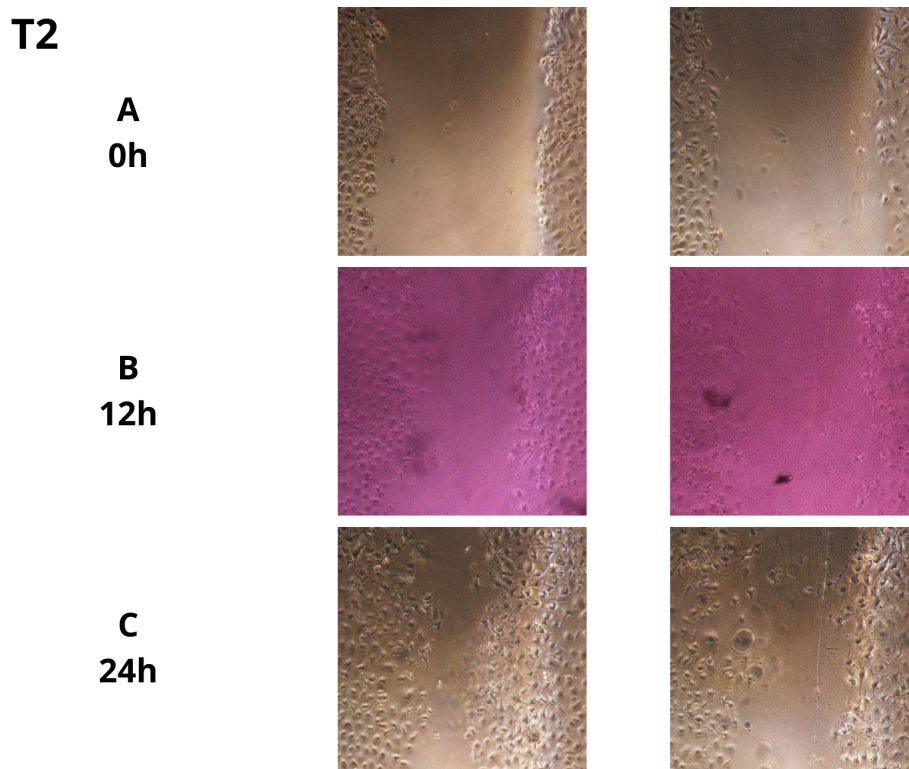
Nota: El Grupo A consta de dos repeticiones en el tiempo 0, mientras que el Grupo B comprende dos repeticiones tomadas después de 12 horas y el grupo C corresponde a dos repeticiones tomadas después de 24h .

Figura 7 - Fotografías de la cicatriz realizada en células HBMEC con presencia de la T1(5 mg/ml).



Nota: El Grupo A consta de dos repeticiones en el tiempo 0, mientras que el Grupo B comprende dos repeticiones tomadas después de 12 horas y el grupo C corresponde a dos repeticiones tomadas después de 24h .

Figura 8 - Fotografías de la cicatriz realizada en células HBMEC con presencia de la T2(2.5 mg/ml).



Nota: El Grupo A consta de dos repeticiones en el tiempo 0, mientras que el Grupo B comprende dos repeticiones tomadas después de 12 horas y el grupo C corresponde a dos repeticiones tomadas después de 24h .

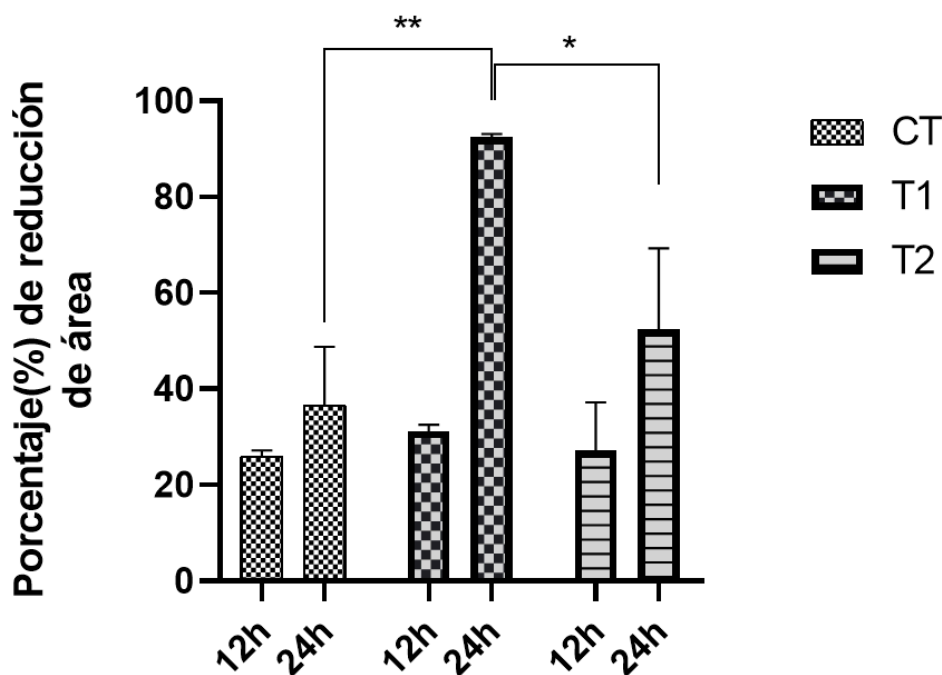
Se calcularon los valores de reducción de área de cada cicatriz en CT, T1 y T2. La **Tabla 3** muestra que después de 12 horas, la reducción de área en las cicatrices con el tratamiento de látex no mostró una gran diferencia con el control. Sin embargo, pasadas las 24 horas, se puede observar una diferencia en la reducción en T2 y T1, siendo estas más altas que en CT. Especialmente, T1 mostró un área de reducción considerablemente más alta que CT. Las cicatrices fueron analizadas con el programa ImageJ fiji 64.

Tabla 3 - Valores de las reducciones en pixels de áreas en las cicatrices realizadas en CT, T1(5 mg/ml) y T2(2.5 mg/ml).

Grupo	0h Área	12h Área	Reducción de Área %	24h Área	Reducción de Área %
CT 1	1696925	1241957	26,81%	929452	45,22%
CT 2	1815061	1360078	25,06%	1309718	27,84%
Média			25,93%		36,53%
T1	1299763	905479	30,33%	98572	92,94%
T1	1392776	944952	32,15%	91731	92,92%
Média			31,16%		92,94%
T2	1678942	1103871	34,25%	599076	64,31%
T2	1657459	130588	20,02%	987514	40,42%
Média			27,13%		52,36%

A partir de los resultados de reducción de área de la **Tabla 3**, se llevó a cabo un análisis estadístico de comparaciones múltiples entre los grupos CT, T1 y T2 en dos momentos diferentes: 12 horas y 24 horas (**Figura 9**). Este análisis se realizó utilizando el software Prism 8

Figura 9 - Análisis estadístico de los porcentajes de reducción de área después 12h y 24h con tratamiento.



Nota: cada grupo tiene su barra de error que representa la desviación estándar (\pm).

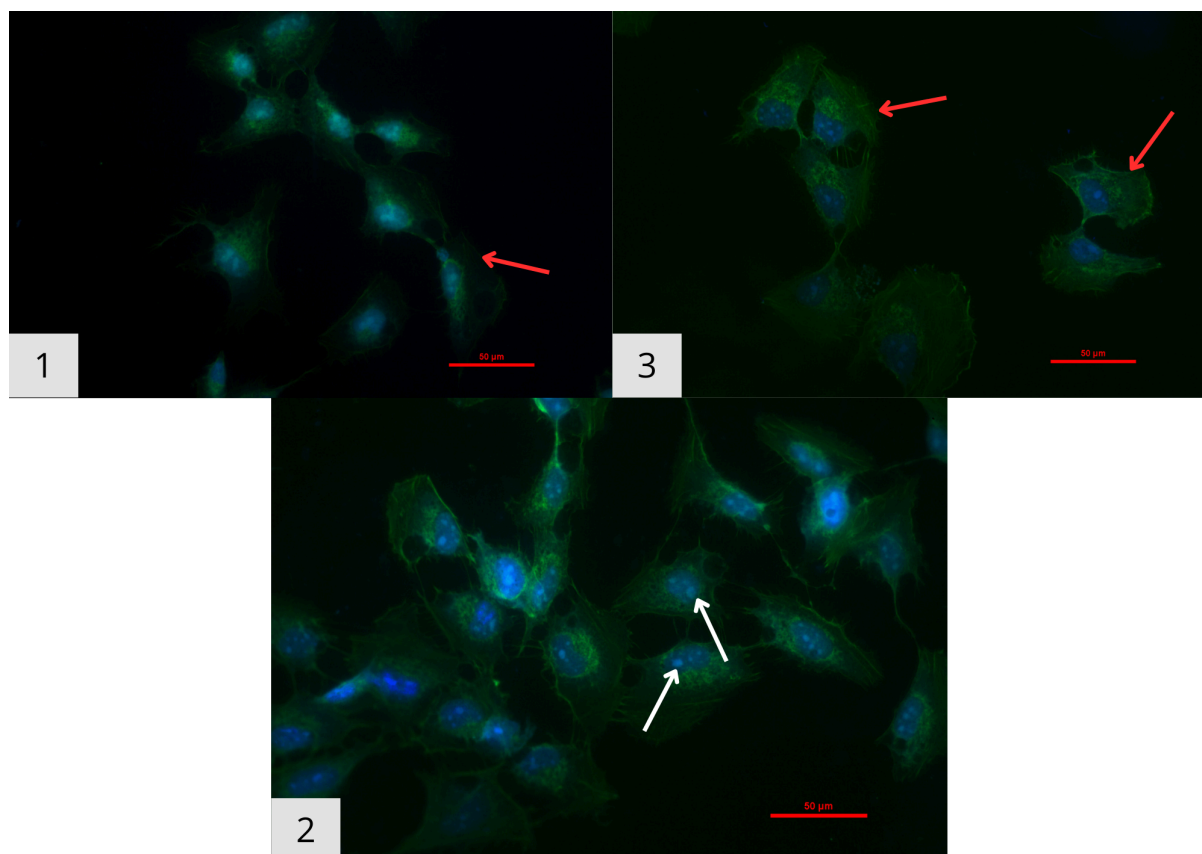
Los resultados indicaron que, después de 12 horas, no hubo diferencias importantes en cuánto se redujo el área entre los diferentes grupos. Sin embargo, después de 24 horas, se observaron diferencias significativas entre el grupo de control (CT) y el grupo de tratamiento T1 ($p = 0.0032$), así como entre los grupos de tratamiento T1 y T2 ($p = 0.0166$). Pero no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de control (CT) y el grupo de tratamiento T2 en el punto temporal de 24 horas.

6.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL CITOESQUELETO Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS.

Se realizó un ensayo de fluorescencia utilizando las líneas celulares MRC-5 y HBMEC, empleando DAPI para marcar el núcleo de las células y faloidina para las fibras de actina del citoesqueleto. Dado que las concentraciones de T1 y T2 no demostraron toxicidad en el ensayo MTT, se procedió con este experimento para analizar con mayor detalle el efecto del látex de *Euphorbia Ingens* en ambas líneas celulares.

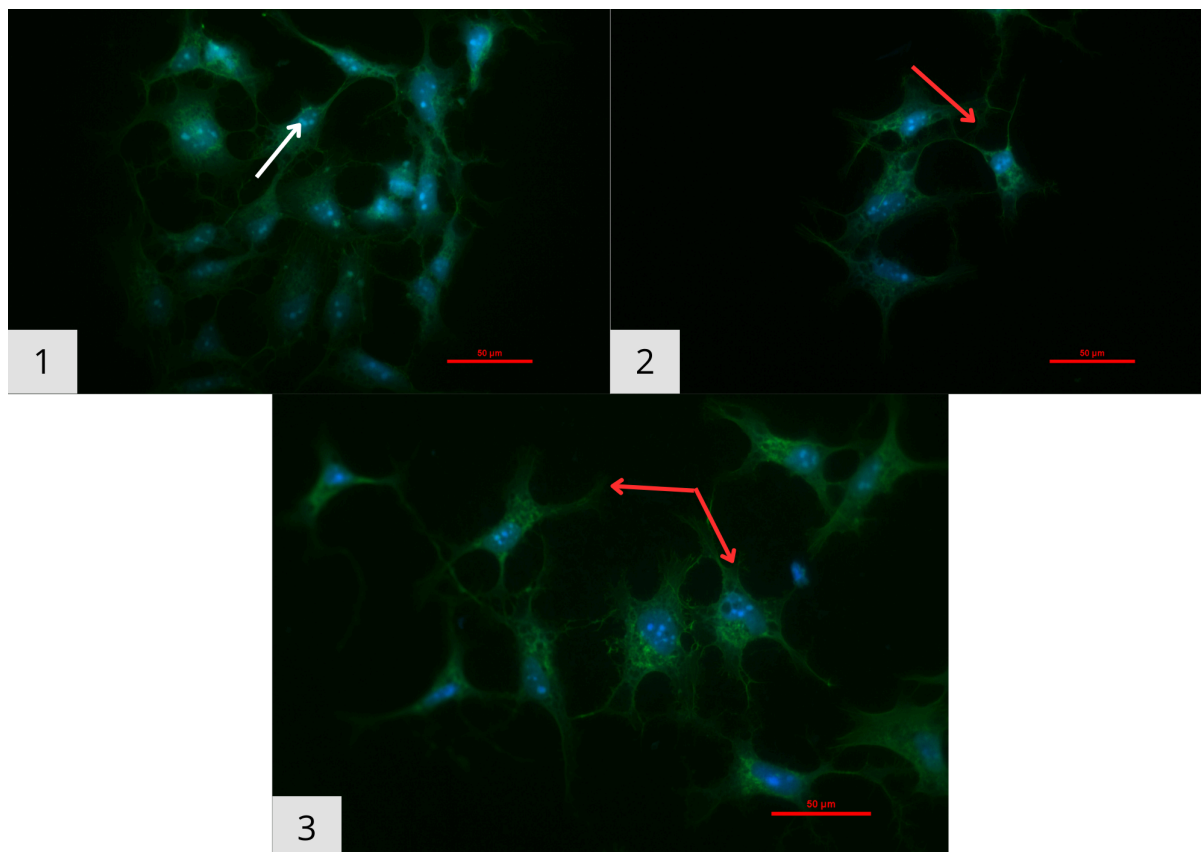
En el grupo de control de HBMEC y MRC-5, se observó un núcleo con una estructura normal, aunque dentro del mismo se identificaron posibles cuerpos apoptóticos marcados con DAPI; además, el citoesqueleto mostró una estructura uniforme en ambas células. Las células tratadas con los compuestos T1 y T2, tanto en HBMEC como en MRC-5, presentaron la presencia de cuerpos apoptóticos en los núcleos, acompañados de una deformación más ramificada en el citoesqueleto en comparación con el grupo de control, donde se mantuvo una morfología más uniforme.

Figura 10 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células HBMEC sin tratamiento (CT).



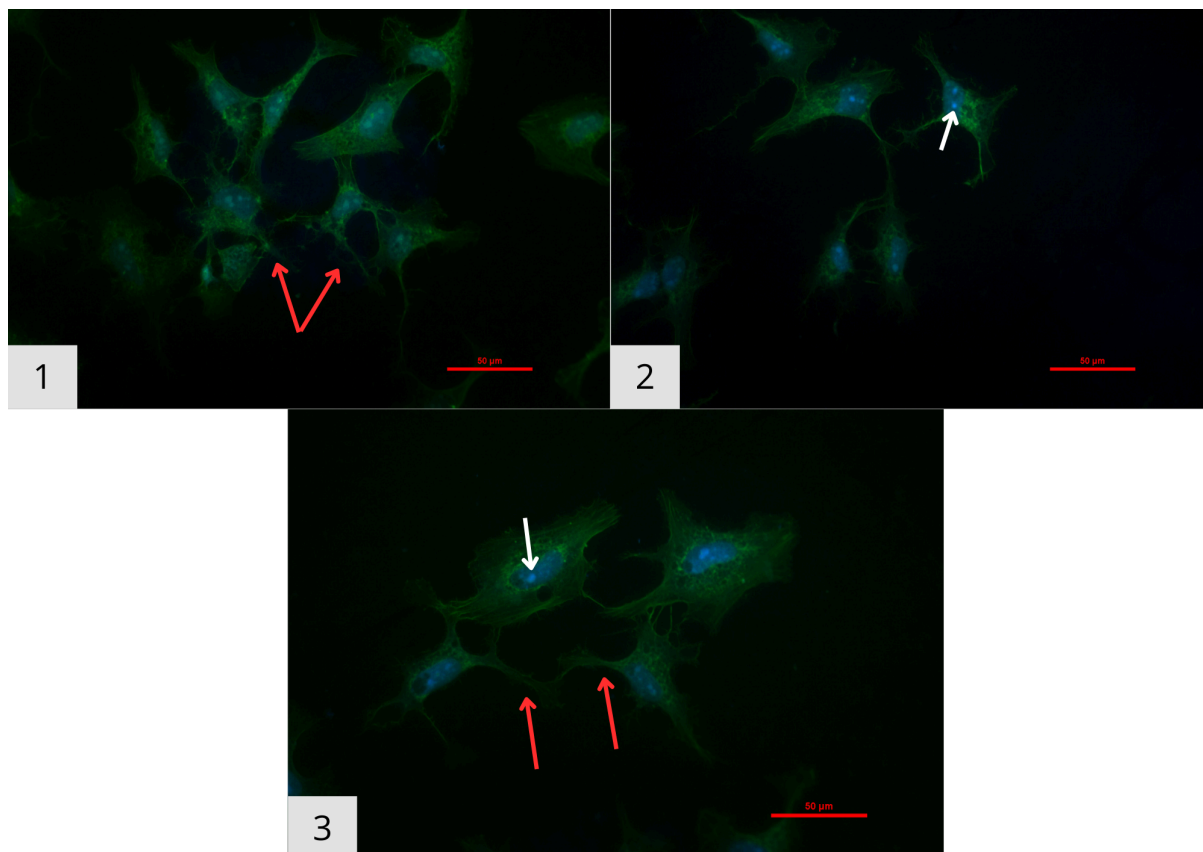
*Nota: Las fotografías fluorescentes 1, 2 y 3 de la **Figura 10** son de la línea celular HBMEC, sin tratamiento. Estas fueron marcadas con DAPI para la marcación nuclear (azul) y faloidina para la marcación de las fibras de actina (verde). Todas las imágenes están superpuestas y capturadas con una lente de 40x. Las flechas blancas señalan la presencia de cuerpos circulares en los núcleos, y las flechas rojas señalan una estructura uniforme del citoesqueleto.*

Figura 11 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células HBMEC con el T1 (5 mg/ml).



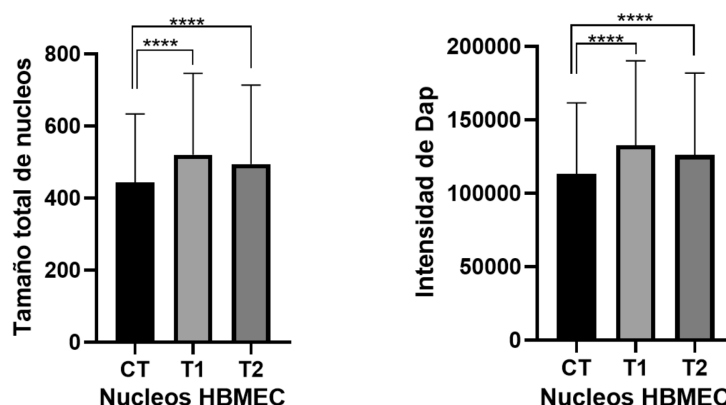
Nota: Las fotografías fluorescentes 1, 2 y 3 de la Figura 11 son de la línea celular HBMEC, tratadas con el látex de Euphorbia ingens. Estas fueron marcadas con DAPI para la marcación nuclear (azul) y faloidina para la marcación de las fibras de actina (verde). Todas las imágenes están superpuestas y capturadas con una lente de 40x. Las flechas blancas señalan la presencia de cuerpos circulares en los núcleos, y las flechas rojas señalan una estructura ramificada del citoesqueleto.

Figura 12 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células HBMEC con el T2(2.5 mg/ml).



Nota: Las fotografías fluorescentes 1, 2 y 3 de la Figura 12 son de la línea celular HBMEC, tratadas con el látex de Euphorbia ingens. Estas fueron marcadas con DAPI para la marcación nuclear (azul) y faloidina para la marcación de las fibras de actina (verde). Todas las imágenes están superpuestas y capturadas con una lente de 40x. Las flechas blancas señalan la presencia de cuerpos circulares en los núcleos, y las flechas rojas señalan una estructura ramificada del citoesqueleto.

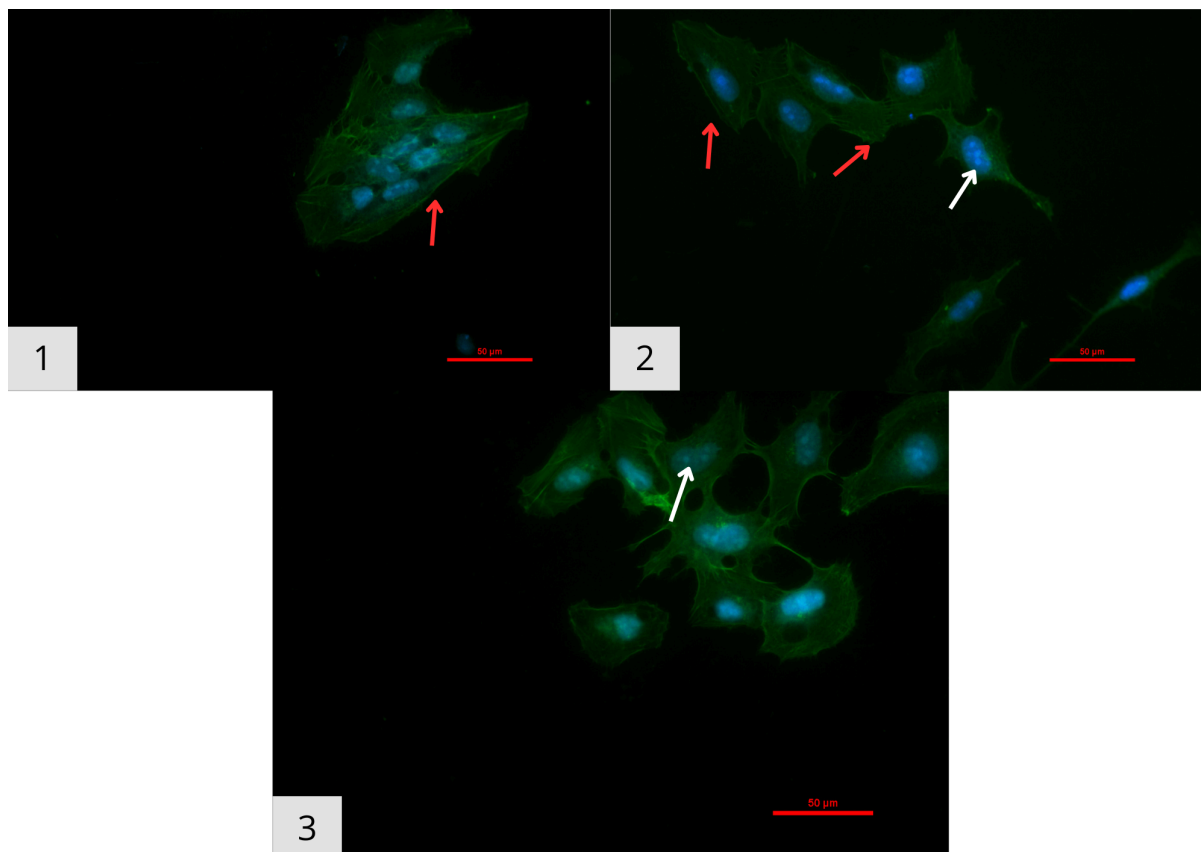
Figura 13 - Análisis estadístico del tamaño de área y intensidad del Dapi en los núcleos de células HBMEC en presencia de tratamiento (T1, T2).



Nota: cada grupo tiene su barra de error que representa la desviación estándar (\pm).

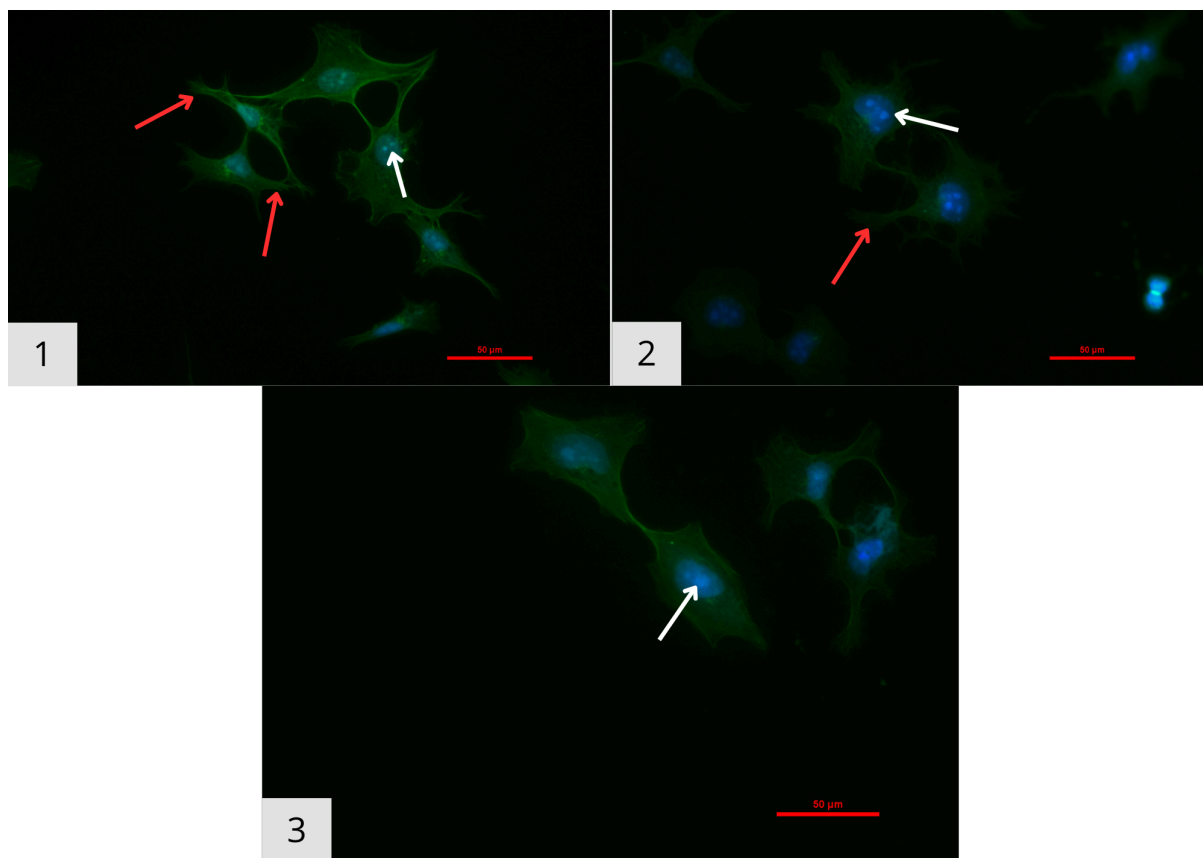
Los resultados indicaron que hay diferencias significativas en la intensidad del marcador DAPI entre el grupo control (CT) y los grupos de tratamiento (T1 y T2), en ambos casos ($p < 0.0001$), confirmando que la intensidad del DAPI es más alta en los grupos T1 y T2. Asimismo, los resultados del análisis estadístico de los tamaños de los núcleos mostraron que hay diferencias significativas en ambos casos ($p < 0.0001$) entre el grupo control (CT) y los grupos de tratamiento (T1 y T2), confirmando que los tamaños de los núcleos son más altos en los grupos T1 y T2.

Figura 14 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células MRC-5 sin tratamiento (CT).



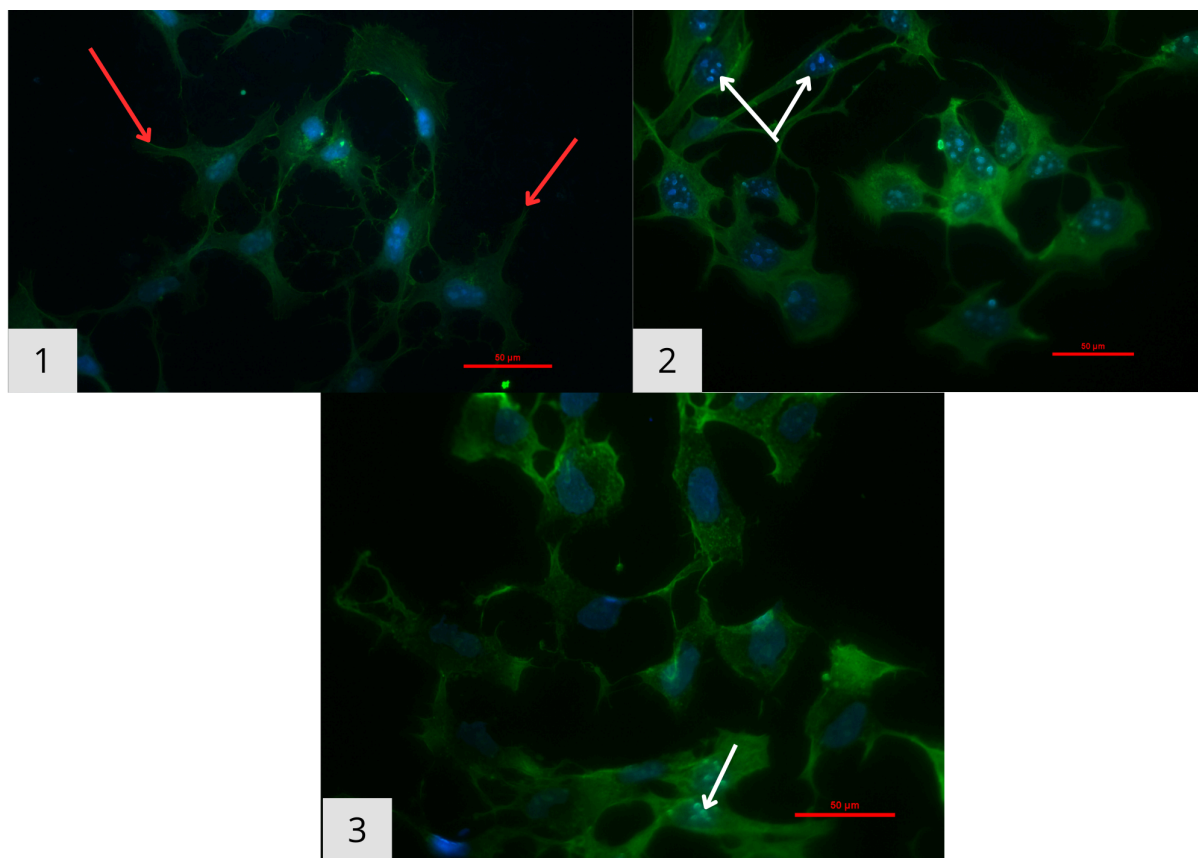
*Nota: Las fotografías fluorescentes 1, 2 y 3 de la **Figura 14** son de la línea celular MRC-5, sin tratamiento. Estas fueron marcadas con DAPI para la marcación nuclear (azul) y faloidina para la marcación de las fibras de actina (verde). Todas las imágenes están superpuestas y capturadas con una lente de 40x. Las flechas blancas señalan la presencia de cuerpos circulares en los núcleos, y las flechas rojas señalan una estructura uniforme del citoesqueleto.*

Figura 15 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células MRC-5 con el T1 (5 mg/ml).



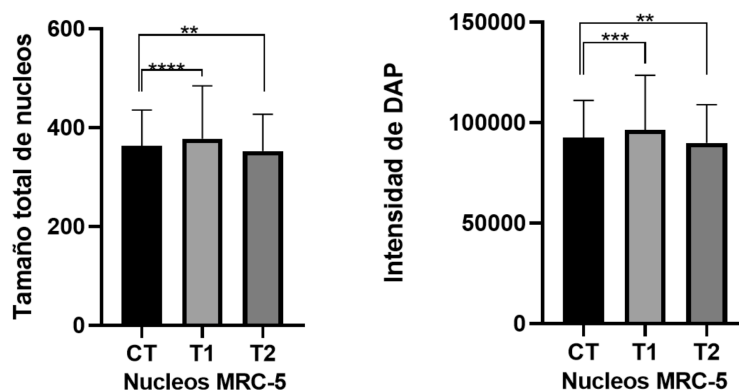
*Nota: Las fotografías fluorescentes 1, 2 y 3 de la **Figura 15** son de la línea celular MRC-5, tratadas con el látex de *Euphorbia ingens*. Estas fueron marcadas con DAPI para la marcación nuclear (azul) y faloidina para la marcación de las fibras de actina (verde). Todas las imágenes están superpuestas y capturadas con una lente de 40x. Las flechas blancas señalan la presencia de cuerpos circulares en los núcleos, y las flechas rojas señalan una estructura ramificada del citoesqueleto.*

Figura 16 - Análisis morfológico del núcleo y citoesqueleto de las células MRC-5 con el T2 (2.5 mg/ml).



*Nota: Las fotografías fluorescentes 1, 2 y 3 de la **Figura 16** son de la línea celular MRC-5, tratadas con el látex de *Euphorbia ingens*. Estas fueron marcadas con DAPI para la marcación nuclear (azul) y faloidina para la marcación de las fibras de actina (verde). Todas las imágenes están superpuestas y capturadas con una lente de 40x. Las flechas blancas señalan la presencia de cuerpos circulares en los núcleos, y las flechas rojas señalan una estructura ramificada del citoesqueleto.*

Figura 17 - Análisis estadístico del tamaño de área y intensidad del Dapi en los núcleos de células MRC-5 en presencia de tratamiento (T1, T2).



Nota: cada grupo tiene su barra de error que representa la desviación estándar (\pm).

Los resultados muestran que hay diferencias notables en la intensidad del marcador DAPI entre el grupo control (CT) y los grupos de tratamiento (T1 y T2). Cuando comparamos CT con T1, la diferencia fue muy significativa ($p < 0.0001$), y también fue notable entre CT y T2 ($p < 0.0096$), lo que confirma que la intensidad del DAPI es más alta en T1 y más baja en T2.

Además, al analizar los tamaños de los núcleos, encontramos diferencias significativas en ambos casos. La diferencia entre CT y T2 fue muy marcada ($p < 0.0001$), y también fue notable entre CT y T2 ($p < 0.0060$), confirmando que los tamaños de los núcleos son más grandes en T1 y más pequeños en T2 en comparación con el grupo control.

7. DISCUSIÓN

La reparación de la piel después de una herida es un proceso altamente complejo que demanda una precisa coordinación entre diversos tipos de células en secuencias específicas. Por tanto, la reparación de la piel se encuentra entre los procesos más complejos del cuerpo humano (RODRIGUEZ *et al.*, 2019). En las heridas, la angiogénesis desempeña un papel crucial en la cicatrización normal. Se requieren nuevos capilares para transportar nutrientes, células inmunitarias y oxígeno a las heridas en proceso de curación (DIPIETRO *et al.*, 2016). Varios estudios indican que una respuesta angiogénica robusta es necesaria para una cicatrización adecuada de las heridas.

Según un estudio de la OMS, aproximadamente el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional, siendo los extractos de plantas y sus compuestos activos los más utilizados. Las plantas muestran un amplio espectro de fitoquímicos bioactivos, categorizables en las familias de alcaloides, carotenoides, compuestos fenólicos, esteroides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenoides. Estos compuestos actúan en diferentes fases del proceso de cicatrización de heridas a través de diferentes mecanismos y muestran efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y antioxidantes, mientras estimulan la síntesis de colágeno, la proliferación celular y la angiogénesis (CEDILLO-CORTEZANO *et al.*, 2024).

La *Euphorbia Ingens* pertenece a un género de plantas con potencial terapéutico para una gran gama de problemas de salud como el tratamiento de heridas y quemaduras. El látex de las plantas del género euphorbia está compuesto por diferentes componentes, siendo el más abundante los terpenoides, no obstante, también tiene compuestos fenólicos, alcaloides, saponinas y flavonoides extraídos del látex de estas especies, los cuales han sido en su mayoría pasados por alto, restringiendo así la variedad de aplicaciones potenciales de dicho látex (BENJAMAA *et al.*, 2022).

Los resultados del experimento del ensayo de MTT demostraron que el látex de *Euphorbia ingens* no tuvo efecto tóxico en las células HBMEC y MRC-5 en

ninguna de las 8 concentraciones probadas. Sin embargo, tampoco se observó un aumento significativo en la proliferación celular en comparación con el grupo de control. Estos hallazgos son consistentes en cierta medida con los de Espejo Chamby (2022), quien también encontró que el látex de *Euphorbia ingens* no fue tóxico y mostró un aumento en la viabilidad celular en MRC-5, aunque no se observaron diferencias significativas (ESPEJO CHAMBY, 2022). Además, la dilución utilizada en este estudio del látex con medio de cultivo DMEM podría respaldar las afirmaciones de OKPAKO et al. (2023), quienes señalaron que el látex se considera peligroso, pero que, cuando se procesa correctamente, puede ser utilizado (OKPAKO et al., 2023).

En el ensayo de cicatrización realizado exclusivamente con la línea celular HBMEC, se observó que la reducción de área no fue significativa en los primeros 12 horas en ninguno de los grupos de tratamiento (T1, T2). Sin embargo, después de 24 horas, el grupo T1 mostró un porcentaje de reducción de área estadísticamente significativo en comparación con el grupo sin tratamiento, además de una diferencia significativa en comparación con el grupo T2. Estos resultados sugieren que el látex de *Euphorbia Ingens* en una concentración de 5 mg/ml estimula la migración celular en las células HBMEC.

En estudios anteriores, PIJUAN et al. (2019) destacaron la importancia de la migración celular como un proceso esencial para que las células alcancen su posición adecuada y cumplan su función (PIJUAN et al., 2019). Considerando que el látex de *Euphorbia Ingens* está compuesto por diversos componentes, es plausible que alguno de ellos haya sido responsable de inducir los cambios observados en las células HBMEC para promover la migración celular en nuestro experimento. Por lo tanto, sería pertinente realizar investigaciones adicionales para identificar qué compuestos específicos del látex son responsables de esta estimulación de la migración celular, así como para evaluar si estos compuestos, una vez aislados, inducen una migración celular más significativa en un período de tiempo similar o más corto.

A pesar que en este trabajo no se realizó en ensayo en las MRC-5, en el estudio de Espejo Chamby, (2022), se demostró que utilizando las concentraciones

de 11,6 y 5,8 mg/mL de látex de *Euphorbia Ingens*, no hubo diferencia significativa en las reducciones de área de ambas concentraciones (ESPEJO CHAMBY, 2022). Sin embargo, es crucial tener en cuenta dos aspectos que difieren de nuestro estudio. En primer lugar, en el experimento de Espejo Chamby, el látex fue diluido en PBS en lugar de DMEM, lo cual podría influir en los resultados debido a las diferentes composiciones de los ambos medios. En segundo lugar, las concentraciones utilizadas en su estudio difieren notablemente de las que nosotros empleamos, siendo una de ellas considerablemente mayor y la otra 0,8 mg/mL a más. Estas diferencias vuelven interesante la realización de un futuro experimento con nuestros parámetros para determinar si también hay una reducción de área significativa en la cicatriz como en las células HBMEC.

Los resultados de fluorescencia mostraron que en las células HBMEC y MRC-5 con los T1 y T2 presentaron una estructura del citoesqueleto con un formato más ramificado con varias protuberancias a diferencia de las células sin tratamiento. Estos resultados podrían indicar la formación de extensiones como filopodios y lamelipodios los cuales según el estudio de MICHAELIS (2014), son estructuras celulares clave en la migración celular. Los filopodios son proyecciones delgadas y largas que exploran el entorno, detectan señales y guían la dirección de migración, como en la formación de vasos sanguíneos. Mientras tanto, los lamelipodios, extensiones planas con filamentos de actina, facilitan la protrusión, tracción y desplazamiento celular al adherirse al sustrato, abriendo camino en la migración colectiva de células. Ambas estructuras contribuyen a la eficacia y dirección del movimiento celular (MICHAELIS, 2014). Para interpretar mejor estos resultados, es necesario hacer más estudios futuros que confirmen que las protuberancias presentadas en nuestro ensayo de fluorescencia en las células HBMEC y MRC-5 si son formaciones de filopodios y lamelipodios.

En el análisis de fluorescencia del núcleo de las células HBMEC y MRC-5 se observó la presencia de cuerpos circulares marcados con Dapi en los núcleos, tanto en los grupos de tratamiento (T1, T2) como en el grupo sin tratamiento. Estos hallazgos podrían coincidir con la observación de estructuras circulares, descritas como cuerpos apoptóticos, realizada por SALEK *et al.* (2023), quienes también las han caracterizado como síntomas de apoptosis (SALEK *et al.*, 2023). Sin embargo,

es importante resaltar que la presencia de estos cuerpos circulares en los núcleos no parece estar exclusivamente vinculada al tratamiento con látex de *Euphorbia ingens*, ya que también se observaron en el grupo de control. Esto sugiere que podrían existir otros factores contribuyentes a la formación de cuerpos apoptóticos, aparte del látex de *Euphorbia ingens*. Por lo tanto, es importante considerar otros posibles desencadenantes o factores contribuyentes en lugar de atribuir exclusivamente la presencia de cuerpos apoptóticos al tratamiento con látex. Este hallazgo destaca la necesidad de llevar a cabo más investigaciones para identificar si estos cuerpos realmente son apoptóticos. Además, es importante verificar también qué factores podrían estar involucrados en la formación de estos cuerpos circulares en ambos grupos, tanto tratados como no tratados.

En el análisis de la intensidad del Dapi en HBMEC los núcleos mostró diferencias significativas entre el grupo control (CT) y los grupos de tratamiento (T1 y T2), Cuando comparamos CT con T1 y T2, en ambos mostraron la misma diferencia la cual fue muy significativa ($p < 0.0001$), esto confirma que la intensidad es más grande en T1 y T2. Además, al analizar los tamaños de los núcleos, encontramos diferencias significativas iguales en ambos casos, con valores de p muy bajos ($p < 0.0001$) confirmando que los tamaños de los núcleos son más grandes en T1 y T2. Sin embargo, es importante destacar que también se observó una gran variabilidad dentro de los grupos de tratamiento y control, indicada por la alta desviación estándar en las mediciones. Por lo tanto, aunque los resultados sugieren diferencias entre los grupos de tratamiento y el grupo control, es difícil atribuir estas diferencias exclusivamente al látex de *Euphorbia ingens*.

En las MRC-5 los resultados también muestran diferencias significativas en la intensidad del marcador DAPI entre el grupo control (CT) y los grupos de tratamiento (T1 y T2). Cuando comparamos CT con T1, la diferencia fue muy significativa ($p < 0.0001$), y también fue notable entre CT y T2 ($p < 0.0096$), lo que confirma que la intensidad del DAPI es más alta en T1 y más baja en T2. Además, al analizar los tamaños de los núcleos, encontramos diferencias significativas en ambos casos. La diferencia entre CT y T1 fue muy marcada ($p < 0.0001$), y también fue notable entre CT y T2 ($p < 0.0060$), confirmando que los tamaños de los núcleos

son más grandes en T1 y más pequeños en T2 en comparación con el grupo control. De igual manera que en el análisis de las HBMEC en las MRC-5 se observó una gran variabilidad dentro de los grupos de tratamiento y control, mostrada por una alta desviación estándar en las mediciones. Entonces, aunque los resultados sugieren diferencias entre los grupos de tratamiento y el grupo control, es difícil atribuir estas diferencias exclusivamente al látex de *Euphorbia ingens*.

En resumen, al analizar los núcleos de HBMEC y MRC-5, si bien se observan diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y el grupo control, la notable variabilidad dentro de los grupos de tratamiento sugiere la necesidad de una mayor exploración para comprender completamente las causas subyacentes de estas diferencias y garantizar la precisión de las conclusiones. Esta variabilidad podría ser atribuida a diversos factores, como la heterogeneidad de cada muestra, la sensibilidad del ensayo, la calidad de las imágenes capturadas, el método de análisis utilizado en el programa ImageJ fiji 64, y la posible influencia de otros factores desconocidos en cada ensayo de fluorescencia. Por lo tanto, es esencial considerar cuidadosamente estos aspectos al interpretar los resultados y no suponer que el látex de *Euphorbia ingens* es el único responsable de las diferencias observadas en el tamaño de los núcleos y la cantidad de ADN marcado por el DAPI.

Por último, es importante mencionar que el látex de *Euphorbia Ingens* es un compuesto bastante lechoso, lo que hace que, después de colocarlo en los pozos, aparente un color muy similar al del DMEM contaminado por esta razón la mezcla del DMEM y el látex dificulta la diferenciación entre los pozos que están contaminados o no. Esta apariencia lechosa también dificultó el análisis de las fotos en ImageJ en el momento del análisis de la foto ya que es difícil observar correctamente la herida. Por lo tanto, estas limitaciones pueden comprometer la precisión de los resultados, por este motivo es importante abordar estas limitaciones para los futuros experimentos y así para garantizar la precisión y validez de los resultados.

8. CONCLUSIÓN

Este estudio sugiere que el látex de *Euphorbia Ingens* podría tener un efecto estimulante en la migración celular en células HBMEC, lo cual podría ser relevante en el contexto de la cicatrización de heridas. Aunque no observamos efectos significativos en la proliferación celular, la estimulación de la migración celular podría ser un aspecto crucial para acelerar el proceso de cicatrización. Sin embargo, es importante reconocer las limitaciones de nuestro estudio y la necesidad de una mayor investigación con experimentos más estandarizados y precisos para validar estos resultados, incluida la identificación de los componentes específicos del látex responsables de los efectos observados.

9. REFERENCIAS

Benjamaa R, Moujanni A, Kaushik N, Choi EH, Essamadi AK and Kaushik NK (2022) Euphorbia species latex: A comprehensive review on phytochemistry and biological activities. *Front. Plant Sci.* 13:1008881. doi: 10.3389/fpls.2022.1008881

Carvajal Carvajal, C. (2017). El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(2), 90-100.

Cedillo-Cortezano, M., Martínez-Cuevas, L. R., López, J. A. M., Barrera López, I. L., Escutia-Perez, S., & Petricevich, V. L. (2024). Use of Medicinal Plants in the Process of Wound Healing: A Literature Review. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 17(3), 303. <https://doi.org/10.3390/ph17030303>

DiPietro L. A. (2013). Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Current opinion in rheumatology*, 25(1), 87–91. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835b13b6>Ross, M. J., &

DiPietro L. A. (2016). Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of leukocyte biology*, 100(5), 979–984. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R>

Davison, K. (2021). Euphorbia ingens. Jardim Botânico UTAD, Flora Digital de Portugal. Recuperado de <https://jb.utad.pt>

ESPEJO CHAMBY, Raissa Esmeralda. EVUALUACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DE LA EUPHORBIA INGENS EN MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO. 2022. 67. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Biotecnología) – Universidad Federal da integración Latinoamericana, Foz de Iguazú, 2022.

Goyal, D., & Goyal, R. (2019). Angiogenic Transformation in Human Brain Micro Endothelial Cells: Whole Genome DNA Methylation and Transcriptomic Analysis. *Frontiers in physiology*, 10, 1502. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01502>

Gonçalves, J., Luís, ., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2022). Evaluation of the In Vitro Wound-Healing Potential of Ayahuasca. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(18), 5760. <https://doi.org/10.3390/molecules27185760>

Gottrup, F., Holstein, P., Jørgensen, B., Lohmann, M., & Karlsmar, T. (2001). A new concept of a multidisciplinary wound healing center and a national expert function of wound healing. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, 136(7), 765–772. <https://doi.org/10.1001/archsurg.136.7.765>

Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Bastos, J. K., Jackson, C. J., & Pellizzon, C. H. (2021). Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. *Life* (Basel, Switzerland), 11(7), 665. <https://doi.org/10.3390/life11070665>

Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599-610. doi:10.1007/s12325-017-0478-y

J.A. van der Linde, M. Wingfield, C. Crous, D. Six, J. Roux Landscape degradation may contribute to large-scale die-offs of *Euphorbia ingens* in South Africa *South African Journal of Botany*, 111 (2017), pp. 144-152

Juneja, K., Mishra, R., Chauhan, S., Gupta, S., Roy, P., & Sircar, D. (2019). Metabolite profiling and wound-healing activity of *Boerhavia diffusa* leaf extracts using in vitro and in vivo models. *Journal of traditional and complementary medicine*, 10(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.02.002>

Leite¹, L. R. V., de Araújo, I. C. R., & de Sousa, F. (2020). Aspectos farmacêuticos da farmacoterapia de feridas: uma revisão de literatura.

Liu, Y., Xu, X., Zhang, Y., Mo, Y., Sun, X., Shu, L., & Ke, Y. (2022). Paradoxical role of $\beta 8$ integrin on angiogenesis and vasculogenic mimicry in glioblastoma. *Cell death & disease*, 13(6), 536. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04959-7>

Lee, S. Y., Park, J. H., Cho, K. H., Kim, H., & Shin, H. K. (2022). Isolinderalactone inhibits glioblastoma cell supernatant-induced angiogenesis. *Oncology letters*, 24(4), 328. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13448>

Lordani, T. V. A., de Lara, C. E., Ferreira, F. B. P., de Souza Terron Monich, M., Mesquita da Silva, C., Felicetti Lordani, C. R., Giacomini Bueno, F., Vieira Teixeira, J. J., & Lonardoní, M. V. C. (2018). Therapeutic Effects of Medicinal Plants on Cutaneous Wound Healing in Humans: A Systematic Review. *Mediators of inflammation*, 2018, 7354250. <https://doi.org/10.1155/2018/7354250>

Malik, K., Ahmad, M., Zafar, M., et al. (2019). An ethnobotanical study of medicinal plants used to treat skin diseases in northern Pakistan. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2605-6>

Malgwi, W. M., Dauda, B. E., Gimba, C. E., & Ahmed, R. (2022). Evaluation of wound healing activity of aqueous leaf extract of *Pupalia lappacea* (L.) Juss. in Wistar rats. *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00178-4>

MEnGARELLI, R. H., Belatti, A., BILEVICH, E. S. T. E. L. A., Gorosito, S., & FERnÁNDEZ, P. A. B. L. O. (2013). La importancia del desbridamiento en heridas crónicas. *Flebología y linfología-Lecturas vasculares*, 8(20), 1253-1260.

Michaelis U. R. (2014). Mechanisms of endothelial cell migration. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS, 71(21), 4131–4148. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1678-0>

Mrabti, H. N., Doudach, L., Mekkaoui, M., Khalil, Z., Harraqui, K., Fozia, F., Naceiri Mrabti, N., El-Shazly, M., Alotaibi, A., Ullah, R., Faouzi, M. E. A., & Bouyahya, A. (2022). Profile of Medicinal Plants Traditionally Used for the Treatment of Skin Burns. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2022, 3436665. <https://doi.org/10.1155/2022/3436665>

Nilforoushzadeh, M. A., Javanmard, S. H., Ghanadian, M., Asghari, G., Jaffary, F., Yakhdani, A. F., Dana, N., & Fatemi, S. A. (2014). The Effects of *Adiantum capillus-veneris* on Wound Healing: An Experimental In Vitro Evaluation. *International journal of preventive medicine*, 5(10), 1261–1268.

Okpako, I. O., Kyama, M. C., & Njeru, S. N. (2023). Phytochemical screening and gas chromatography-mass spectrometry analysis of *Euphorbia ingens* organic root extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 17(3), 100-105.

Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., & Kanmogne, G. D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 1(3), 223–236. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9025-3>

Piazza, S., Fumagalli, M., Khalilpour, S., Martinelli, G., Magnavacca, A., Dell'Agli, M., & Sangiovanni, E. (2020). A Review of the Potential Benefits of Plants Producing Berries in Skin Disorders. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 542. <https://doi.org/10.3390/antiox9060542>

Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, Macià A and Panosa A (2019) In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:107. doi: 10.3389/fcell.2019.0010

Prost-Squarcioni C. (2006). Histologie de la peau et des follicules pileux [Histology of skin and hair follicle]. *Medecine sciences* : M/S, 22(2), 131–137. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222131>

Reyna-Villasmil, E., Briceño-Pérez, C., & Torres-Cepeda, D. (2010). Vasculogénesis y angiogénesis durante el embarazo normal y en la preeclampsia. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 70(4), 265-279.

Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>

Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>

Ross, M. J., & Steyn, G. J. (2004). Preliminary results on the ichthyocidal properties of *Euphorbia ingens* (Euphorbiaceae). *African Journal of Aquatic Science*, 29(2), 265-269.

Sagbo, I. J., & Otang-Mbeng, W. (2021). Plants used for the traditional management of cancer in the eastern cape province of south africa: A review of ethnobotanical surveys, ethnopharmacological studies and active phytochemicals. *Molecules*, 26(15), 4639.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089

Salek, F., Mirzaei, H., Khandaghi, J., et al. (2023). Apoptosis induction in cancer cell lines and anti-inflammatory and anti-pathogenic properties of proteinaceous metabolites secreted from potential probiotic *Enterococcus faecalis* KUMS-T48. *Scientific Reports*, 13, 7813. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34894-2>

Santema, T. B., Poyck, P. P., & Ubbink, D. T. (2016). Skin grafting and tissue replacement for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane database of systematic reviews*, (2).

Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., et al. (2009). Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 17(6), 763-771. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x

Singer A. J. (2022). Healing Mechanisms in Cutaneous Wounds: Tipping the Balance. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 28(5), 1151–1167. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0114>

Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C., & Chen, Y. J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>

Yang, G. H., Lee, Y. B., Kang, D., Choi, E., Nam, Y., Lee, K. H., You, H. J., Kang, H. J., An, S. H., & Jeon, H. (2021). Overcome the barriers of the skin: exosome therapy. *Biomaterials research*, 25(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00224-8>