INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

EVUALUACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DE LA *EUPHORBIA INGENS* EN MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

RAISSA ESMERALDA CHAMBY ESPEJO

Foz do Iguaçu
2022

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DA VIDA E DA NATIREZA (ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

EVUALUACÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DE LA *EUPHORBIA INGENS* EN MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

RAISSA ESMERALDA CHAMBY ESPEJO

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

.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Foz do Iguaçu
2022

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

RAISSA ESMERALDA CHAMBY ESPEJO

EVUALUACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DE LA *EUPHORBIA INGENS* EN MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Trabajo de Conclusión del Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la 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. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA

_____

Prof. Dr. Fernando Cezar dos Santos
(UNILA)

Foz do Iguaçu, 23 de dezembro de 2022.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Raissa Esmeralda Chamby

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
(x) graduação	(…..) artigo
(…..) especialização	(x) trabalho de conclusão de curso
(…..) mestrado	(…..) monografia
(…..) doutorado	(…..) dissertação
	(…..) tese
	(…..) CD/DVD – obras audiovisuais
	(…..)

Título do trabalho acadêmico: Evualuación del efecto cicatrizante de la *Euphorbia ingens* en modelo experimental *in vitro*.

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

Data da Defesa: 23/12/2022

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, 23 de Dezembro de 2022.

Assinatura do Responsável

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Dedico este trabajo a mis padres por su incondicional apoyo, su amor y su sabiduría; A mis profesores, por sus excelentes enseñanzas y constante guía; A mis amigos y compañeros, por su incondicional amistad y apoyo.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

AGRADECIMENTOS

En primer lugar, a Dios y a mi familia por darme la fuerza y el ánimo para poder llevar a cabo esta importante tarea. A mis amigos, por su amistad y compañía durante esta etapa.

A mi orientador, el profesor Dr. Jorge Luis Maria Ruiz, por su orientación, apoyo y motivación durante todo el proceso de investigación y por las valiosas recomendaciones que me proporcionó durante el desarrollo de esta tesis.

También quiero agradecer a los miembros de la banca de tesis, los Dres. Kelvinson Fernandes Viana y Fernando Cezar dos Santos, por su participación en mi proceso formativo.

Finalmente, quiero agradecer a la UNILA, institución que me brindo la oportunidad de estar hoy aquí gracias a su programa de apoyo estudiantil.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

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 Biotecnologia) – Universidad Federal da integración Latinoamericana, Foz de Iguazú, 2022.

RESUMEN

Hoy en día las heridas y lesiones cutáneas son uno de grandes desafíos para la salud humana debido a que las personas tienden a adquirir heridas con frecuencia y la curación de estas es un proceso complejo que requiere varias etapas para su completa recuperación. El tratamiento adecuado de estas lesiones tiene un impacto significativo en la calidad de vida de los pacientes, al igual que en los costos de salud. Actualmente, los tratamientos más comunes para el tratamiento de heridas incluyen la aplicación de medicamentos tópicos, curas de heridas, cirugía y terapias biológicas. Sin embargo, el uso de medicamentos sintéticos a menudo genera efectos secundarios no deseados, por lo que las personas se inclinan hacia el uso de medicamentos naturales. De hecho, el uso de las plantas medicinales ha atraído el interés en la investigación debido a su potencial cicatrizante. La *Euphorbia ingens* es una planta medicinal que se ha utilizado tradicionalmente como un remedio para diversas enfermedades, sin embargo, el efecto cicatrizante de *E. ingens* no ha sido evaluado a nivel celular. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó los efectos cicatrizantes del látex de la *E. ingens* frente a la línea celular de fibroblastos (MRC-5) y la línea de células epiteliales de tumor pancreático (MIA PaCa-2). Para ello primero, se obtuvo el látex de la planta y se realizaron pruebas de citotoxicidad, donde se seleccionó las mejores concentraciones, C1: 11,6 mg/mL y C2: 5,8 mg/mL para los determinar la migración celular y alteraciones morfológicas. Los resultados mostraron que el látex de *E. ingens* no tuvo efectos citotóxicos en las células MRC-5, y no acelero significativamente la cicatrización.

Palabras llaves: Cicatrizante; *Euphorbia ingens*; MCR-5; Medicina tradicional; Látex.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

CHAMBY ESPEJO, Esmeralda Raissa. **EVUALUAÇÃO DO EFEITO CURATIVO DE *EUPHORBIA INGENS* EM MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO.** 2022. 67. Projeto de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

RESUMO

Hoje em dia, as feridas e lesões cutâneas são um dos maiores desafios para a saúde humana, pois as pessoas tendem a adquirir feridas com frequência e a cura dessas é um processo complexo que exige várias etapas para a sua recuperação completa. O tratamento adequado dessas lesões tem um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, assim como nos custos de saúde.. De fato, o uso de plantas medicinais tem atraído o interesse da pesquisa devido ao seu potencial cicatrizante. A *Euphorbia ingens* é uma planta medicinal que tem sido usada tradicionalmente como um remédio para diversas doenças, no entanto, o efeito cicatrizante da *E. ingens* não foi avaliado a nível celular. Portanto, neste trabalho é avaliado o efeito cicatrizante do látex da *E. ingens* em relação à linha celular de fibroblastos (MRC-5) e a linhagem de células epiteliais de tumor pancreático (MIA PaCa-2). Primeiro, foi obtido o látex da planta e foram realizados testes de citotoxicidade para selecionar as melhores concentrações, C1: 11,6 mg/mL e 5,8 mg/mL para os seguintes ensaios, iniciando com o ensaio de cicatrização e finalizando com a morfologia da apoptose, para então realizar os análises estatísticas para avaliar o efeito cicatrizante. Os resultados mostraram que o látex de *E. ingens* não teve efeitos citotóxicos nas células MRC-5 e não acelerou significativamente a cicatrização.

Palabras clave: Cicatrizante; *Euphorbia ingens*; MCR-5; Medicina tradicional; Látex.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

CHAMBY ESPEJO, Esmeralda Raissa. **EVUALUATION OF THE CURATIVE EFFECT OF *EUPHORBIA INGENS* IN EXPERIMENTAL MODEL IN VITRO.** 2022. 67. Course Completion Project (Graduation in Biotechnology) - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2022.

ABSTRACT

Today, skin wounds and injuries are one of the greatest challenges for human health, due to people's tendency to acquire wounds frequently and that their healing is a complex process that requires several steps for its complete recovery. The proper treatment of these lesions has a significant impact on the quality of life of patients, as well as on health costs. Currently, the most common treatments for wound treatment include the application of topical drugs, wound dressings, surgery and biological therapies. However, the use of synthetic drugs often generates unwanted side effects, so people tend to lean towards the use of natural medicines. In fact, the use of medicinal plants has attracted research interest due to its scarring potential. *Euphorbia ingens* is a medicinal plant that has been traditionally used as a remedy for various diseases, however, the scarring effect of *E. ingens* has not been evaluated at the cellular level. Therefore, in this thesis work the scarring effects of the latex of *E. ingens* are evaluated against the (MRC-5) cell line and the pancreatic tumor epithelial cell line (MIA PaCa-2). For this, first, the latex of the plant was obtained, and cytotoxicity tests were performed, where the most effective concentrations C1: 11.6 mg / mL and 5.8 mg / mL were selected for the following assays, starting with the scarring assay and ending with the apoptosis morphology, in order to carry out the statistical analyzes where the scarring effect is evaluated. The results showed that the latex of *E. ingens* had no cytotoxic effects on MRC-5 cells and did not significantly accelerate healing.

Key words: Healing; Euphorbia ingens; MCR-5; Traditional medicine; Latex.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 – Estructura de la Piel 17
Figura 2 – Fases del proceso de cicatrización 19
Figura 3 – *Euphorbia Ingens* 29
Figura 4 – Estructura química del ingenol 30
Figura 5 – Esquema ilustrativo de la obtención del látex *E. ingens* 33
Figura 6 – Esquema ilustrativo del cultivo celular 34
Figura 7 – Esquema de placa de 96 pocillos para el ensayo de MTT 36
Figura 8 – Esquema ilustrativo de ensayo de citotoxicidad 36
Figura 9 – Esquema ilustrativo del ensayo de cicatrización 37
Figura 10 – Esquema ilustrativo de la morfología de apoptosis por tinción 39
Figura 11 – Foto del método de recolección látex de *E. ingens* 40
Figura 12 – Microplaca de 96 pozos utilizada para evaluar la viabilidad celular 41
Figura 13 – Análisis de viabilidad celular por la prueba de MTT en la línea celular Mia-Paca 2 43
Figura 14 – Análisis de viabilidad celular por la prueba de MTT en la línea celular MRC-*5.* 43
Figura 15 – Análisis de estadístico ensayo de MTT 44
Figura 16 – Imágenes de microscópicas a que representan la curación de herida in vitro de las células MRC-5 sin tratamiento (C-) 46
Figura 17 – Imágenes de microscopia que representan la curación de herida in vitro de las células MRC-5 con la presencia de C1 47
Figura 18 – Imágenes de microscopia que representan la curación de herida in vitro de las células MRC-5 con la presencia de C2 48
Figura 19 – Análisis estadístico ensayo de cicatrización 50
Figura 20 – Análisis por microscopía de fluorescencia en de células MRC-5 sin tratamiento (C-) 52
Figura 21 – Morfología celular de las células MRC-5 del grupo C1 (11,6 mg/mL) evaluadas por la microspoai de flurecencia 53
Figura 22 – Morfología celular de las células MRC-5 del grupo C2 (5,8 mg/mL) evaluadas por la microspoai de flurecencia 54

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 – Resumen de las plantas medicinales más importantes de uso tradicional y sus propiedades, con efecto conocido o probado en la cicatrización de heridas..... 22
Tabla 2 – Propriedades terapéuticas dos metabolitos secundarios estudiados..... 24
Tabla 3 – Valores de la viabilidad celular..... 42
Tabla 4 – Áreas del ensayo de cicatrización..... 49

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

DAPI	4’-6-diamino–2-fenilindol
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimetilsulfoxido
IC_{50}	Concentración Inibitória Média
MEC	Matriz Extracelular
MRC-5	Cepa celular 5 del Consejo de Investigación Médica de Reino Unido
MIA PaCa-2	Línea Celular de Cáncer de Páncreas
MTT	Ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organización Mundial de las Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline
SFB	Suero Fetal Bovino

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

SUMARIO

1 INTRODUCCIÓN 14

2 MARCO TEÓRICO 16

2.1 LA PIEL 16

2.2 HERIDAS EN LA PIEL 17

2.3 CICATRIZACIÓN 18

2.3.1 Tratamientos Convencionales 19

2.3.2 Tratamientos fitoterápicos cicatrizantes derivados de plantas 20

2.3.2.1 Compuestos aislados 24

2.3.3.1 Medicina tradicional 25

2.3.3.1 Plantas medicinales en Brasil 26

2.3 FAMILIA EUPHORBIACEAE 27

2.4 *EUPHORBIA INGENS* 28

2.5 LINEA DE FIBROBLASTO PULMONAR (MRC-5) Y LINEA CELUAR DE CARCINOMAS DE PANCREAS (MIA PACA-2) 16

3 JUSTIFICATIVA 31

4 OBJETIVOS 32

5 METODOLOGIA 33

5.1 OBTENCIÓN DEL LÁTEX 33

5.2 CULTIVO CELULAR 33

5.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD 34

5.4 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN 37

5.5 MORFOLOGÍA DE LA APOPTOSIS POR TINCIÓN 37

5.6 ANALISIS ESTADÍSTICO 38

6 RESULTADOS 40

6.1 OBTENCIÓN DEL LÁTEX DE *EUPHORBIA INGENS* 40

6.2 EVALUACIÓN DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR ENSAYO DE MTT 41

6.3 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN 44

5.5 ANALISIS DE LA MORFOLOGIA CELULAR 50

7 DISCUSIÓN 55

8 CONCLUSIÓN 58

REFERENCIAS 59

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

1 INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, compuesto de diversos tejidos que le otorgan resistencia, elasticidad y lo protege de amenazas externas (YOUSEF *et al.*, 2021). Esta estructura actúa como la primera barrera de defensa contra agresiones químicas, físicas, biológicas y patogénicas, además de mantener la homeostasis fisiológica del cuerpo humano (MORESKI *et al.*, 2018).

El daño en la piel es una de las principales preocupaciones del ser humano. Las personas tienden a adquirir heridas con frecuencia, ya sean por accidentes, intervenciones quirúrgicas, quemaduras u otros factores. Estas heridas expuestas a microorganismos dañinos pueden comprometer el estado de salud de la persona, complicando su recuperación y en algunos casos desencadenando una infección (EMING *et al.*, 2014). Las quemaduras, por ejemplo, son una de las lesiones más frecuentes en la piel. De hecho, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las quemaduras constituyen un problema de salud pública a nivel mundial provocando alrededor de 180.000 muertes al año (OMS, 2018).

Proporcionar tratamientos adecuados y efectivos para la curación de estas lesiones y minimizar el impacto estético en el paciente sigue siendo una preocupación central de la atención clínica (TÉOT *et al.*, 2020). Aunque las lesiones menores en personas sanas generalmente se curan bien, las lesiones más grandes o la presencia de una variedad de enfermedades fisiológicas o comunes, como la edad, diabetes, enfermedades vasculares, cáncer, entre otras, pueden afectar negativamente el proceso de curación de maneras que no se conocen del todo bien (SORG *et al.*, 2017).

Para restaurar la piel dañada, existen una variedad de tratamientos y terapias disponibles, como la cirugía, la terapia láser, los tratamientos farmacológicos y la terapia con células madre. Los avances recientes en la ciencia tienen un impacto significativo en el desarrollo de nuevos enfoques para la restauración de la piel (WANG *et al.*, 2018). Estos tratamientos incluyen la terapia con células madre, la terapia génica y el uso de materiales sintéticos. A pesar de estos avances, los tratamientos convencionales de restauración de la piel siguen siendo costosos y requieren un tiempo de tratamiento prolongado, además que, en algunos casos, presentan efectos secundarios y los procedimientos del tratamiento pueden llegar a

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

ser dolorosos (BERMAN *et al.*, 2017; MCGOLDRICK *et al.*, 2017).

Los avances recientes en la medicina tradicional han demostrado que el uso de plantas medicinales para tratar diversas enfermedades puede ser beneficioso. Esto ha llevado a la identificación de numerosas plantas con propiedades cicatrizantes, que pueden ser de gran ayuda para mejorar la calidad de vida de las personas (TI *et al.*, 2022). Estas plantas medicinales pueden actuar como adyuvantes en la terapia para la cicatrización de la piel, lo que puede ayudar a mejorar su aspecto y acelerar el proceso de curación (MORESKI *et al.*, 2018; RAMALHO *et al.*, 2018)

Una de las plantas medicinales con propiedades de interés es la *Euphorbia ingens,* una planta originaria de Sudáfrica, la cual recibe su nombre del médico griego Euforbus quien descubrió sus propiedades laxativas (MWINE; DAMME, 2011a). *E. ingens* contiene en su interior un líquido lechoso llamado látex que es extremamente tóxico y suele ser usado como una medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades comocrónicas como ulceras, verrugas, purgante y cáncer. Existen estudios sobre los extractos metanólicos de la *E. ingens*, en los cuales se ha descubierto que estas plantas no solo tienen relevancia terapéutica, sino que también muestra toxicidad (EL-HAWARY *et al.*, 2021). A pesar del uso de la *E. ingens* para tratar diferentes enfermedades, hasta el momento no se han realizado estudios sobre el uso de su látex como tratamiento cicatrizante.

Dado que no se evidencian estudios que analicen el potencial cicatrizante del látex de la *E. ingens,* el presente trabajo tiene como objetivo evaluar su actividad cicatrizante en el modelo de línea celular de fibroblastos (MCR-5).

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

2 MARCO TEÓRICO

2.1 LA PIEL

La piel es un órgano complejo y está compuesto por diversos tejidos, tipos celulares y estructuras especializadas (Figura 1), se caracteriza porque es elástica, se regenera por sí misma y tiene una función protectora. Esta última se relaciona con el hecho de que es casi permeable y que actúa como una barrera fisiológica contra los daños externos (BUENDÍA *et al.*, 2018). La piel está compuesta por tres camadas:

1) Epidermis, la camada más externa de la piel, relativamente delgada y resistente. La mayor parte de las células que forman la epidermis son queratinocitos, originarios de la capa más profunda llamada capa basal. Al llegar a la superficie los queratinocitos se desprenden de forma gradual y son reemplazados por las células jóvenes que son empujadas desde abajo. Junto a los queratinocitos, hay otros tipos celulares como los melanocitos (sistema de pigmentación), células de Langerhans (sistema inmune) y células de Merkel (sistema nervioso) (BENEDETTI, 2021; THIBODEAU; PATTON, 2002) .

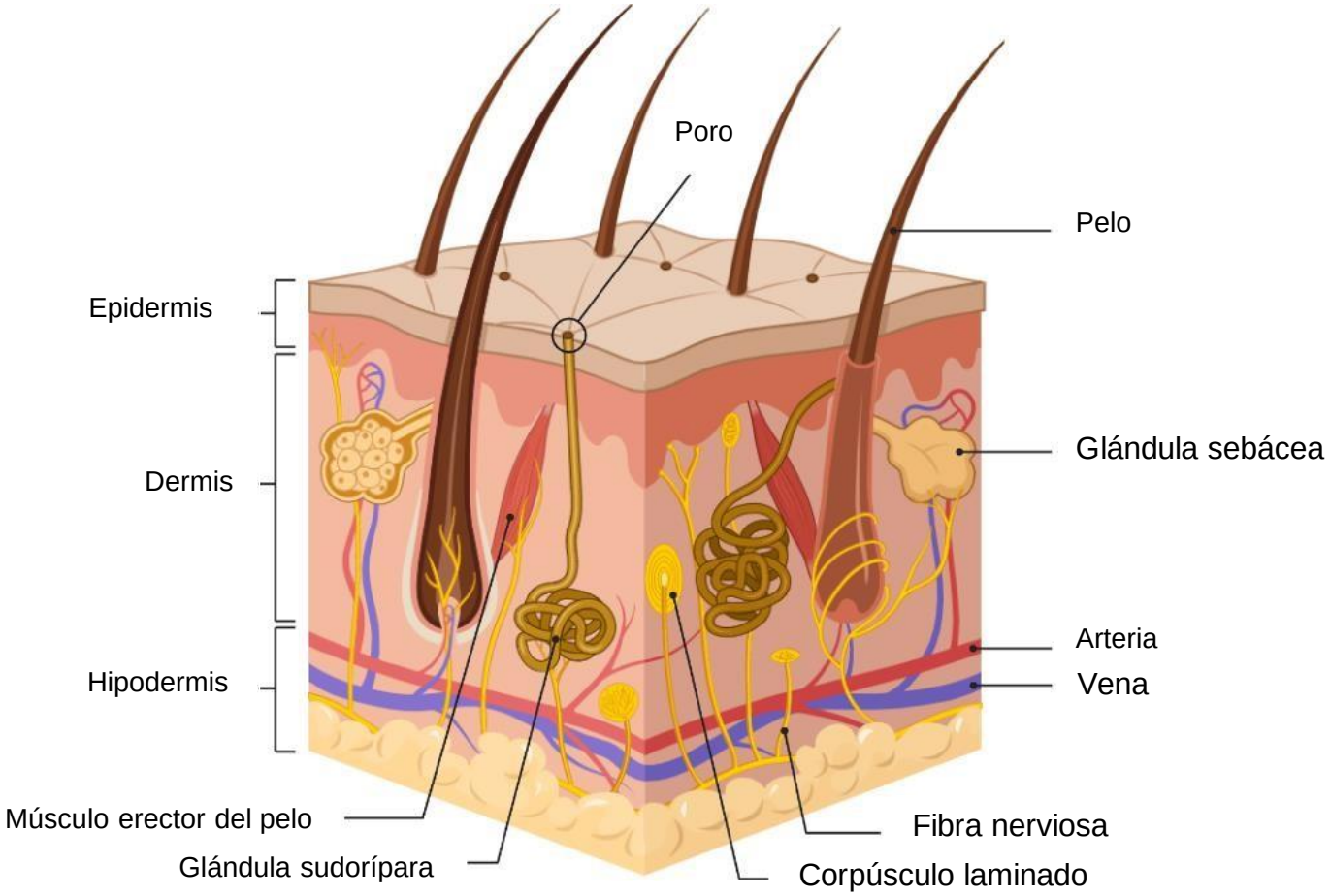
2) Dermis, situada debajo de la epidermis, es responsable de la estructura de soporte de la piel proporcionando resistencia y elasticidad. Está formada básicamente de tejido conectivo fibroelástico (compuesto en su mayor parte por colágeno). La dermis contiene terminaciones nerviosas, glándulas sudoríparas y sebáceas, folículos pilosos y vasos sanguíneos (LIRA, 2009; NAVARRETE, 2003).

3) Hipodermis, o también llamado tejido celular subcutáneo, es la capa más profunda de la piel, se encuentra debajo de la dermis, y no está sujeta a las variaciones de humedad y temperatura como la dermis y la epidermis, además no contiene células epiteliales. Está compuesta por un tejido conectivo con líquido intercelular y rico en tejido adiposo, los cuales se disponen en lóbulos de gordura divididos por septos fibrosos compuestos de colágeno por donde corren vasos sanguíneos, linfáticos y nervios,

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

además de los folículos pilosos. Su grosor es muy variable, dependiendo de su localización, el peso corporal, el sexo o la edad. (GARCIA; FRAILE, 2021; MERUANE; ROJAS, 2012).

Figura 1. Estructura de la piel



Fuente: Autoria própria (Creado en BioRender.com)

2.2 HERIDAS EN LA PIEL

La herida es un traumatismo producido en la piel y se puede definir como una lesión de tejidos blandos con diversas causas. Esto es, una lesión en la que se produce un daño en la integridad del epitelio, dermis o ambos. Estos daños se clasifican en heridas agudas o crónicas dependiendo de las causas y consecuencias subyacentes (TOTTOLI *et al.*, 2020).

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Las heridas agudas generalmente proceden a través de un proceso de reparación organizado y apropiado, lo que resulta en la restauración sostenida de la integridad anatómica y funcional. Por el contrario, las heridas crónicas no son capaces de lograr una integridad anatómica y funcional óptima (LAZARUS *et al.*, 1994). Las heridas también pueden clasificarse en abiertas y cerradas, internas y externas, y limpias y contaminadas/infectadas. Las heridas abiertas se caracterizan por una pérdida de la capa superficial de la herida mientras que las heridas cerradas son aquellas en las que la piel está intacta. Las heridas internas se deben a problemas en el sistema inmune y nervioso y/o disminución en el suministro de sangre, oxígeno o nutrientes a esa área. Las heridas externas generalmente se deben a objetos penetrantes o trauma no penetrante (BARKU, 2019).

2.3 CICATRIZACIÓN

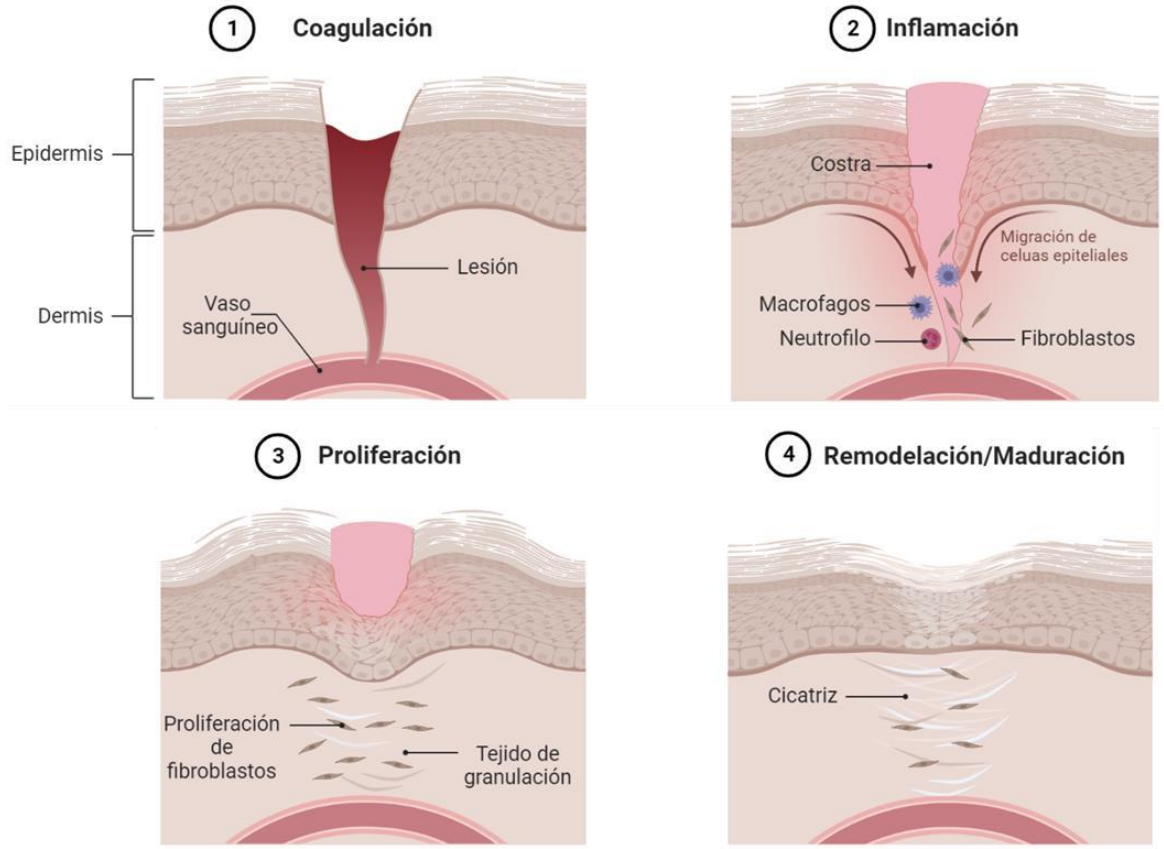
La cicatriz es un proceso biológico que se produce en el organismo como respuesta a una lesión, el cual consiste en la reparación de tejidos dañados (SAÚL, 2015). Proceso en el que ocurren eventos celulares, moleculares y bioquímicos que interactúan para que se produzca la reconstitución del tejido, además de ser mediado por proteínas solubles (citocinas y factores de crecimiento) (Figura 2) (CAMPOS *et al.*, 2007). Las fases de la cicatrización se dividen en:

- Fase inflamatoria: Primera fase, su reacción es inmediata del tejido lesionado, aquí es donde se intenta detener la hemorragia, sellando la superficie de la herida y eliminando agentes que representen peligro para el tejido (LEONG *et al.*, 2017).
- Fase proliferativa: Se caracteriza por la activación de dos procesos principales: la angiogénesis y la migración de fibroblastos, que promueven la formación de una matriz extracelular (MEC) temporal que proporciona un andamiaje para la migración celular y la síntesis de MEC madura (ROMERO, 2016).
- Fase de remodelación: En esta fase el objetivo es madurar el tejido hasta su forma óptima, esto quiere decir, con células bien diferenciadas y una MEC organizada. Aquí es donde ocurre el depósito de colágeno

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

que es muy importante, ya que se produce la reorganización de los componentes de la herida, así como la formación del tejido nuevo. Cabe señalar que cualquier error en esta etapa puede conducir a una cicatrización patológica o a la creación de heridas crónicas (GUARÍN *et al.*, 2013).

Figura 2. Fases del proceso de cicatrización de la piel.



Fases del proceso de cicatrización de la piel. 1.La coagulación puede considerarse una fase previa a la cicatrización de la piel, ya que se produce antes de que comience el proceso de reparación del tejido. Sin embargo, algunas fuentes incluyen la coagulación como una fase de la cicatrización de la piel, ya que es un proceso necesario para que se forme una herida cerrada y se inicie el proceso de reparación del tejido. 2. Aparición del sistema inmune, migración de células epiteliales y fibroblastos. 3. Proliferaciones de fibroblastos y tejido de granulación. 4. Reorganización de los componentes de la herida.

Fuente: Atoraría propia (Creado en BioRender.com)

2.3.1 Tratamientos Convencionales

Actualmente la medicina dispone de varios tipos de tratamiento que

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

subsanar las cicatrices, sin embargo, eso no significa que será eliminada completamente, pero si una buena parte de los casos será imperceptible (BERNABÉU, 2009). En general los objetivos de los tratamientos es mejorar el aspecto y la función (ARENAS, 2003). Los tratamientos se pueden dividir en invasivos y no invasivos. Los tratamientos no invasivos pueden ser: vendajes compresivos, con el fin de disminuir el flujo sanguíneo y facilita en la degradación de colágeno; los geles de silicona, que logran aplanar y mejorar la elasticidad de la cicatriz, pues evita la perdida de agua por evaporación y permite que la cicatriz permanezca hidratada; las cremas o ungüentos tópicos que contienen ingredientes como zinc, vitaminas A y E, etc, que hacen que la cicatriz se vea más reducida y mejorada. Además de estos tipos de tratamiento no invasivo, también existe el apoyo psicológico el cual es importante para los pacientes, ya que las cicatrices causan repercusiones psicosociales y cosméticas (BERNABÉU, 2009).

Los tratamientos invasivos son aquellos que aplican técnicas quirúrgicas para tratar de mejorar la apariencia de la cicatriz. Entre los tratamientos no invasivos se pueden citar: las cirugías donde se realizan pequeñas escisiones quirúrgicas que eliminan la cicatriz; los corticoides inyectado usado para queloides y cicatrices hipertróficas donde se inyecta corticoides en la zona afectada; la crioterapia donde se usa el nitrógeno líquido para congelar cicatrices queloides; la radio terapia, usada exclusivamente para cicatrices muy complejas o que no responden a otros tratamientos menos invasivos y el láser, que elimina las células de la piel en la profundidad y zonas deseadas con el objetivo de producir un nuevo tejido sano (BERNABÉU, 2009; NHS, 2020).

2.3.2 Tratamientos fitoterapéuticos cicatrizantes

Los tratamientos fitoterapéuticos cicatrizantes se basan en el uso de hierbas y plantas medicinales para estimular y apoyar el proceso de curación natural de la piel al promover la coagulación de sangre, lidiar contra las infecciones y acelerar la cicatrización de heridas puesto que se le atribuyen propiedades terapéuticas, ya que, logran la curación funcional (VOUDOURI; TESSEROMATI, 2013). Algunas hierbas y plantas medicinales que se usan comúnmente para tratar cicatrices son la

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

caléndula, lavanda, la salvia y el aloe vera (LORDANI *et al.*, 2018).

Los tratamientos fitoterapéuticos cicatrizantes generalmente se aplican externamente en forma de ungüentos, aceites esenciales, tópicos o baños. Los fitofármacos son medicamentos que se elaboran a partir de plantas y otros productos naturales, y se utilizan en la fitoterapia, los cuales consisten en un ingrediente principal, responsable del principal mecanismo de eficacia, de agentes auxiliares, agentes de respaldo (que afectan la farmacocinética) y agentes estabilizadores de la estructura. A menudo, los productos farmacéuticos fitoterapéuticos están compuestos por numerosos productos a base de hierbas o agentes que aumentan la eficacia médica, que son asequibles y generalmente causan mínimos efectos secundarios indeseables (MAVER *et al.*, 2015) . Sin embargo, la falta de evidencia científica clara para la mayoría de las hierbas y plantas medicinales, junto con los potenciales problemas de seguridad, señalan la necesidad de su estandarización científica, validación y evaluación sistemática de la seguridad antes de su introducción eficiente en el cuidado de heridas (RODRIGUES; MEDEIROS, 2016).

En los últimos años, se ha realizado una extensa investigación en el área de la curación y el manejo de heridas a través de plantas medicinales (KUMAR *et al.*, 2007; LORDANI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2022). La Tabla 1 proporciona una descripción general de las plantas medicinales más importantes y sus propiedades, con un efecto conocido o probado en la curación de heridas.

El uso adecuado de los productos fitoterapéuticos puede ser beneficioso para la salud, ya que presentan un rango terapéutico más amplio y un menor riesgo de reacciones adversas o interacciones con otros productos farmacéuticos en comparación con los productos farmacéuticos químicos (LORDANI *et al.*, 2018) . Sin embargo, es importante tener en cuenta la indicación, dosis, vía de administración, tiempo de uso, parte de la planta utilizada y la forma adecuada de preparación para evitar efectos adversos y garantizar un uso seguro y racional de las plantas medicinales. Se recomienda consultar a un profesional farmacéutico para obtener información sobre las indicaciones y pautas apropiadas para el uso de productos fitoterapéuticos (CIUMAN, 2012) .

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Tabla 1 Resumen de las plantas medicinales más importantes de uso tradicional y sus propiedades, con efecto conocido o probado en la cicatrización de heridas.

Nombre Cientifico	Partes usadas	Formulaciones	Indicaciones terapeuticas	Evidencia clinica	Efectos secundarios	Referencias
(Aloe vera)	Mucilago de partes internas de la hoja	Geles, Pomadas para uso cutaneo	Se ha demostrado que la aplicación sobre la piel aumenta la deposición de colágeno (mejorando su matriz) y la tensión superficial, disminuyendo la inflamación.	Estudios en animales y estudios de casos	Hipersensibilidad al aloe	(SOUSA *et al.*, 2020)
(Calendula officinalis)	Extractos de la flor	Extractos liquidos, unguentos y susutancias vegegtales trituradas	Ejercen actividades antisépticas y juegan un papel antiinflamatorio importante al inhibir ciertas etapas de la inflamación, incluido el aumento de la permeabilidad capilar observado al comienzo del proceso inflamatorio. Los flavonoides refuerzan la acción curativa	Estudios en animales y cultivos celulares	Hipersensibilidad a miembros de la familia Asteraceae	(GIVOL *et al.*, 2019)
(Copaiferalangs dorffi)	Aceite de resina extraído del árbol	Por via oral ou tópica	Los estudios realizados con el aceite de copaiba han demostrado su eficacia como agente cicatrizante y antiinflamatorio.	Estudios laboratoriales y clínicos	Se observan efectos adversos en su uso regular	(ARAÚJO *et al.*, 2022)

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

(Moringa oleifera Lam)	Hojas	El extracto de Morinda citrifolia	Se ha reportado que en animales que fueron tratados con su extracto ha mejorado la cicatrización de heridas al disminuir el tamaño de la herida y el tiempo de la epitelización	Estudios en animales	Efectos adversos en su uso regular	(SUSANTO *et al.*, 2019)
(Chamomilla recutita)	Flores	Extractos acuosos y decocción de hojas, hojas trituradas molidas en una pasta	Las formulaciones preparadas a partir del extracto acuoso (Eupolin) de las hojas han sido autorizadas para uso clínico en Vietnam	Estudios en animales y cultivos celulares	No reportado contra mamíferos, altamente alelopático contra otras plantas. (leves como náuseas, diarrea, dolor de cabeza, cansancio y somnolencia)	(LING *et al.*, 2021)
(Curcuma longa)	Rizoma, Semillas	En forma de pasta de rizomas o ungüento o polvo	se aplica como remedio para las articulaciones inflamadas y esguinces junto con heridas, contusiones	Estudios en animales, estudios de casos y ensayos clínicos	Puede potenciar los efectos antiinflamatorios de otros medicamentos, lo que provoca efectos tóxicos	(AKBIK *et al.*, 2014)

Fuente: Autoría propia

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

2.3.2.1 Compuestos aislados

Los compuestos aislados son metabolitos secundarios producidos por plantas medicinales que se pueden encontrar en diferentes partes de la planta y también son conocidos como fitoquímicos. Estos compuestos químicos son producidos por las plantas como una respuesta a factores ambientales o influencias, incluyendo factores biológicos, químicos y físicos, y protegen a las plantas contra infecciones microbianas o de infestaciones por plagas (LI *et al.*, 2020). Estos fitoquímicos contienen ingredientes activos que se usan para la elaboración de fármacos utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades. Los metabolitos secundarios aislados de las plantas medicinales incluyen alcaloides, glucósidos, terpenoides, saponinas, polifenoles (flavonoides), taninos, quinonas y antraquinonas (SHAKYA, 2016). En la Tabla 1 se muestra los diferentes metabolitos secundarios con sus propiedades terapéuticas.

Tabla 2. Propriedades terapéuticas dos metabolitos secundarios estudiados.

COMPUESTOS	PROPIEDADES TERAPEUTICA
Saponinas	Tienen las propiedades de formar espuma abundante, asociadas con el poder hemolítico. Poseen actividad antiinflamatoria, analgésica, expectorante, antioxidante, reductora del colesterol, antiviral, antimicrobiana y antifúngica.
Flavonoides	Tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitrombótica y protectora de los vasos
Alcaloides	Efecto antimuscarínico que está relacionado con su acción antiespasmódica. A nivel del sistema nervioso central puede ejercer acción depresiva (morfina, escopolamina), o estimulante (esticina, codeína)
Tatinos	Sustancias astringentes y hemostáticas. Sus principales acciones son: antiséptico, antidiarreico, antinflamatoria y cicatrizante.
Quinonas	Indicado para pacientes que tienen estreñimiento para la evacuación intestinal
Cumarinas	Presentan actividad anticoagulante, broncodilatadora y efecto fotosensibilizante promoviendo la melanogénesis siendo útiles en los casos iniciales de vitíligo.

Fuente: Adaptado de (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2021)

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Los principales compuestos aislados utilizados para tratamientos cicatrizantes son los polifenoles, los taninos y los ácidos orgánicos. Los polifenoles se encuentran en una amplia variedad de plantas medicinales, y se considera que protegen a la planta de infecciones microbianas y daños oxidativos. Se han usado para tratar diversas enfermedades, como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Los taninos son compuestos fenólicos que se encuentran en muchas plantas y se consideran que tienen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias y antivirales. Se han utilizado para tratar enfermedades como el herpes, la hepatitis y el cáncer. Los ácidos orgánicos se encuentran en muchas plantas y se han usado para tratar enfermedades como el asma, el cáncer y las infecciones (ALTAMIRANO *et al.*, 2007).

Varios fitoconstituyentes como los triterpenos, saponinas, alcaloides, flavonoides, polifenoles muestran efectos antioxidantes y antimicrobianos y pueden promover uno o más mecanismos del proceso reparador. En consecuencia, se han empleado numerosos extractos de plantas para promover la cicatrización de heridas con un alto grado de éxito (BAHRAMSOLTANI *et al.*, 2014).

2.3.3 Medicina tradicional

Desde la antigüedad el hombre ha experimentado con diferentes técnicas y métodos para curarse, lejos de los modernos consultorios y avanzadas clínicas, desarrollaron una serie de conocimientos, vigentes hasta la fecha, qué les ha permitido sobreponerse a diferentes enfermedades, desde problemas respiratorios hasta enfermedades crónicas e incluso el cáncer (PIMENTEL *et al.*, 2016). Según la (OMS) la medicina tradicional es definida como prácticas, enfoques, conocimientos y experiencias propias de diferentes culturas que se utilizan para mantener la salud, tanto física como mental, que incorporan medicina basada en plantas, animales y/o minerales (OMS, 2013). A lo largo del tiempo la medicina tradicional ha sufrido fuertes influencias de las culturas indígena, africana, asiática y europea (ZARDETO *et al.*, 2019) lo cual permitió el desarrollo de una variedad de medicamentos naturales con propiedades terapéuticas que se han utilizado para curar diferentes enfermedades.

Como ya mencionado, la fitoterapia es una forma de medicina

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

tradicional que utiliza plantas medicinales para tratar o prevenir enfermedades y dolencias. Diferentes estudios han demostrado su eficacia y legitimidad terapéutica. Además, la fitoterapia también ha contribuido al descubrimiento de nuevos fármacos, ya que se han extraído muchas sustancias orgánicas activas de plantas medicinales (SCHLAEPFER; MENDOZA, 2010). Incluso, el 80% de la población brasilera usa alguno tipo de planta medicinal para sustituir la necesidad de medicamentos industrializados (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006).

En la medicina tradicional, las plantas medicinales cumplen un rol importante en el desarrollo de tratamiento para curar personas ya que contienen sustancias activas con potencial terapéutico debido a la cantidad metabolitos secundarios como las saponinas, flavonoides, alcaloides, alcaloides, taninos, quinonas, cumarinas, entre otros, que tienen propiedades terapéuticas como antioxidantes, antinflamatorios, anticancerígenos, antimicrobiano (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2021).

2.3.3.1 Plantas medicinales en Brasil

Brasil se destaca por poseer la mayor diversidad vegetal, lo que despierta un gran interés mundial acerca de las propiedades farmacológicas de plantas oriundas de la flora brasilera con más de 56.000 especies vegetales, siendo un potencial proveedor de especies medicinales (MACEDO *et al.*, 2015). Brasil se encuentra entre los 10 más grandes consumidores de medicinas herbales en el planeta, sin embargo, solo una pequeña porción de esta biodiversidad ha sido científicamente investigada en cuanto a su potencial terapéutico (DIAS *et al.*, 2012). Solo el 8% fueron estudiadas para la investigación de compuestos bioactivos y 1.100 especies fueron evaluadas en sus propiedades medicinales (SARMENTO *et al.*, 2013).

El uso plantas medicinales se centra en sus principios activos para algunas enfermedades como, trastornos del sistema nerviosos central, dolor, respuesta inmune e inflamación, enfermedades respiratorias, del tracto gastrointestinal, cicatrizantes, enfermedades metabólicas y entre otras. Algunas plantas medicinales brasileñas seleccionadas son: *Cordia verbenacea, Euphorbia*

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

tirucalli, Mandevilla velutina, Phyllanthus spp, *Euterpe oleracea, Vitis labrusca, Hypericum caprifoliatum y Hypericum polyanthemum, Maytenus ilicifolia, Protium kleinii y Protium heptaphylium y Trichilia catigua* (DUTRA *et al.*, 2016). Y entre las plantas más estudiadas para la cicatrización son: AnacardiaceaeAnacardium occidentale L., Schinus terebinthifolius Raddi; (Aroeira), ApocynaceaeAspidosperma spp. (Pereiro), BignoniaceaeArrabidaea chica Verlot. (Crajiru), Tabebuia avellanedae Lorentz ex Griseb (Ipê-roxo), CaryocaraceaCaryocar coriaceum Wittm (Pequi), FabaceaeAnadenanthera colubrina Vellozo(Angico), Stryphnodendron spp. (Barbatimão), Copaifera langsdorffii Desf(Copaíba) entre otros (NASCIMENTO; MORAIS, 2017).

2.3 LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

La familia *Euphorbiaceae* es una de las más grandes y diversificadas de plantas con flores (PASCUAL; CORREAL, 1992). Las especies son originarias en su mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, sin embargo, pueden sobrevivir a condiciones cálidas y secas del desierto y mientras que otros son árboles y hierbas de la selva tropical (MWINE; DAMME, 2011b). En Brasil, comprende 72 géneros y cerca de 1100 especies, siendo una de las familias representativas de la flora, pero aún poco estudiada, especialmente en las zonas de sabana de la parte central del país (TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

Su importancia radica en diferentes áreas, pues de algunas especies se obtiene productos industriales *H. brasiliensis* (caucho), alimentos *Manihot esculenta* (yuca), sustancias con propiedades medicinales *Ricinus communis* (laxante) y varias son ornamentales *Cnidoscolus spp., Codiaeumvariegatum, Euphorbia spp., R. communis y Jatropha spp*. (NEIRA *et al.*, 2014). Las especies de esta familia son conocidas por la amplia diversidad química de sus constituyentes como una savia acre y lechosa: el látex que contiene en sus componentes esteres di o tri terpenos que pueden varias en su composición según la especie (ZEGARRA, 2015). Los compuestos como los diterpenos son encontrados en la mayoría de sus géneros, un estudio demostró que aproximadamente 60 especies de *Euphorbia* contenían estos compuestos, además se encontraron terpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas, glicósidos cianogenéticos y taninos, entre otros (TRINDADE;

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

LAMEIRA, 2014).

Estudios demostraron que el contenido de su látex puede ser atribuida a una nueva clase de diterpenos, que además de producir efectos irritantes, es capaz de promover algunos tipos de cáncer y a la vez eliminar otros (BITTNER M. *et al.*, 2001). Destacándose así actividades antitumorales, antiviral, antinflamatorios (KEMBOI *et al.*, 2021).

Hay información científica de algunas plantas curativas de heridas seleccionadas de la familia euphorbiaceae como por ejemplo Euophorbia nerifolia Linn, Euphorbia thymifolia R.Br, Emblica officinalis Linn, Mallotus phippiensis Muell.Arg., Baliospermum monatanum Muell.Arg Feridas, erisipela, carbúnculo diabético, fístula anal (BISWAS; MUKHERJEE, 2003)

Algunas especies del género Euphorbia se utilizan en medicinas folklóricas para curar enfermedades de la piel, gonorrea, parásitos intestinales, migraña y verrugas. El látex de estas plantas contiene numerosos compuestos naturales, algunos de los cuales son de importancia terapéutica o de uso comercial (Giner y Schroeder, 2015). Pocas especies de Euphorbia también han sido reportadas por su potencial de cicatrización de heridas (ALSAFFAR *et al.*, 2021).

2.4 EUPHORBIA INGENS

La *E. ingens* es un árbol suculento, masivamente ramificado con una altura hasta 10 metros, este tamaño masivo se refleja en el nombre de la especie, “ingens”, que en latín significa enorme, vasto o monstruoso, nativo del sur de África (BRUYNS; BERRY, 2019; GILDENHUYS, 2006) (Figura 3). Esta especie prefiere regiones tropicales logrando sobrevivir a largas sequias. Generalmente crece en afloramiento surcos o en arena profunda dentro de vegetación arbustiva (PROTA FOUNDATION, 2008).

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

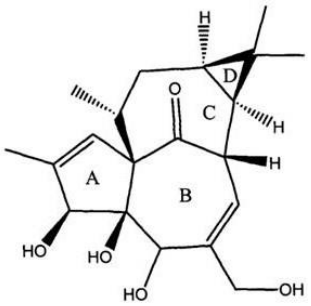
Figura 3. *Euphorbia ingens.*

Fuente: (CEBECI, 2020)

El látex de esta especie es extremadamente toxico y puede causar irritaciones severas en la piel, en contacto con el ojo puede causar ceguera temporal o incluso permanente, si se ingiere pude causa graves enfermedades en humanos y en animales (GILDENHUYS, 2006). Sin embargo, esta savia lechosa todavía es utilizada por locales culturales de Sudáfrica como medicina tradicional para tratar enfermedades crónicas como ulceras, verrugas, purgante y cáncer. Además, se usa para la pesca solo que, en diferentes concentraciones de látex en pruebas de mortalidad, se descubrió que el látex era un veneno para peces eficaz y de corta duración, el veneno se degrada y se vuelve inofensivo para los peces en 48 horas (PROTA FOUNDATION, 2008; ROSS; STEYN, 2004). El látex y las raíces de *E. ingens* está compuesto por ingenol (Figura 4), un éster diterpénico tetracíclico del tipo ingenano, basado en el alcohol original 16-hidroxiningenol y varios derivados del ingenol. Algunos de estos compuestos son responsables de la actividad irritante y posiblemente también de la actividad carcinogénica del látex (OPFERKUCH; HECKER, 1974). Sin embargo, hay estudios donde mencionan que el ingenol y sus derivados han demostrado una actividad promotora de tumores, así como anticancerígenas y anti-VIH (DOUGLAS, 2004). A pesar del uso de *E. ingens* para diferentes tratamientos todavía hay escasez de información científica sobre sus propiedades cicatrizantes.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Figura 4. Estructura química del ingenol.



Fuente:(OPFERKUCH; HECKER, 1982)

2.5 LINEA DE FIBROBLASTO PULMONAR (MRC-5) Y LINEA CELUAR DE CARCINOMAS DE PANCREAS (MIA PaCa-2)

La línea celular de fibroblastos MRC-5 es una línea celular desarrollada originalmente a partir del tejido pulmonar de un feto varón caucásico abortado de 14 semanas de edad (JACOBS *et al.*, 1970). Esta línea de células es muy conocida por su uso en la fabricación de vacunas, y su uso en la investigación básica y aplicada. Esta línea celular es muy útil para el estudio de los mecanismos de cicatrización de heridas en la piel, ya que se comporta bastante similar a las células de la piel humana (MCSHARRY *et al.*, 2001).

Por otro lado, la línea celular MIA PaCa-2 es una línea celular de células epiteliales de tumor pancreático obtenida a partir de un tumor humano es decir un tejido tumoral de un varón caucásico de 65 años con adenocarcinoma ductal pancreático. Las células MIA PaCa-2 adherentes exhiben morfologías tanto redondas como fusiformes. Estas células son muy útiles para el estudio del comportamiento de células cancerosas, ya que se comportan de forma similar a las células cancerosas humanas (SASAKI *et al.*, 2020).

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

3 JUSTIFICATIVA

La planta de la *E. ingens* ha sido utilizada desde tiempos ancestrales como una medicina tradicional para curar diversas enfermedades, sin embargo, no sé evidencian estudios relacionados a su efecto cicatrizante. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es realizar una evaluación del efecto cicatrizante de la *E. ingens* en un modelo experimental in vitro, con el fin de obtener evidencia científica de sus beneficios medicinales. Esta investigación contribuirá a la ampliación del conocimiento científico sobre la utilización de plantas medicinales para la cicatrización de heridas. Además, permitirá el desarrollo de nuevas terapias para la curación de heridas basadas en el uso de plantas medicinales. Esto contribuirá a la mejora de la calidad de vida de las personas afectadas por heridas y lesiones.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

4 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los efectos del látex de la *E. ingens* sobre la proliferación celular de fibroblastos como modelo *in vitro* para cicatrización.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la citotoxicidad del látex *E. Ingens* en las líneas celulares Mia-Paca-2 y MRC-5.
- Evaluar la inducción de migración celular por el látex en la línea celular MRC-5.
- Evaluar la capacidad del látex de afectar el citoesqueleto del modelo celular MRC-5.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

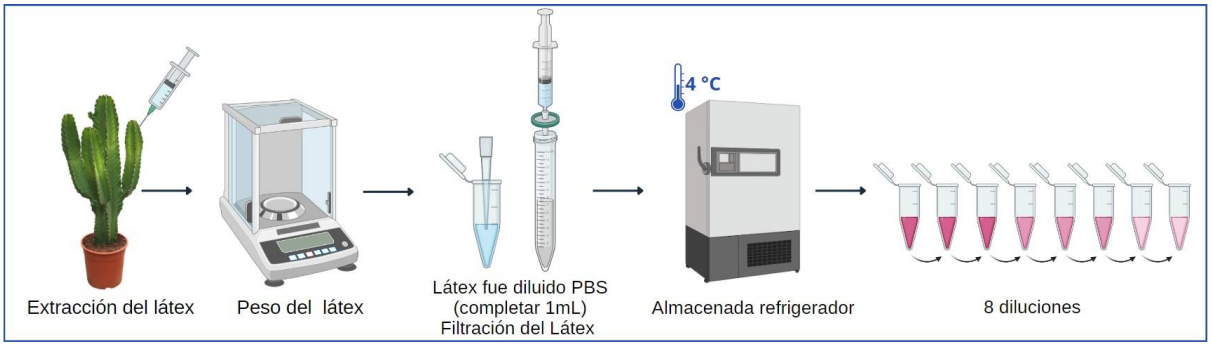
5 METODOLOGÍA

En esta sección se describe la metodología utilizada en el presente estudio. Las actividades de investigación se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología aplicada a la salud (Lab G004) en la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA) en el Campus Jardín Universitario.

5.1 OBTENCIÓN DEL LÁTEX

Para la obtención del látex de la *Euphorbia ingens* se siguió la metodología de (LUZ *et al.*, 2015), adaptada para este estudio. Primero, se recolectó el látex, directamente de los tallos, con el uso de una jeringa esteril. El látex se pesó con precisión, se disolvió con la solución de PBS y posteriormente fue filtrado para obtener una concentración de 1 mg/mL. La solución fue almacenada en el refrigerador a 4°C. Seguidamente se realizaron 8 diluciones a partir de esta concentración las cuales fueron 11,6; 5,8; 2,5; 1,45; 0,73; 0,36; 0,18 y 0,09 mg/mL para su uso en los experimentos posteriores (Figura 5).

Figura 5. Esquema ilustrativo de la obtención del látex *E. ingens.*



Fuente: Autoría propia. (Creado en BioRender.com)

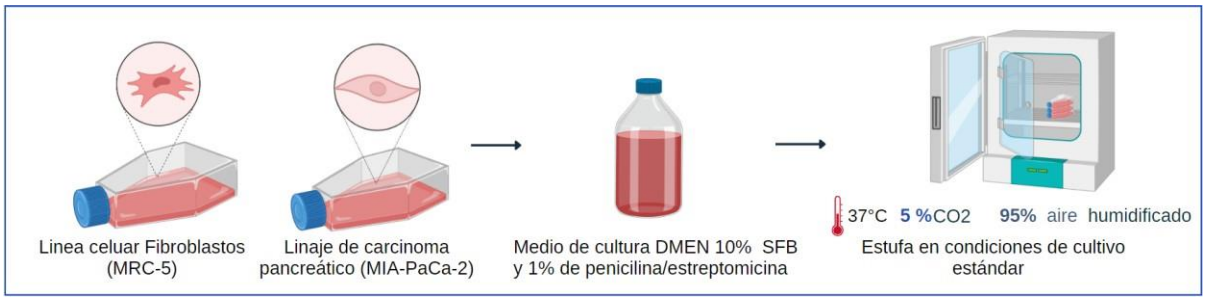
5.2 CULTIVO CELULAR

Se utilizo un linaje de carcinoma pancreático (MIA-PaCa-2, - ATCC CRL-1420) a como control con el fin de determinar si el látex es específico en la línea celular normal humana de tipo fibroblasto (MRC-5, - ATCC CCL-171). Estas células

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

fueron cultivadas en medio de cultura DMEN (M*inimal Essential Medium*), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL penicilina y 100 lg/mL de estreptomicina) para, posteriormente, ubicar el frasco en la estufa en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 5 % de CO2 y 95 % de aire humidificado). El crecimiento del cultivo se superviso a cada 3 días (Figura 6).

Figura 6. Esquema ilustrativo del cultivo celular.



Fuente: Autoría propia. (Creado en BioRender.com)

5.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Para medir la citotoxicidad se realizó el ensayo de MTT (bromuro de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). El látex del *E. ingens* se aplicó en el linaje celular del páncreas (Mia-Paca-2) y la línea celular de fibroblastos (MRC-5). Para verificar la viabilidad de las células se llevó a cabo el recuento celular para determinar su densidad por mililitro de medio. La ((MIA-PaCa-2), al igual que la (MRC-5), se llevó al flujo laminar y se descartó el medio, para, seguidamente, lavar dos veces con 3 ml de PBS por 3 min y por fin descartar el PBS. Después se adicionó 4 mL de tripsina y se dejó por 5 min en la estufa hasta que las células se despeguen del frasco, luego se colocó 5 mL de medio para suspender nuevamente. Posteriormente se trasladó todo a un tubo falcón de 15 mL, se centrífugo por 10 min a 1.200 rpm, luego se descartó el líquido y el precipitado se resuspendio en 1 mL de medio, esto se trasladó a un microtubo. En seguida con una pipeta se tomó 10 µL del microtubo y se lo mezcló con 10 µL de azul de tripán.

Este análisis se realizó con colorante azul de tripán usando la cámara de Neubauer, para así diferenciar de células viables, que no son permeables al colorante, de células no viables, que sufren acción del tinte, quedando azules. La

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

estimación del número total de celdas se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Nº total de células/mL} = \frac{\text{nº de células contadas x fator de diluição x } 10^4}{\text{nº de quadrantes contados}}$$

Después de realizar el ensayo de viabilidad celular, se realizó el sembrado de las células en placas de 96 pocillos con una concentración de $1x10^4$ células/pocillo y 50 µl de medio DMEM suplementado con 0,5% de FBS como se muestra en la Figura 7. 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 (11,6 mg/mL; 5,8 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,45 mg/mL; 0,73 mg/mL; 0,36 mg/mL; 0,18 mg/mL; 0,09 mg/mL). Cada concentración se realizó seis veces y fueron incubadas por 24 horas.

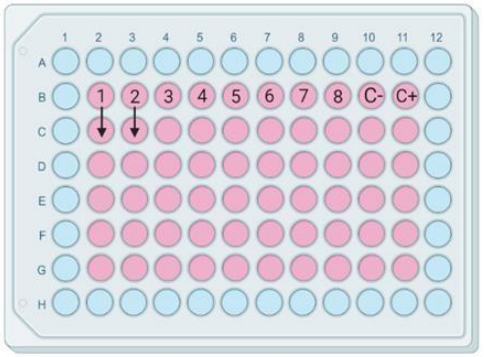
A las 24 horas, fueron adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) en cada pocillo con una incubación a 37°C y un tiempo de 4 horas. Al finalizar la incubación, se eliminó el medio con MTT y se agregó 100 µL de DMSO a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán mediante incubación durante 15 min a temperatura ambiente. El valor de absorbancia por pozo se determinó a través del espectrofotómetro en 492 nm y 630 nm (MOSMANN, 1983).

Los grupos de control, es decir, los pozos sin tratamiento se colocarán 50 µL de medio completo y el control positivo recibirá 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 serán considerados viables, para después hacer una curva de viabilidad celular en funciona a la concentración.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos en los ensayos MTT se usó para calcular el CI_{50} de las células tratadas, que expresaran citotoxicidad por la concentración de la muestra que indujo la inhibición celular en el 50% de las células. El IC_{50} se calculó a partir de una curva de regresión no lineal donde el eje X consistió en las concentraciones de tratamiento en una escala logarítmica y el eje Y los porcentajes de viabilidad celular (Figura 8).

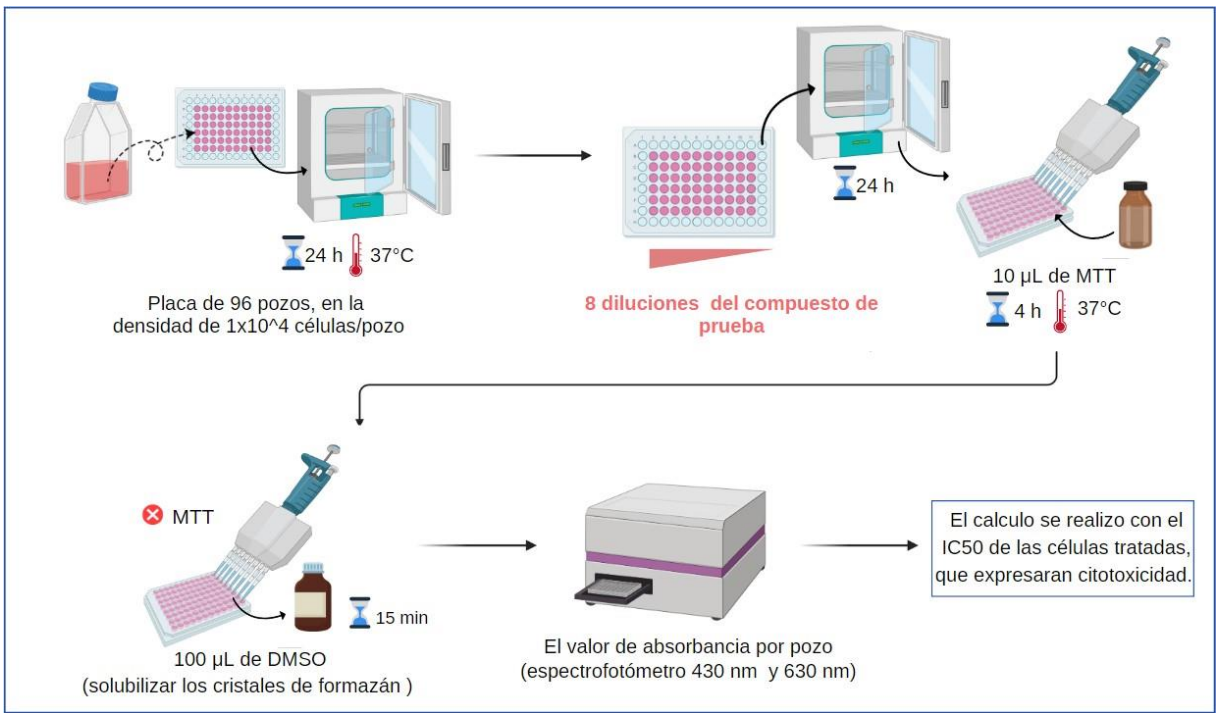
Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Figura 7. Esquema de la placa de 96 pocillos para el ensayo de MTT.



Esquema de la placa de 96 pozos. Los pozos que están enumerados del 1 al 8 son las diferentes concentraciones que fueron testadas iniciando con la mayor concentración y finalizando con la menor concentración, realizadas en sexta duplicada. El control negativo (C-) no se le adiciona el tratamiento. Ahora en el control positivo (C+) tendrá la presencia de DMSO 20%. Los pozos que están en color azul contienen PBS.

Figura 8. Esquema ilustrativo de ensayo de citotoxicidad.



Fuente: Autoría propia. (Creado en BioRender.com)

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

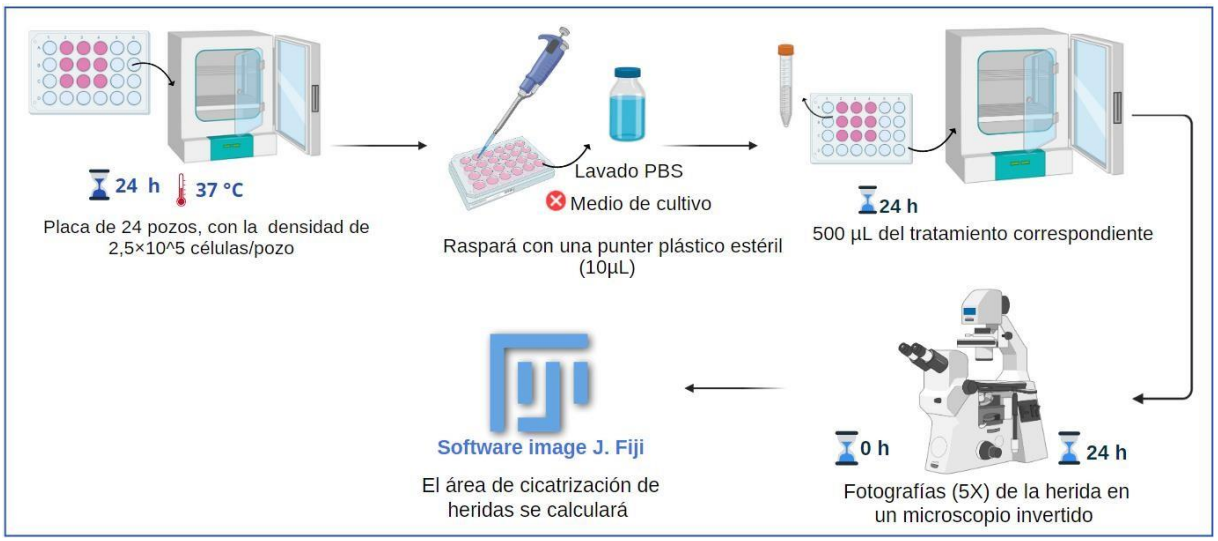
5.4 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN

Las células MRC-5 ($2{,}5\times10^5$ células) se cultivaron hasta la confluencia en una placa de 24 pocillos, colocadas en un medio conteniendo 1% de SFB durante 24h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO2. Al llegar a la confluencia, la capa celular se raspó con una puntera de plástico estéril de 10 µL en línea recta y una única vez. Posteriormente se retiró el medio de cultivo para luego lavar dos veces con PBS para retirar los restos celulares. Inmediatamente después se aplicaron 500 µL del tratamiento correspondiente usado dos concentraciones seleccionadas de 11,6 mg/mL y 5,8 mg/mL debido a que tienen una media de viabilidad celular más alta en comparación con el control. Inmediatamente se tomaron fotografías (5X) de la herida en un microscopio invertido (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA) al tiempo 0 h y posteriormente de 24 h se tomó fotos de la herida (LIANG *et al.*, 2007).

La migración MRC-5 se registró mediante un sistema de microscopio invertido Nikon (Nikon Instrument, Japón). El área de cicatrización de heridas se calculará utilizando el software image J. Fiji (Figura 9) y posteriormente se calculará la reducción del área inducida por medio de la siguiente ecuación:

$$Disminución\ del\ area\ \% = \frac{Medida\ en\ tiempo\ 0\ h - Medida\ en\ tiempo\ de\ 24\ h}{Mediida\ en\ tiempo\ 0\ h} \times 100$$

Figura 9. Esquema ilustrativo del ensayo de cicatrización.



Fuente: Autoría própia. (Creado en BioRender.com)

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

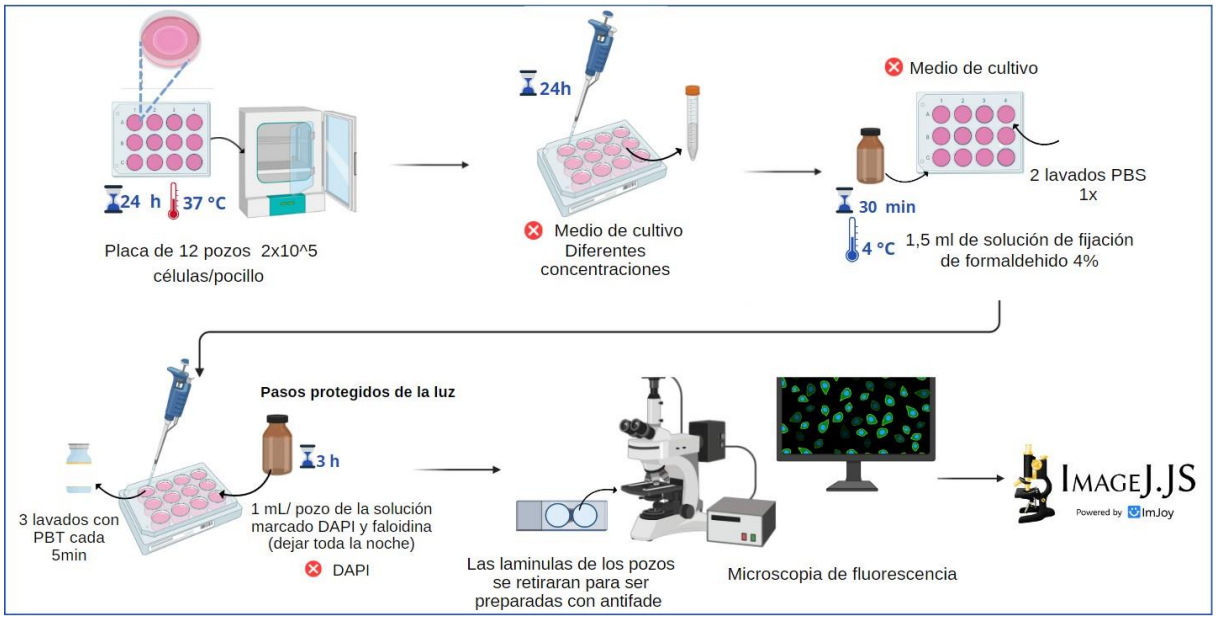
5.5 MORFOMETRIA POR IMUNOFLUORESCENCIA

Para determinar posibles alteraciones en la morfología de línea celular (MRC-5) se evalúo el látex frente a las células. Las células (MRC-5) fueron plaqueadas en una concentración de $2x10^5$ células por pocillo em una placa de 12 pocillos (12-well Cell Culture Plate, Biofil®) conteniendo lamina que se cultivó por un tiempo de 24 horas a 37 °C. Después el medio de cultivo se removió y las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del látex. Se seleccionaron las concentraciones de 11,6 mg/mL y 5,8 mg/mL. Para después de 24 horas, el medio fue remido nuevamente y las células fueron fijadas con 1,5 mL de solución de fijación de formaldehido 4%, por un tiempo de 40 min, luego se retira la solución de fijador y enseguida se adiciono Tritón X-100 en PBS este paso se repitió tres veces con el objetivo de realizar un lavado cada 5 min.

Los siguientes pasos fueron realizados bajo la protección de la luz fuerte. Posteriormente las células fueron marcadas con 1 mL por pocillo de la solución marcado DAPI (4´,6-diamidino-2-phenylindole), donde se dejó en la nevera a una temperatura de 4°C toda la noche. Al día siguiente se retiró el DAPI y se lavó con una solución de lavado (PBT) tres veces por pocillo cada 5 min, la solución se removió y se adicionó PBS para el enjuague de los pocillos. Y por fin se observó en la microscopia de fluorescencia por medio de las láminas y cubre objetos. Las imágenes serán tratadas a través del software ImagenJ.JS (Figura 10).

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Figura 10. Esquema ilustrativo de la morfología de apoptosis por tinción



Fuente: Autoría propia. (Creado en BioRender.com)

5.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos de viabilidad celular obtenidos a través del ensayo MTT se normalizaron mediante una regresión no lineal y el IC50 se determinó con la ayuda del programa *GraphPad Prism 8*.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

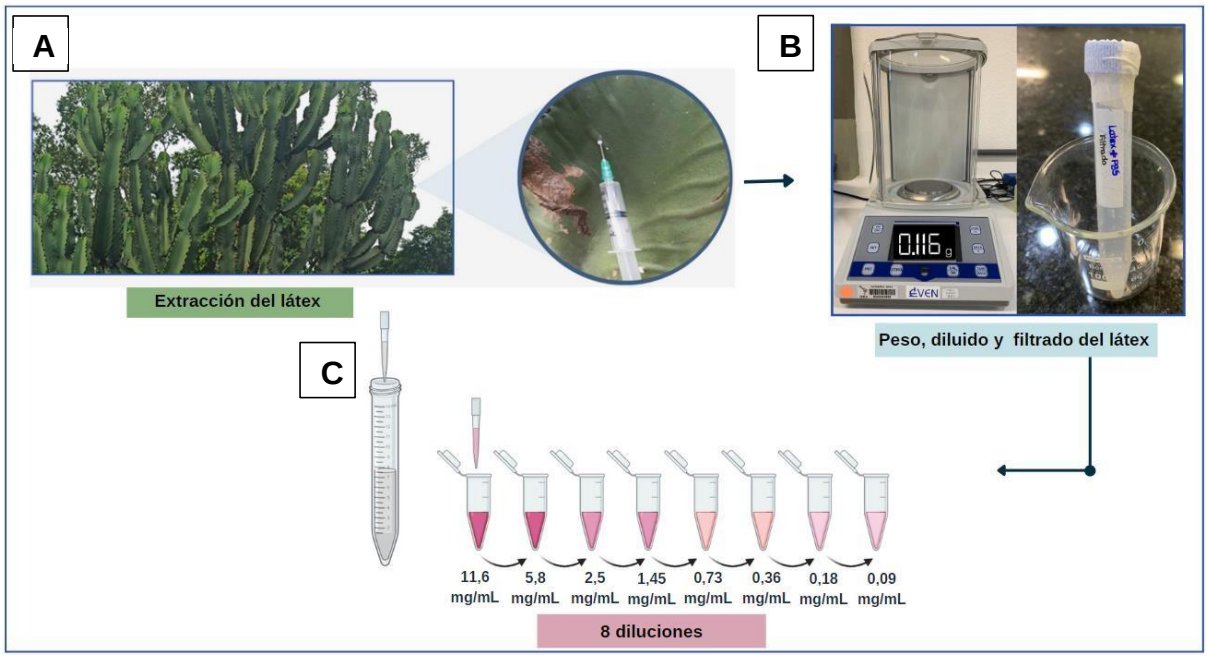
6 RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DEL LÁTEX DE *Euphorbia Ingens*

El látex utilizado para los testes fue recolectado en el interior del estado de Paraná (municipio de Foz de Iguazú, latitud - 25.55158 y longitud - 54.57163). Para la obtención del látex fue usada una jeringa estéril descartable, la cual se introdujo en los tallos de la planta *E. ingens*, recolectando así un peso total de 0,116 g de látex (Figura 11).

A continuación, con el uso de microtubos, el látex fue diluido con PBS hasta completar un volumen de 1mL, tal que, se consiguió una concentración inicial de 0,116 g/mL. Una vez obtenida esta solución, esta fue filtrada para evitar contaminación que afectara los resultados. La solución se refrigero a -20ºC hasta el momento de su uso. Posteriormente, se realizaron diluciones en medio de cultivo para la obtención de las concentraciones del estudio 11,6; 5,8; 2,5; 1,45; 0,73; 0,36; 0,18 y 0,09 mg/mL.

Figura 11. Foto del método de recolección látex de *E. ingens*.



Procedimiento de la obtención del látex y sus concentraciones. A. Extracción del látex por medio de una jeringa estéril. B. El peso del látex para luego ser diluido con PBS y luego fue filtrado. C. Las 8 diluciones realizadas a partir de la primera concentración.

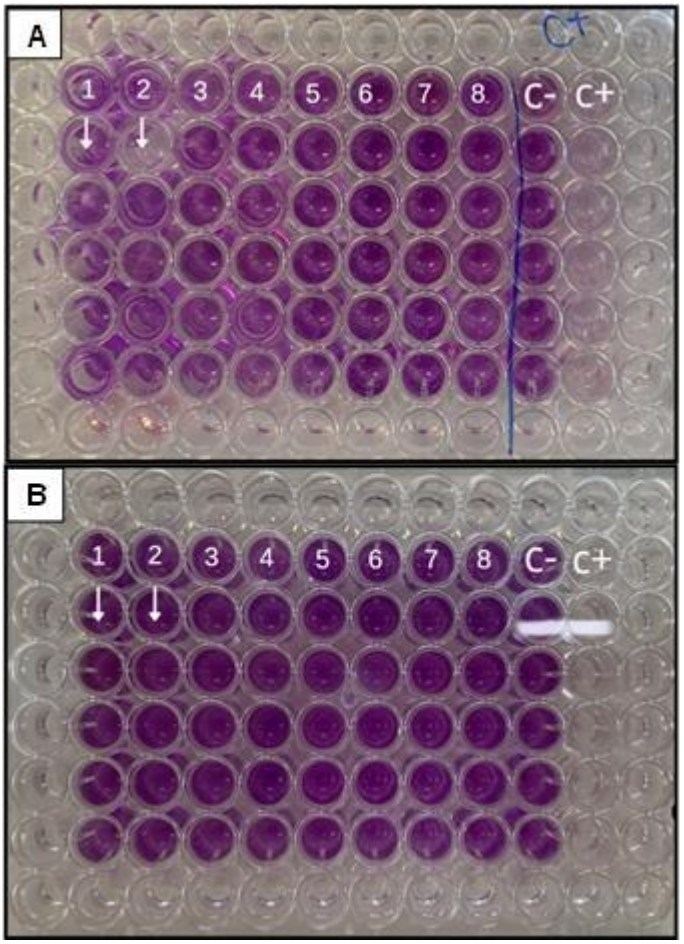
Fuente: Autoría propia

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

6.2 EVALUACIÓN DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR ENSAYO DE MTT

En el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad de látex de *E. ingens* en dos líneas celulares tanto la Mia-Paca-2 como la MRC-5. Esto se realizó a partir de diferentes concentraciones (entre 11,6 y 0,09 mg/mL). La actividad citotóxica del látex fue evaluada por el ensayo MTT ya que permite la cuantificación de la viabilidad y proliferación celular mediante un rápido análisis colorimétrico, basado en la reducción de sal de tetrazolio amarillo (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) a un cristal insoluble de coloración púrpura (formazan), como se observa en la Figura 12. Esta reacción de reducción ocurre en células viables con metabolismo activo.

Figura 12. Microplaca de 96 pozos utilizada para evaluar la viabilidad celular (A). Mia Paca-2. (B). MRC-5.



La Figura 12 presenta la microplaca utilizada para evaluar la viabilidad celular de la A. Mia-Paca-2 y B. fibroblasto MRC-5, mediante la prueba MTT, después de la exposición de las diferentes concentraciones del látex de la *E. ingens* durante 24 h. Las concentraciones se aplicaron en orden

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

decreciente, de mayor a menor concentración. Las dos últimas columnas fueron seleccionadas para la aplicación de los controles negativos (Sin tratamiento) y positivos (Adición de DMSO 20%).

De esta manera, la viabilidad celular fue determinada por la intensidad de coloración purpura que es proporcional a la cantidad de cristales de formazan formados. La intensidad del color purpura fue estimada a partir de las lecturas de los resultados obtenidos por el espectrofotómetro y, a partir de estos, fue calculada la viabilidad celular para luego calcular la media como se muestra en la Tabla 3. Los resultados para las dos líneas celulares indican que la media de los 6 valores obtenidos por el espectrofotómetro para cada una de las concentraciones fue mayor a media que las concentraciones aumentaba, en comparación de la de control negativo (Sin tratamiento). Sin embargo, se observa que la desviación estándar obtenida en la línea celular de Mia-Paca-2 es alta, lo que indica que los resultados obtenidos por separado estaban dispersos en un amplio espectro de valores (Figura 13).

Tabla 3. Valores de la viabilidad celular.

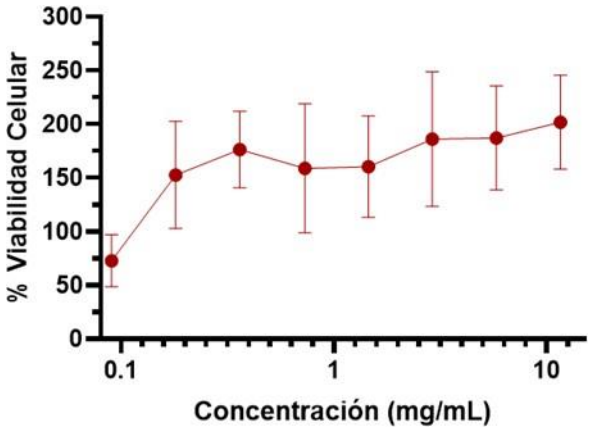
Concentraciones (mg/mL)	**Mia Paca-2**		**MRC-5**	
	Media	**Desvió estándar**	**Media**	**Desvió estándar**
11,6	**201,79**	43,76	**120,37**	19,88
5,80	187,00	**90,43**	101,63	5,20
2,90	186,10	62,77	93,36	5,66
1,45	160,31	47,32	89,52	10,19
0,73	158,74	60,32	94,64	16,36
0,36	176,23	35,73	92,20	11,28
0,18	152,69	50,05	87,54	11,57
0,09	72,87	24,33	89,64	3,58
C- (Sin el tratamiento)	**100,00**	28,05	**100,00**	3,61

Las líneas celulares cuando sometidas al tratamiento del látex presentaron una diferencia significativa, en lo que se refiere a viabilidad celular, en comparación al grupo de control como se observa en la Figura 14 y 15, en donde a

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

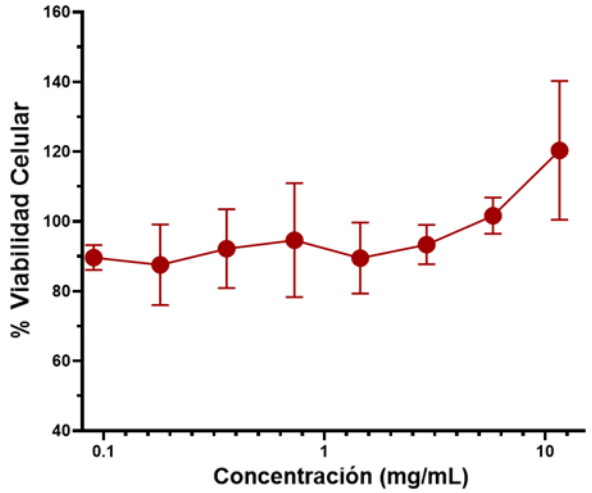
medida que la concentración de látex de *E. ingens* aumenta, la viabilidad celular de las dos líneas celulares también aumenta, es decir, que a mayor concentración hay una mayor viabilidad celular.

Figura 13. Análisis de viabilidad celular por la prueba de MTT en la línea celular Mia-Paca 2.



Nota. Efecto citotóxico del látex de *E. ingens* en las células de Mia-Paca-2 evaluado mediante ensayo MTT. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de los grupos experimentales con las concentraciones realizadas en sextuplicados, utilizando el ensayo colorimétrico del MTT.

Figura 14. Análisis de viabilidad celular por la prueba de MTT en la línea celular MRC-5.



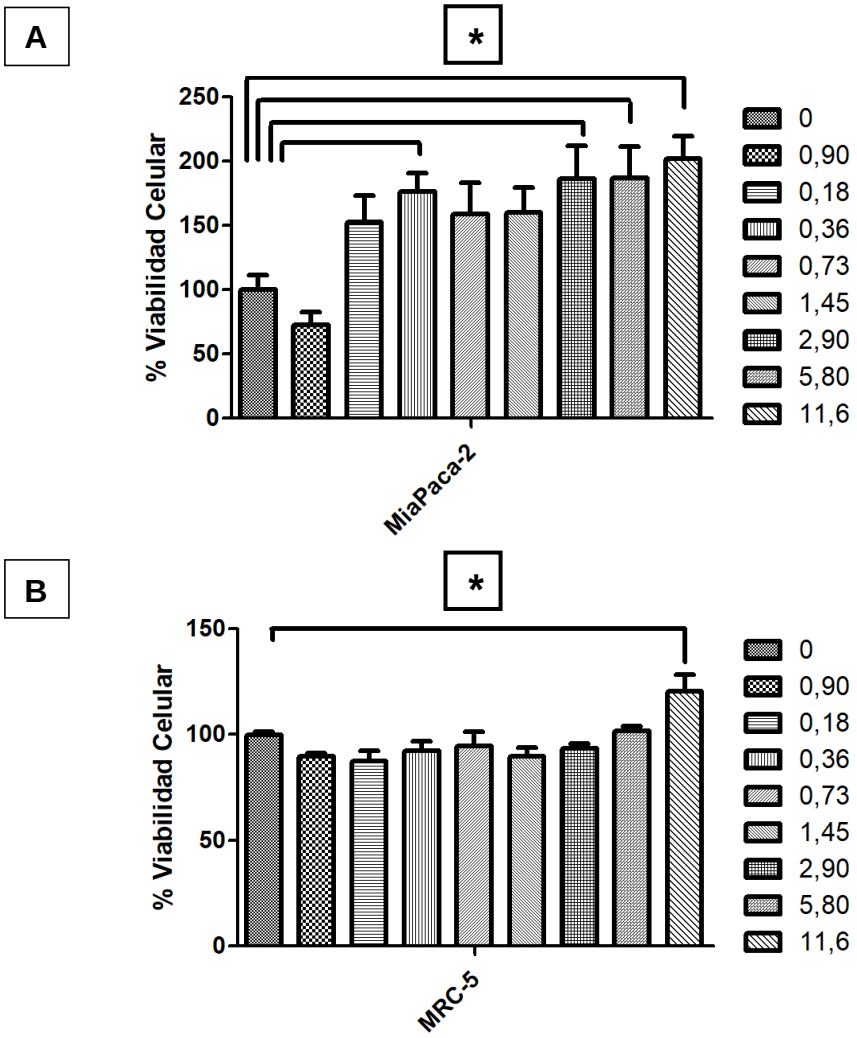
Nota. Efecto citotóxico del látex de *E. ingens* en las células de MRC-5 evaluado mediante ensayo MTT. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de los grupos experimentales con las concentraciones realizadas en sextuplicados, utilizando el ensayo colorimétrico del MTT.

Ya que se obtuvo una curva de viabilidad, se puede afirmar que el látex no presentaba una capacidad citotóxica y no fue posible establecer un valor de IC_{50} entre las concentraciones administradas. En función de los resultados de viabilidad celular, se eligieron dos concentraciones 11,6 y 5,8 mg/mL, que de ahora

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

en adelante se denominaran C1 y C2, para el ensayo de cicatrización. La razón para elegir estas dos concentraciones para el ensayo de cicatrización fue que, estas concentraciones, tienen una media de viabilidad celular más alta en comparación con el control.

Figura 15. Análisis estadístico del ensayo de MTT.



Ensayo de MTT a las 24 h de incubación celular en presencia del látex con sus diferentes concentraciones. A). MIA PaCa-2 Si existe una diferencia significativa con respecto al (control-) para las concentraciones (11,6, 5,80, 2,90 y 0,36 mg/mL) *($p<0,05$) B) MRC-5. No existen diferencias significativas, con respecto al control – excepto con la concentración 11,6 mg/mL *($p<0,05$).

6.3 ENSAYO DE CICATRIZACIÓN

Como se mencionó anteriormente, los fibroblastos juegan un papel

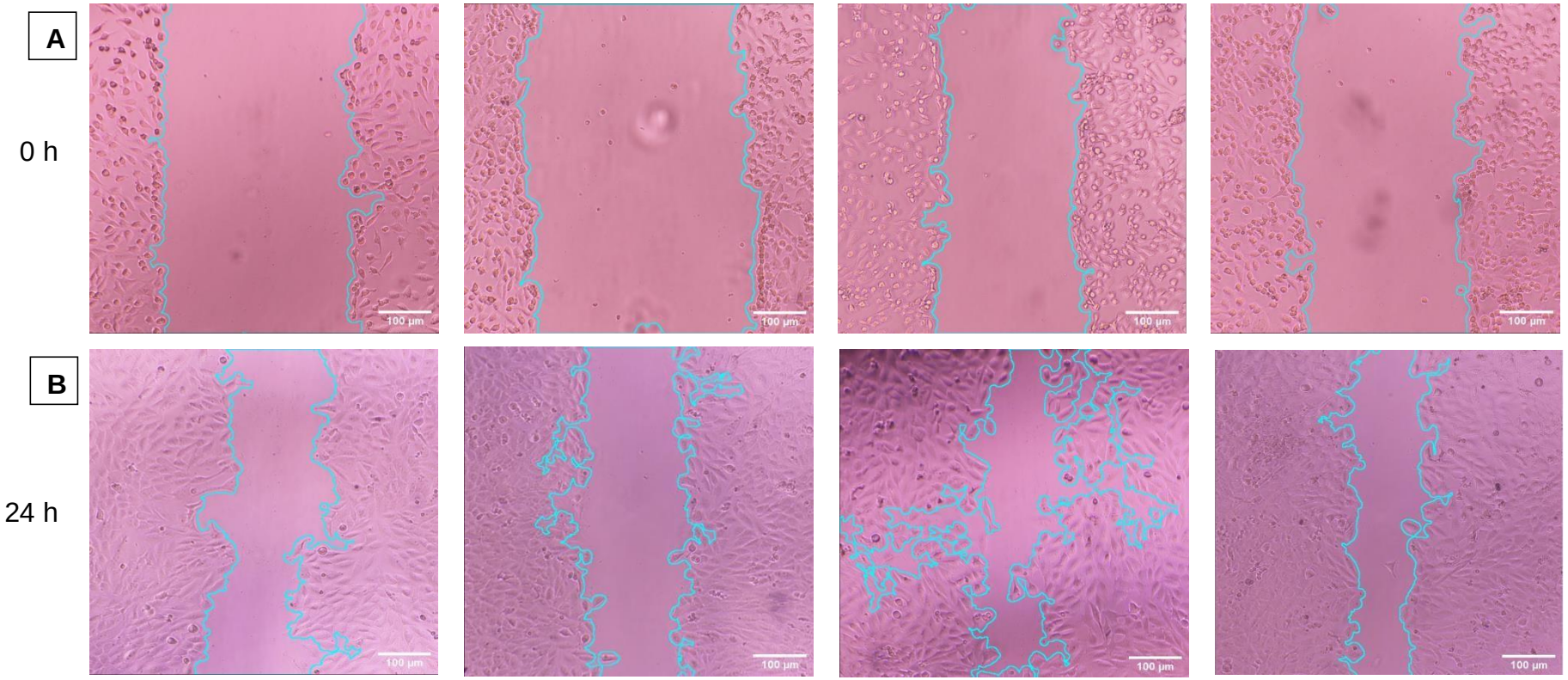
Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

importante en la actividad de reparación de heridas, es por ello por lo que se realizó un ensayo de herida para observar el proceso de cicatrización de la muestra de prueba con las concentraciones de látex seleccionadas anteriormente (11,6 y 5,8 mg/mL).

Tras 24 horas de exposición a la muestra de ensayo, se observó que las células migran hacia el espacio provisional inducido como se muestra en la Figura 16, 17 y 18, y cuyas áreas se registran en la tabla 4.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

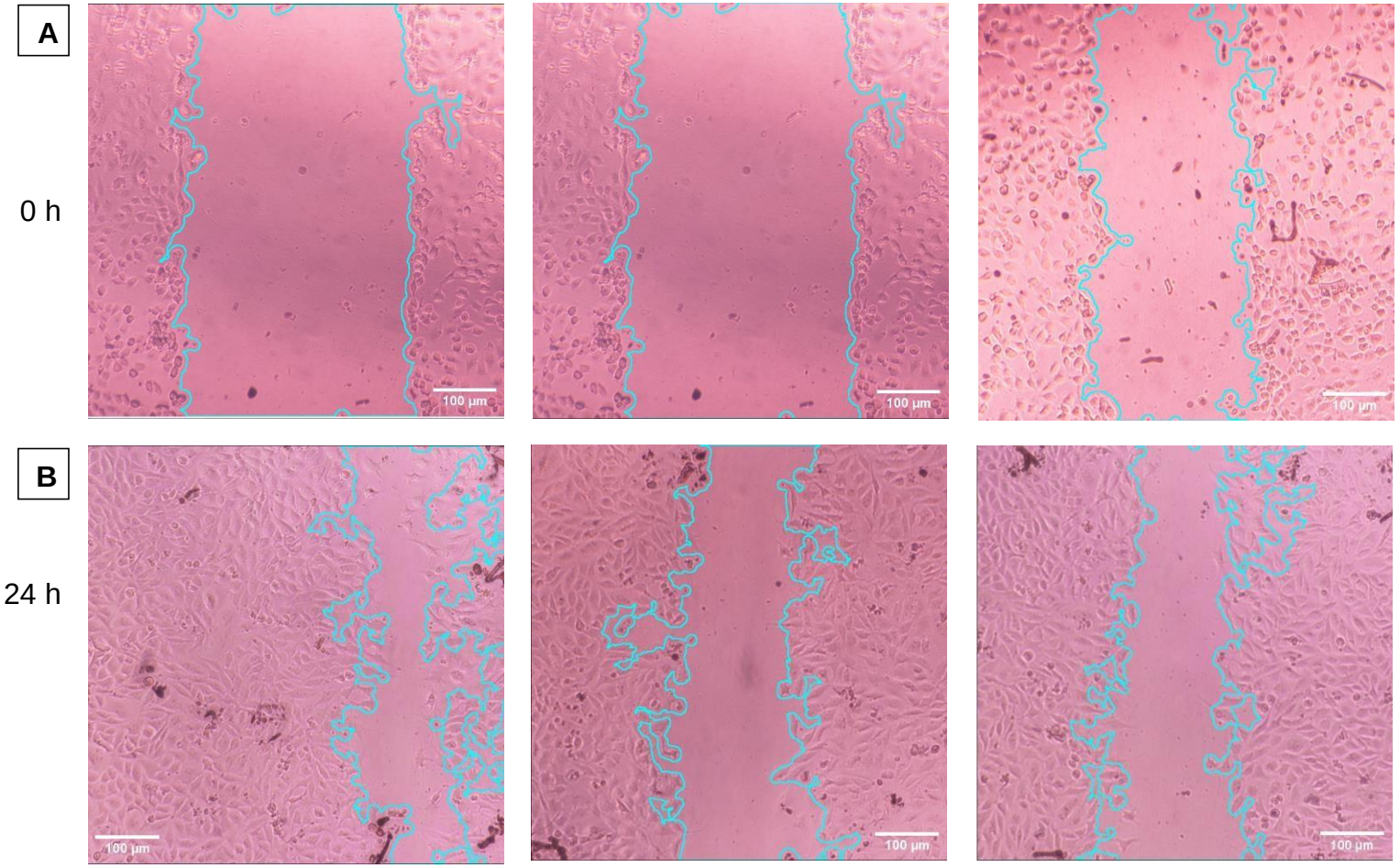
Figura 16. Imágenes de microscópicas que representan la curación de herida in vitro de las células MRC-5 sin tratamiento (C-).



Nota: Fotografías de las células de control – (sin tratamiento). El grupo A corresponden cuatro repeticiones en tiempo 0 y el grupo B corresponden cuatro repeticiones pasadas las 24. horas

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

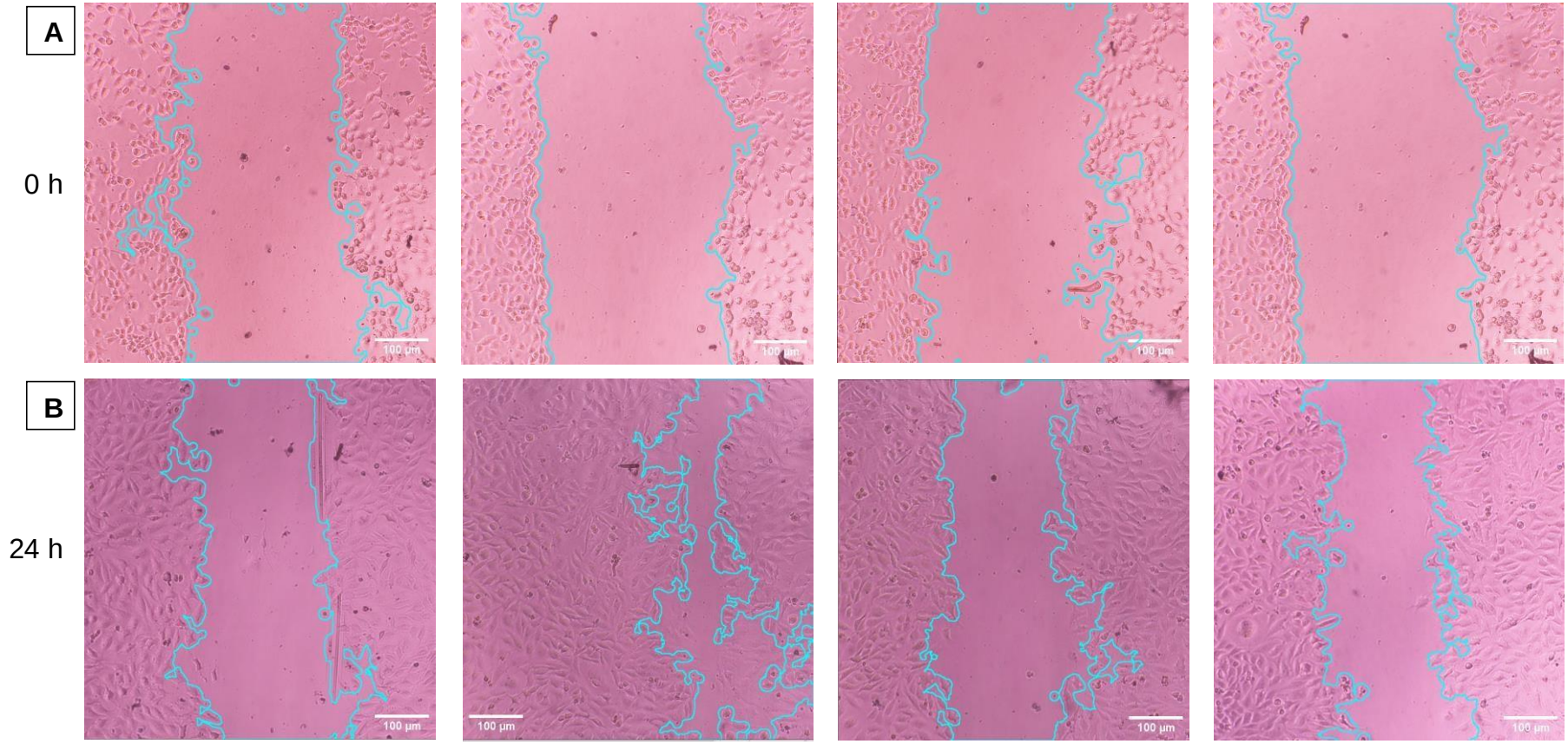
Figura 17. Imágenes de microscópicas que representan la curación de herida in vitro de las células MRC-5 con la presencia de C1.



Nota: Fotografías de las células con la presencia de C1. El grupo A corresponden tres repeticiones en tiempo 0 y el grupo B corresponden tres repeticiones pasadas las 24. horas

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Figura 18. Imágenes de microscópicas que representan la curación de herida in vitro de las células MRC-5 con la presencia de C2.



Nota: Fotografías de las células con la presencia de C2. El grupo A corresponden cuatro repeticiones en tiempo 0 y el grupo B corresponden cuatro repeticiones pasadas las 24. horas

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Tabla 4. Áreas del ensayo de cicatrización.

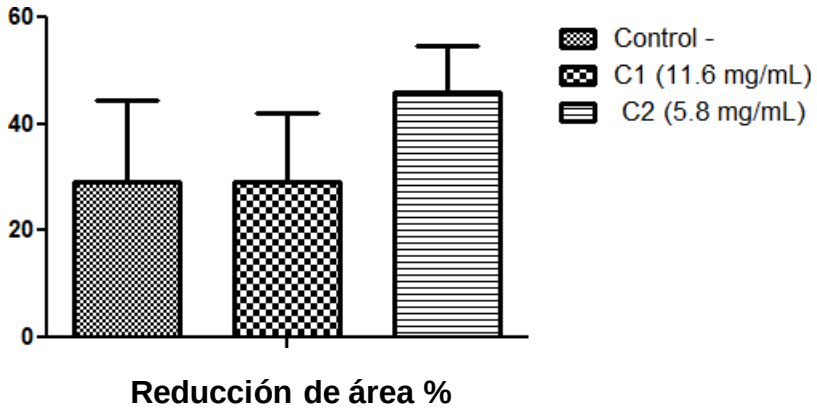
Grupo	Área (mm2) 0h	Área (mm2) 24h	Reducción Área %
Control negativo	0.2297	0.1499	34.8%
	0.2613	0.1239	52.6%
	0.1629	0.1627	0.1%
	0.1969	0.0952	51.6%
Media			**34,77%**
C1 (11,6 mg/mL)	0.1309	0.1004	23.3%
	0.2711	0.1252	53.8%
	0.1550	0.1396	9.9%
Media			**29%**
C2 (5,8 mg/mL)	0.2127	0.1439	32.4%
	0.2281	0.0851	62.7%
	0.2222	0.1464	34.1%
	0.2285	0.1320	42.2%
Media			**42,85%**

De la tabla 4 se puede inferir que en general la reducción del área del espacio inducido fue mayor para el grupo C2, consiguiendo reducciones de hasta el 42,85%, incluso superior a C1, lo que se traduce en una reducción del efecto cicatrizante a medida que la concentración supera los 5,8 mg/mL. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico Figura 19 se observa que no hay una diferencia significativa por tanto no hay una reducción de área en comparación al grupo de (control –).

El grupo de control indica la tasa natural de migración de células, sin la influencia del látex de la *E. ingens*. Al realizar un análisis estadístico comparativo de las medias del área del espacio inducido entre el tiempo cero y pasadas las 24 horas de los grupos del ensayo de cicatrización y el grupo de control -, se observó que no hubo una diferencia significativa Figura 20.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Figura 19. Análisis estadístico ensayo de cicatrización.



Media porcentual de la reducción de área de la migración celular de la línea MRC-5 después del tratamiento con le látex de la *E. ingens* en comparación con el (control -).

6.4 ANALISIS DE LA MORFOLOGIA CELULAR

Con el objetivo de evaluar el estado de la morfología de las células MRC-5 de los grupos tratados con el látex de la *E. ingens,* concentraciones C1 y C2 (C1: 11,6 mg/mL y C2: 5,8 mg/mL), se realizó un análisis a través de la marcación con fluoróforos específicos, DAPI y faloidina, que permitieron la distinción del núcleo y los filamentos de actina, respectivamente.

Al evaluar la morfología de las células MRC-5 de control negativo (C-), en la Figura 20 se puede apreciar que las células no presentaron alteración alguna en su morfología, pareciendo intacta y bien definida, al igual que los tratamientos previamente ya analizados. Además, se puede notar que las células sufrieron divisiones celulares, ya que se observó células multinucleadas. También se pudo apreciar la desorganización en el citoesqueleto, con la disminución del número de filamentos de actina.

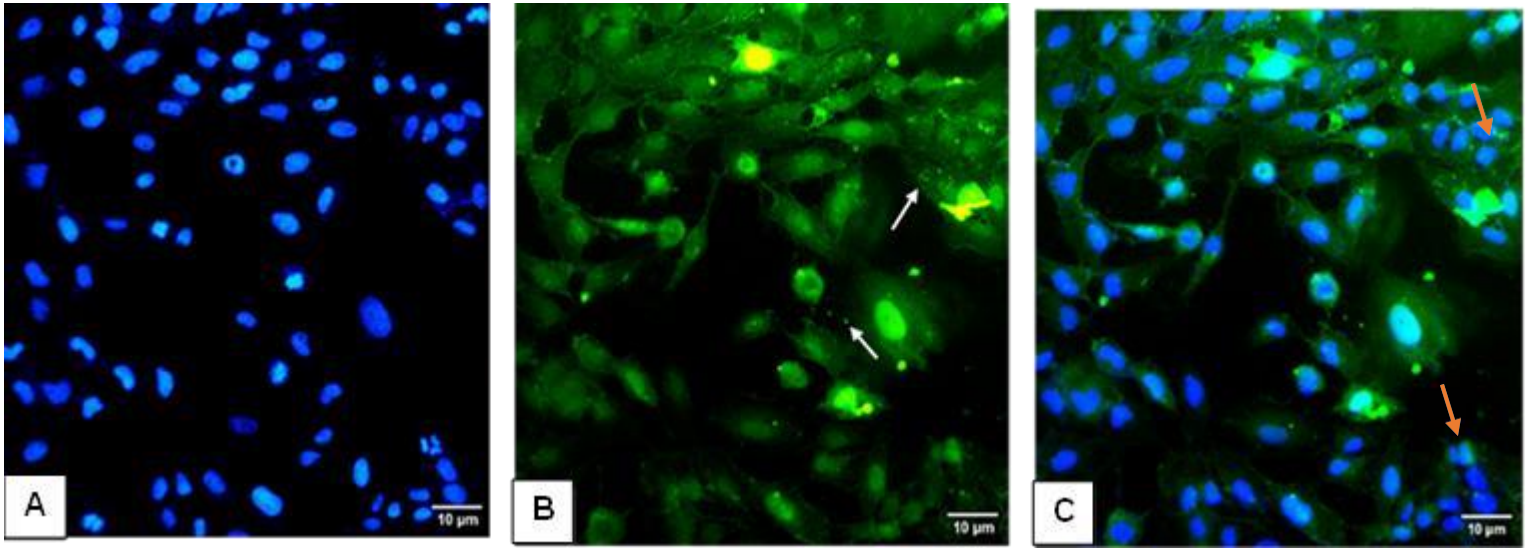
Tales grupos fueron analizados por su potencial de aumentar la viabilidad celular como es observado en los resultados del ensayo de cicatrización. Sabiendo que el DAPI es un marcador de viabilidad nuclear ya que se une a la cadena doble de DNA fue posible apreciar la estructura nuclear y estudiar el tamaño, morfología e integridad nuclear. Como se observa en la Figura 21 y 22 se demuestra

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

que el látex de *E. ingens* no altero el citoesqueleto de las células (MRC-5) de los grupos C1 y C2, es decir, que su núcleo se encuentra bien definidos, con formato ovoide de células multinucleadas. Sin embargo, se pudo observar la formación de gránulos en el citoplasma de ambos grupos. A pesar de esto, no se notó ningún efecto de citotoxicidad, ya que no hubo daños en la integridad celular.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

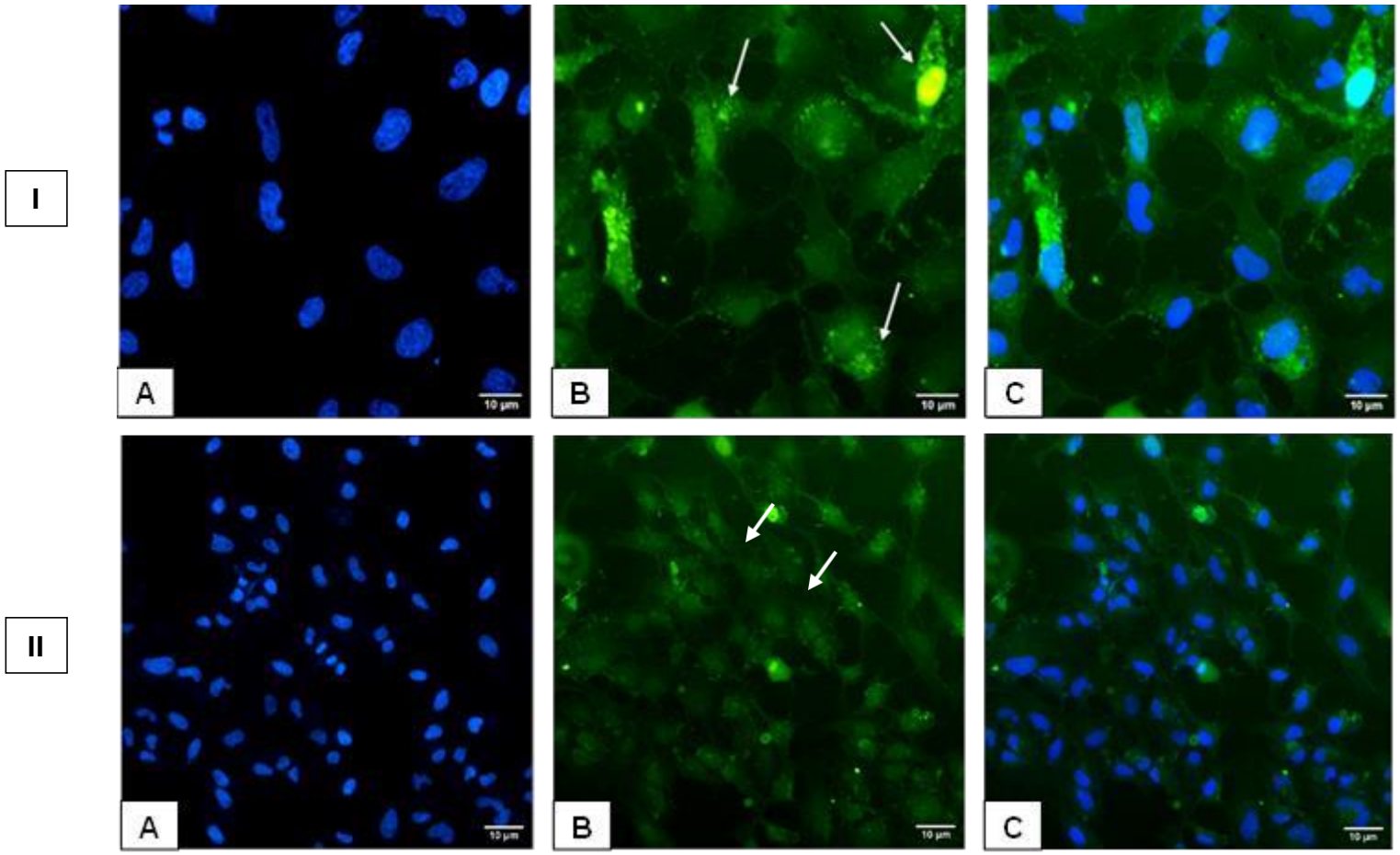
Figura 20. Análisis por microscopía de fluorescencia en de células MRC-5 sin tratamiento (C-).



Nota: Las células fueron acordonadas con DAPI (A), para el marcado nuclear (azul), y faloidina (B), para marcar las fibras de actina (verde). Imágenes superpuestas (C). Las flechas blancas apuntan la presencia de gránulos en el citoplasma de las células MRC-5 y las flechas naranjas apuntan al proceso de división celular 5 y las flechas naranjas apuntan a células en proceso de división celular. Imágenes capturadas con lente de 40x.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

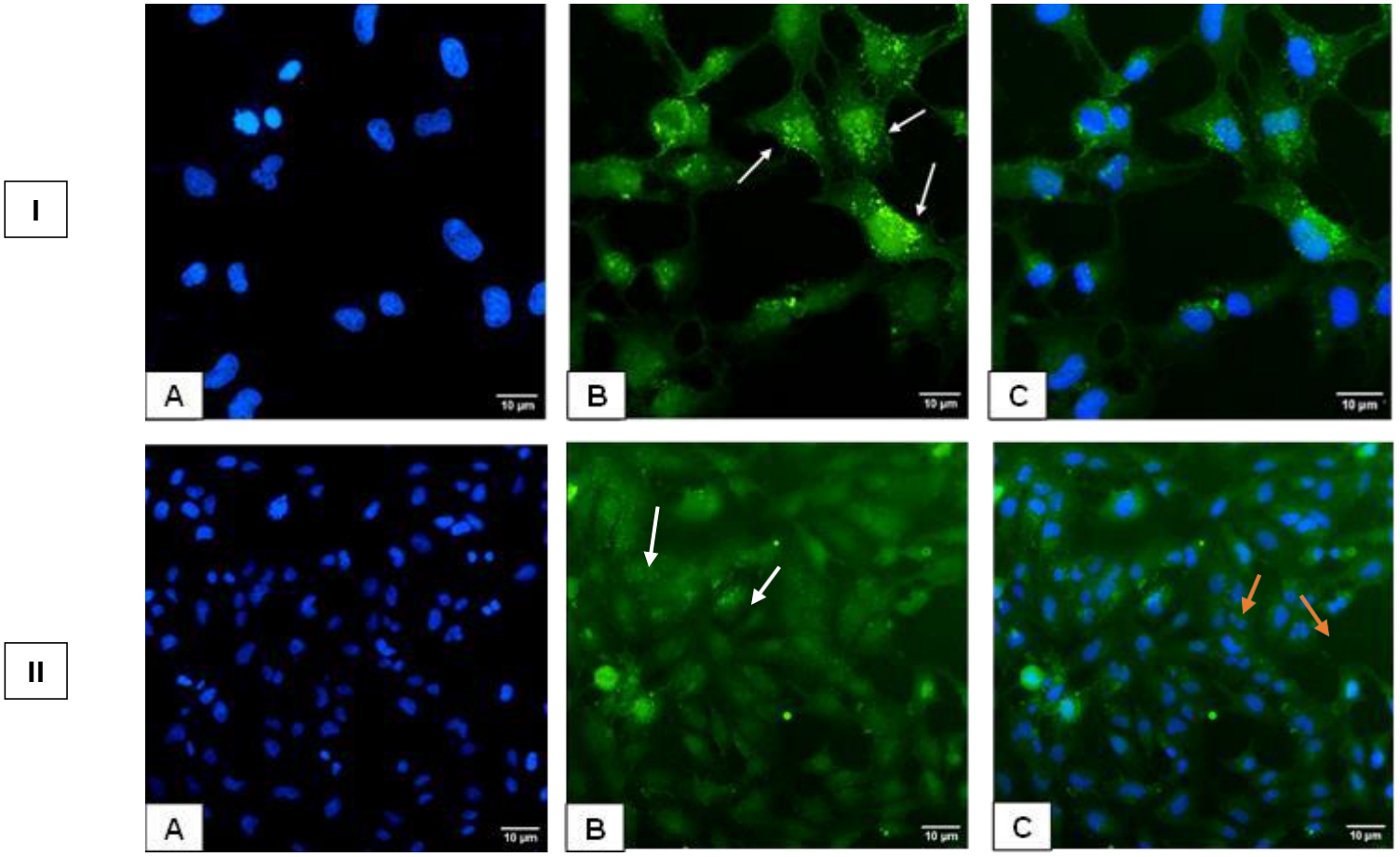
Figura 21. Morfología celular de las células MRC-5 del grupo C1 (11,6 mg/mL) evaluadas por la microscopia de fluorescencia.



Nota: Morfología celular y nuclear evaluadas por microscopía de fluorescencia. El citoplasma celular fue identificado con el núcleo, con DAPI (A) y la tinción de faloidina (B) y C muestran imágenes superpuestas. Las flechas blancas apuntan la presencia de gránulos en el citoplasma de las células MRC-5. Las flechas blancas apuntan la presencia de gránulos en el citoplasma de las células MRC-5. Imágenes capturadas con lente I. 4x y II 10x.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Figura 22. Morfología celular de las células MRC-5 del grupo C2 (5,8 mg/mL) evaluadas por la microscopia de fluorescencia.



Nota: Morfología celular y nuclear evaluadas por microscopía de fluorescencia. El citoplasma celular fue identificado con el núcleo, con DAPI (A) y la tinción de faloidina (B) y C muestran imágenes superpuestas. Las flechas blancas apuntan la presencia de gránulos en el citoplasma de las células MRC-5 y las flechas naranjas apuntan a células en proceso de división celular. Imágenes capturadas con lente I. 4x y II 10x.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

7 DISCUSIÓN

Las plantas medicinales son un recurso importante para el tratamiento de diversas enfermedades, incluida la cicatrización de heridas, puesto que contienen diferentes principios activos que pueden acelerar el proceso de cicatrización de las heridas, como lo han señalado diversos estudios (GIVOL *et al.*, 2019; MAVER *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2020). Los extractos o partes de plantas con estas propiedades son generalmente incorporados en cremas, pomadas y geles con el fin de favorecer la cicatrización de heridas (ARAÚJO *et al.*, 2022; GIVOL *et al.*, 2019; LING *et al.*, 2021; SUSANTO *et al.*, 2019). *E. ingens* es una planta medicinal conocida por sus propiedades anticancerígenas y anti-VIH, que se ha utilizado tradicionalmente en Sudáfrica para tratar enfermedades como ulceras y tumores (DOUGLAS, 2004). A pesar de esto, no se evidenciaron estudios que evalúen el efecto cicatrizante de esta planta.

Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto cicatrizante del látex de la planta *E. ingens*, para lo cual primero se realizó la evaluación de la citotoxicidad del látex sobre dos líneas celulares Mia Paca-2, células cancerosas que sirvieron como control con el objetivo de saber si el látex podría causar un efecto secundario a personas que sufren de cáncer, y las células de fibroblastos MRC-5, que como se menciona antes son esenciales en proceso de cicatrización motivo por el cual se considera es un excelente modelo para evaluar la cicatrización de heridas.

Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad demostraron que el látex aumenta la viabilidad de las células cancerosas Mia Paca-2 en las concentraciones C1 y C2, y para las células de fibroblastos MRC-5 únicamente en la C1. Este resultado demostró que no hubo una diferencia significativa en la disminución del tamaño de la herida en relación con el grupo control solo se pudo observar una tendencia de migración celular. A demás, en los resultados de los ensayos de cicatrización se mostro que no se evidenciaron diferencias significativas en la línea celular MRC-5 respecto al control (-).

Estos resultados coinciden con los hallazgos de otras investigaciones con células cancerígenas, que demuestran que el látex *E. ingens* además de ser toxica es promotora de tumores, ya que, contiene ésteres de una variedad de

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

alcoholes diterpénicos. Algunos de estos responsables de la actividad irritante y posiblemente también de la actividad cocarcinogénica del látex. Entre los compuestos irritantes están el I1, I5 y I6 y los compuestos no irritantes están el I2 y I4 (OPFERKUCH; HECKER, 1974).

En estudios posteriores se aislaron los principios activos del látex de *E. ingens* donde se confirma que los factores I1, I5 e I6 de Euphorbia aislados son ésteres de diterpenos del tipo ingenano. El factor I1 exhibe actividades irritantes y promotoras moderadas, I6 son activos como irritantes y tumorales y el I5 es muy irritante pero un promotor más débil que I1 (OPFERKUCH; HECKER, 1982). Conforme esto, podría decirse que el látex de la *E. ingens* usada como método cicatrizante no sería ideal para personas que padecen cáncer, ya que, es evidente que es un promotor tumoral. Entre tanto, no se hallaron estudios recientes sobre los principios activos de la *E. ingens* que permitan relacionarlos con la actividad cicatrizante hallada en este estudio.

Los resultados del presentes estudio también contrastan con los obtenidos en el ensayo de toxicidad con la planta del mismo género, la *Euphorbia tirucalli,* en donde se demostró que el eugenol presente en la sabia de esta planta inhibe la migración celular de la línea cancerosa Mia Paca-2 (SILVA *et al.*, 2018).

La cicatrización de heridas es un mecanismo complejo y que implican el control de la inflamación, la proliferación y la remodelación de nuevos tejidos. Entre estos procesos, la inflamación es el primer paso en la respuesta de curación después de una lesión tisular (GUARÍN *et al.*, 2013). Además, la proliferación y migración celular son respuestas esenciales para la re-epitelización y la remodelación de la piel durante el proceso de curación. Los resultados de este trabajo no mostraron una mejora en la proliferación de células MRC-5 (Figura 4) y migración (Figura 5 y Figura 6) inducida por el látex de *E. ingens,* sin embargo, la falta de información sobre el contenido del látex también puede considerarse un obstáculo en los estudios realizados.

Idealmente, un tratamiento seguro para la cicatrización de heridas debería considerar un agente terapéutico que mejore la formación de tejido nuevo sin producir ningún efecto secundario perjudicial. Para comprender mejor las propiedades del látex, sería necesario identificar las moléculas presentes, a través de técnicas analíticas, como la cromatografía. Así, sería posible indicar la presencia o no

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

de compuestos con propiedades conocidas para ser utilizados en futuros estudios.

El análisis de la morfología celular mostró que el látex de *E. ingens* no presentó un efecto citotóxico en las células MRC-5, ya que el núcleo se mantuvo bien definido y con formato ovoide. Esto es importante ya que sugiere que las concentraciones testadas es decir la sustancia activa de la planta no daña la integridad celular. Además, se pudo observar la formación de gránulos en el citoplasma de ambos grupos (Figura 21 IB y 22 IB). Esto podría indicar que el látex de *E. ingens* puede tener un efecto en el metabolismo celular, aunque aún no se conoce la causa exacta de este efecto. Por otra parte, en el control negativo se observaron células multinucleadas, lo cual es una muestra de las divisiones celulares que ocurrieron en esta muestra (Figura 21 IIA) (Figura 22 IIA). Esto puede ser un signo de que el látex de *E. ingens* no impidió o disminuyó el proceso de división celular. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el látex de las concentraciones testadas no presenta un efecto citotóxico en las células MRC-5, lo cual es un factor importante para el uso de esta planta como una potencial herramienta terapéutica.

Es importante resaltar que el ensayo MTT es el patrón de oro de los ensayos de citotoxicidad y recuento de la proliferación celular por ser un ensayo colorimétrico rápido, fácil de efectuar y de resultados consistentes. Sin embargo, los nuevos estudios han demostrado este ensayo como poco fiable por tener muchas interferencias que afectan los resultados, es decir los resultados pueden sufrir alteraciones ya sea por la estructura celular y sus diferentes sustancias que pueden hacer interacciones con el tetrazolio (VAN TONDER *et al.*, 2015).

Finalmente, se debe considerar que los resultados obtenidos en este trabajo son limitados y se necesitan más estudios para asegurar que el látex de *E. ingens* es efectivo para la cicatrización de heridas. Además, se debe tener en cuenta que los ensayos de cicatrización de heridas son complejos y, por lo tanto, hay que tener cuidado al interpretar los resultados. En algunas ocasiones es difícil asegurar que tanto los cultivos de control como los grupos de tratamientos experimentales se realicen en condiciones equivalentes de confluencia celular. Además, el tamaño, forma y ancho de las “heridas” pueden variar entre pocillos del mismo ensayo, ya que las “heridas” se realizaron de forma manual y no se hizo ningún control de estas variables. Por lo tanto, se recomienda que futuros estudios realicen los ensayos de forma más estandarizada para obtener resultados más confiables.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

8 CONCLUSIÓN

Se puede concluir entonces que los resultados de este estudio muestran que el látex de la planta *E. ingens*, aplicado en el modelo de ensayo *in vitro*, no ejerce un efecto relacionado a la cicatrización en las células de fibroblastos MRC-5. Esta actividad demostró que no hubo diferencia significativa del tamaño de la herida si no una tendencia a una proliferación celular y migración de las células. Además, el látex no presentó efectos citotóxicos en las células MRC-5, lo cual es un factor importante para el uso de esta planta como una potencial herramienta terapéutica. Sin embargo, aún se necesitan más estudios para identificar los principios activos presentes en el látex de *E. ingens* y comprender su mecanismo de acción en el proceso de cicatrización de heridas.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

REFERENCIAS

- AKBIK, D.; GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W.; ROHANIZADEH, R. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, , v. 116, n. 1, p. 1–7, 2014.
- ALSAFFAR, D. F.; YASEEN, A.; MAHMUD, R.; KAZ, H.; AZIZ, A. Wound Healing Studies of Selected Euphorbia Species: A Review. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, , v. 25, n. 6, p. 1583–6258, 2021. Disponível em: http://annalsofrscb.ro.
- ALTAMIRANO, N.; ROMANO, C.; PEPETTO, M.; ABADI, K.; MORENO, S. Bioactividades de compuestos polifenolicos no volatiles aislados de de plantas lamiaceae de argentina. **Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas**, , v. 6, n. 6, p. 319–320, 2007.
  Disponível em: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617472004.
- ARAÚJO, M. T. M. de; RESENDE, J. C.; SENDYK, W. R.; ROMAN-TORRES, C. V. G. As propriedades do óleo Copaifera ssp. em estudos laboratoriais e clínicos: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e19511527994, 2022.
- ARENAS, J. **Las heridas y su cicatrización**. *Em*: DERMATOLÓGIA. , 2003. p. 126–132.
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. **Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review**. : Springer Verlag, 2014.
- BARKU, V. Y. A. Wound Healing: Contributions from Plant Secondary Metabolite Antioxidants. *Em*: WOUND HEALING - CURRENT PERSPECTIVES. : IntechOpen, 2019. p. 10–235.
- BENEDETTI, J. **Estructura y funcionamiento de la piel**. , 2021.
- BERMAN, B.; MADERAL, A.; RAPHAEL, B. Keloids and hypertrophic scars: Pathophysiology, classification, and treatment. **Dermatologic Surgery**, , v. 43, p. S3–S18, 2017.
- BERNABÉU, A. **Tratamiento de las cicatrices**. , 2009.
- BISWAS, T. K.; MUKHERJEE, B. Plant Medicines of Indian Origin for Wound Healing Activity: A Review. **The international journal of lower extremity wounds**, , v. 2, n. 1, p. 25–29, 2003.
- BITTNER M.; ALARCÓN J.; AQUEVEQUE P.; BECERRA J.; HERNÁNDEZ V.;

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

HOENEISEN M.; SILVA M. ESTUDIO QUIMICO DE ESPECIES DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE EN CHILE., v. 46, n. 4, p. 419–431, 2001.

- BRUYNS, P. v.; BERRY, P. E. The nomenclature and application of the names Euphorbia candelabrum Welw. and Euphorbia ingens in tropical Africa. **Taxon**, , v. 68, n. 4, p. 828–838, 2019.
- BUENDÍA, A. E.; MAZUECOS, J. B.; CAMACHO, F. M. Anatomía y Fisiología de la piel . *En*: MANUAL DE DERMATOLOGIA . 2da. ed., 2018. v. 1, p. 2–25.
- CAMPOS, A. C.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. **ABCD Arq Bras Cir Dig**,, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007. Disponível em: www.bireme.br.
- CEBECI, Z. **Euphorbia Ingens**., 2020.
- CIUMAN, R. R. Phytotherapeutic and naturopathic adjuvant therapies in otorhinolaryngology. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, , v. 269, n. 2, p. 389–397, 2012.
- DIAS, S. G. O.; REIS, F. R. de M.; DEMARCO, F. F.; DA SILVA, P. N.; BURKERT, F. A. D. P.; GUERRA, R. L. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, , v. 140, n. 2, p. 428–437, 2012.
  Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112000670?casa_token=fuMJaF6qhAoAAAAA:JhggU8GulI3RHLhVg8g-oiaIQr9oMIjP68Bo9VZx0OHEcYyTAQZTPlNdIg10M_4EDVYquMSakUmY. Acesso em: 16 jul. 2022.
- DOUGLAS, A. D. **Synthesis of 7-hydroxy-bicyclo[4.4.1]undeca-1,5-dien-11-one as a Precursor to the Synthesis of Ingenol**. Tennessee : [*s. n.*], 2004. Disponível em: https://trace.tennessee.edu/utk_chanhonoproj. .
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. **Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives**. : Academic Press, 2016.
- EL-HAWARY, S. S.; MOHAMMED, R.; TAWFIKE, A. F.; LITHY, N. M.; ABOUZID, S. F.; AMIN, M. N.; ABDELMOHSEN, U. R.; AMIN, E. Cytotoxic activity and metabolic profiling of fifteen euphorbia species. **Metabolites**, , v.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

11, n. 1, p. 1–18, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33383761/. Acesso em: 11 jun. 2022.

- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **ScienceTranslationalMedicine**, , v. 6, n. 265, p. 6–265, 2014. Disponível em: www.ScienceTranslationalMedicine.org.
- FIGUEIRÊDO, G. de S.-F.; BEZERRA, A. I. da S.; DA COSTA, E. M.; NUNES, L. E.; DE FREITAS, L. H. R.; DE PAIVA, J. R. L. C.; PIERDONA, F. G.; DE OLIVEIRA, L. C.; DE SOUZA, J. C. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, Society and Development**, , v. 10, n. 13, p. e140101321096, 2021.
- GARCIA, J. D.; FRAILE, P. A. **Anatomía y fisiología de la piel**. *Em*: PEDIATRIA INTEGRAL., 2021. p. 1–13.
- GILDENHUYS, S. The three most abundant tree Euphorbia species of the Transvaal (South Africa). *Em*: EUPHORBIA WORLD. 1. ed. , 2006. v. 2, p. 1–6.
- GIVOL, O.; KORNHABER, R.; VISENTIN, D.; CLEARY, M.; HAIK, J.; HARATS, M. **A systematic review of Calendula officinalis extract for wound healing**. : Blackwell Publishing Inc., 2019.
- GUARÍN, C. C.; QUIROGA, P. S.; LANDINEZ, N. S. P. Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. **Facultad de Medicina**, , v. 61, n. 4, p. 441–448, 2013.
- JACOBS, J. P.; JONES, C. M.; BAILLE, J. P. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. **Nature**, , v. 227, n. 5254, p. 168–170, 1970.
- KEMBOI, D.; SIWE-NOUNDOU, X.; KRAUSE, R. W. M.; LANGAT, M. K.; TEMBU, V. J. Euphorbia diterpenes: An update of isolation, structure, pharmacological activities and structure–activity relationship. **Journal Molecules**, , v. 26, n. 16, p. 50–55, 2021.
- KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHPANGADAN, P. **Ethnopharmacological approaches to wound healing-Exploring medicinal plants of India**. , 2007.
- LAZARUS, G. S.; COOPER, D. M.; KNIGHTON, D. R.; MARGOLIS, D. J.; PERCORARO, R. E.; RODEHEAVER, G.; ROBSON, M. C. **Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing**. , 1994.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

- LEONG, M.; MURPHY, K.; PHILLIPS, L. wound healing. *Em*: SABISTON TEXTOOK OF SURGERY:THE BIOLOGICAL BASTIN OF MODERN SURGICAL PRACTICE. 20. ed. España: El sevier, 2017. p. 1–2144.
- LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. **The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants**: Elsevier Masson SAS, 2020.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, , v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LING, W.; FLORENLY, F.; LIENA, L.; PURBA, D. R. Effectiveness of Turmeric Ethanol Extract Cream Preparation (Curcuma Longa) in Speeding up Wound Healing in Male Wistar Rats. **Budapest International Research in Exact Sciences (BirEx) Journal**, , v. 4, n. 1, p. 10–21, 2021.
- LIRA, V. da C. **Anatomia e Fisiologia da Pele**. , 2009.
- LORDANI, T. V. A.; DE LARA, C. E.; FERREIRA, F. B. P.; DE SOUZA TERRON MONICH, M.; DA SILVA, C. M.; LORDANI, C. R. F.; BUENO, F. G.; TEIXEIRA, J. J. V.; LONARDONI, M. V. C. **Therapeutic effects of medicinal plants on cutaneous wound healing in humans: a systematic review**. : Hindawi Limited, 2018.
- LUZ, L. E. C.; PALUDO, K. S.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; KLEIN, T.; SILVA, R. Z.; BELTRAME, F. L.; BUDEL, J. M. **Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of Euphorbia umbellata (Janaúba)**. : Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2015.
- MACEDO, D. G.; RIBEIRO, D. A.; COUNTINHO, H. D.; MENEZES, I. R.; SOUZA, M. M. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, , v. 14, n. 6, p. 491–508, 2015. Disponível em: www.blacpma.usach.cl.
- MAVER, T.; MAVER, U.; STANA KLEINSCHEK, K.; SMRKE, D. M.; KREFT, S. **A review of herbal medicines in wound healing**. , 2015.
- MCGOLDRICK, R. B.; THEODORAKOPOULOU, E.; AZZOPARDI, E. A.; MURISON, M. Lasers and ancillary treatments for scar management Part 2: Keloid, hypertrophic, pigmented and acne scars. **Scars, Burns & Healing**, , v.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

3, p. 1–16, 2017.

- MCSHARRY, B. P.; JONES, C. J.; SKINNER, J. W.; KIPLING, D.; WILKINSON, G. W. G. Human telomerase reverse transcriptase-immortalized MRC-5 and HCA2 human fibroblasts are fully permissive for human cytomegalovirus. **Journal of General Virology**,.v 82, n. 4, p. 855–863, 2001.
- MERUANE, M.; ROJAS, M. Desarrollo de la piel y sus anexos en Vertebrados. **Int. J. Morphol**, , v. 30, n. 4, p. 1422–1433, 2012.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1ªed. Brasilia: Textos Básico de Saúde, 2006. 2006.
- MORESKI, D.; LEITE-MELLO, E.; BUENO, F. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, , v. 22, n. 1, p. 63–69, 2018.
- MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity AssaysJournal ofImmunologicalMethods**. , 1983.
- MWINE, J. T.; DAMME, P. van. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, , v. 5, n. 5, p. 652–662, 2011a. Disponível em: http://www.academicjournals.org/JMPR.
- MWINE, J. T.; DAMME, P. van. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, , v. 5, n. 5, p. 652–662, 2011b. Disponível em: http://www.academicjournals.org/JMPR.
- NASCIMENTO, J. E. T.; MORAIS, ; Plantas medicinais nativas brasileiras com atividade cicatrizante. **Rev. Bras. Pl. Med**, , v. 19, n. 1, p. 118–128, 2017.
- NAVARRETE, G. F. Histologia de la piel . **Revista de la Facultad de Medicina**, , v. 46, n. 4, 2003.
- NEIRA, L. F.; STASHENKO, E.; ESCOBAR, P. Euphorbiaceae Activity of Colombian plant extracts derived from the Euphorbiaceae family. **Revista de la Universidad Industrial de Santander**, , v. 46, n. 1, p. 15–22, 2014.
- OMS. **Burns**., 2018. Disponível em: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns. Acesso em: 18 nov. 2022.
- OMS. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023**. :

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Organización Mundial de la Salud, 2013. 2013.

- OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. **New diterpenoid irritants from euphorbia ingens**. , 1974.
- OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. On the Active Principles of the Spurge Family (Euphorbiaceae). **J Cancer Res Clin Oncology**, , v. 103, p. 255–268, 1982.
- PASCUAL, M. J. V.; CORREAL, E. C. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. **Revista Grasas y aceites**, , v. 43, n. 1, p. 1–10, 1992. D
  Disponível em: http://grasasyaceites.revistas.csic.es.
- PIMENTEL, D. D.; BATISTA, A. M. M.; FERREIRA, C. R. D. A.; PEIXOTO, M. I. O USO DE NONI (Morinda citrofolia L.) POR PACIENTES ONCOLÓGICOS: UM ESTUDO BIBLIOGRÁFICO. **Revista saúde e ciência**, , v. 5, n. 1, p. 37–44, 2016.
  Disponível em: https://rsc.revistas.ufcg.edu.br/index.php/rsc/article/view/202. Acesso em: 19 jul. 2022.
- PROTA FOUNDATION. Medicinal Plants. *Em*: SCHMELZER, G.H.; GURIB-FAKIM, A. (org.). **Plant Resources of Tropical Africa**. PROTAed. Wageningen, Netherlands: 2008. v. 1, p. 272–274.
- RAMALHO, M. P.; SANTOS, S. L. F.; CASTRO, N. M. de; VASCONCELOS, L. M. de O.; MORAIS, I. C. de O.; PESSOA, C. V. PLANTAS MEDICINAIS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Expressão Católica Saúde**, , v. 3, n. 2, p. 64, 2018.
- RODRIGUES, D. S.; MEDEIROS, E. C.
  Plantas medicinais: indicação de raizeiros para o tratamento de feridas. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde** , , v. 29, n. 2, p. 197–203, 2016.
- ROMERO, A. V. CICATRIZACIÓN. **Médica Sinergia**, , v. 1, n. 9, p. 13–17, 2016.
- SARMENTO, C. G.; PINTO, V. M. J.; SANTOS, K. K. B.; MANIÇOBA, B. B. P.; BORGES, P. M. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208–212, 2013. Disponível em: http://revista.gvaa.com.br.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

- SASAKI, N.; GOMI, F.; HASEGAWA, F.; HIRANO, K.; FUJIWARA, M.; TOYODA, M.; ISHIWATA, T. Characterization of the metastatic potential of the floating cell component of MIA PaCa-2, a human pancreatic cancer cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, , v. 522, n. 4, p. 881–888, 2020.
- SAÚL, A. Cicatrización . *Em*: ALFARO, Abraham; FIERRO-ARIAS, Leonel; GONZÁLEZ, Alejandro; SILVA, Ramiro Hesiquio; LABASTIDA, Olga (org.). **Lecciones de dermatología**. 16. ed. , 2015. v. 1.
- SCHLAEPFER, L.; MENDOZA, J. A. E. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 41, n. 4, p. 18–27, 2010. Disponível em: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916060003.
- SHAKYA, A. K. Medicinal plants: Future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, , v. 4, n. 4, p. 59–64, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/305305647.
- SILVA, J. F. T.; PAULINO, V. P. de S.; OLIVEIRA, L. G. F.; MEDEIROS, F. L. de; SOUSA, E. O. de; BARBOSA, N. S.; CÂMARA, N. M. S. A.; CARVALHO, I. C. de; SOUSA, C. M. de; SILVA, R. F. da; MORAES, J. J. de; MATTOS, M. L. R. A utilização de plantas medicinais como alternativa para cicatrização de feridas: uma análise bibliográfica. **Research, Society and Development**, , v. 11, n. 10, p. 1–9, 2022.
- SILVA, V.; ROSA, M.; TANSINI, A.; OLIVEIRA, R.; MARTINHO, O.; LIMA, J. P.; PIANOWSKI, L.; REIS, R. In vitro screening of cytotoxic activity of euphol from Euphorbia tirucalli on a large panel of human cancer-derived cell lines. **Experimental and Therapeutic Medicine**, , v. 16, p. 557–566, 2018.
- SORG, H.; TILKORN, D. J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI, U. **Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts**. : S. Karger AG, 2017.
- SOUSA, E. A. O.; NEVES, E. A.; ALVES, C. R. Therapeutic potential of Aloe vera (Aloe barbadensis): A brief review. **Revista Virtual de Quimica**, , v. 12, n. 2, p. 378–388, 2020.
- SUSANTO, A.; KUMALA, R. M.; AMALIYA, A.; BAMBANG, A. S. The Effectiveness of Ethanolic Extract of Moringa Leaves (Moringa Oleifera Lam.)

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

Gel on the Wound Healing Process of the Rat's Palate. **Journal of International Dental and Medical Research**, , v. 12, n. 2, p. 504–509, 2019. Disponível em: http://www.jidmr.com.

- TÉOT, L.; MUSTOE, T. A.; MIDDELKOOP, E.; GAUGLITZ, G. G. Psychological Impact of Living with Scars Following Burn Injury. *Em*: TEXTBOOK ON SCAR MANAGEMENT. : Springer, Cham, 2020. p. 429–434. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-44766-3_48. Acesso em: 27 nov. 2022.
- THIBODEAU, G. A.; PATTON, K. T. Sitema tegumentar e Menbranas do corpo. *Em*: MANOLE (org.). **Estructura e funções do corpo humano**. 16. ed. São Paulo: [*s. n.*], 2002.
- TI, Y. L.; SONG, F.; FANG, Z.; ZHANG, P. **Plants and phytochemicals inhibit scar formation: A systematic review**. : Elsevier B.V., 2022.
- TOTTOLI, E. M.; DORATI, R.; GENTA, I.; CHIESA, E.; PISANI, S.; CONTI, B. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. **Pharmaceutics**, , v. 12, n. 8, p. 1–30, 2020.
- TRINDADE, M. J. de S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, , v. 19, n. 1, p. 292–309, 2014. Disponível em: http://scielo.sld.cu.
- VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, , v. 8, n. 1, p. 47, 2015.
- VOUDOURI, D.; TESSEROMATI, C. Medicinal plants in wound healing. *Em*: PHARMAKEFTIKI. : IntechOpen, 2013. v. 25, p. 135–144.
- WANG, Y.; BEEKMAN, J.; HEW, J.; JACKSON, S.; ISSLER-FISHER, A. C.; PARUNGAO, R.; LAJEVARDI, S. S.; LI, Z.; MAITZ, P. K. M. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. **Advanced Drug Delivery Reviews**, , v. 123, p. 3–17, 2018. Disponível em: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0169409X17301990?token=498B116835FB288EE00A240A5DFCE3646D37D26E186C0B92B7211E5A34A77E5DC52D32147F3FDF1DA0702951485E8604&originRegion=us-east-1&originCreation=20221128231807. Acesso em: 27 nov. 2022.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03

- YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. **Anatomy, Skin (Integument), Epidermis**. , 2021.
  Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/. Acesso em: 18 nov. 2022.
- ZARDETO, G. S.; ALMEIDA, R. D. J.; QUEMEL, F. D. silva; ZENAIDE, F. dos S. PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DO CÂNCER. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, , v. 27, n. 3, p. 75–80, 2019. Disponível em: http://www.mastereditora.com.br/bjscr.
- ZEGARRA, R. Z. Las especies de la familia euphorbiaceae en la provincia de tacna: estudio biosistemático. **Revista Ciencia & Desarrollo**, , v. 19, p. 44–48, 2015.

Versão Final Homologada
12/01/2023 22:03