

MÉTODO *IN VITRO* PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A LINAJE NEURONAL

CAMPO TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo técnico de la medicina regenerativa, particularmente a la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales mediante un método *in vitro* basado en el uso del extracto de una planta y al procedimiento para su obtención.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las células madre mesenquimales son un tipo de células madre multipotentes que pueden aislarse de varios tejidos y membranas adultas o fetales, como la grasa, la médula ósea, la sangre del cordón umbilical, la pulpa dental, la placenta o el músculo.

Debido a su plasticidad, las células madre mesenquimales se consideran el tipo celular más importante para la medicina regenerativa, y son las más estudiadas en los ensayos preclínicos y clínicos. Una importante aplicación biomédica se basa en su diferenciación neuronal, ya que estas células diferenciadas pueden ser usadas en el tratamiento de enfermedades neuronales.

En el estado de la técnica se encuentran descritos diferentes métodos para inducir la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales. Algunos de los principales métodos tradicionales se basan en el uso de medios suplementados con compuestos químicos que han sido cuestionados por sus posibles efectos tóxicos, y generación de estrés celular. Otras metodologías emplean factores neurotróficos o de crecimiento, que presentan inconvenientes asociados a un incremento del costo del procedimiento.

Por ejemplo, WO2009066817A1 divulga un método para inducir la diferenciación de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea en neuronas maduras y motoneuronas mediante su cultivo en un medio óptimo suplementado con

composiciones necesarias, como β -mercaptoetanol, ácido retinoico, forskolina, o factores de crecimiento.

WO2002086108A1 describe un método para diferenciar células madre mesenquimales de médula ósea en células neurales que comprende cultivar las células madre mesenquimales en un medio que contiene el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés).

Una estrategia distinta para la diferenciación neuronal *in vitro* de células madre mesenquimales se basa en el uso de extractos naturales que disminuyen los costos y la toxicidad de este tipo de métodos.

En el trabajo de Si, Yin-Chu y colaboradores, se divulgan hierbas medicinales chinas que promueven la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales, como *Salvia miltorrhiza*, *Astragalus*, *Ginsenoside Rg1*, *P. notoginseng saponins*, *Musk polypeptide*, *Musccone* y *Ginkgolide B* (Si, Yin-Chu *et al.*, 2014, *Chin Med.*, 9(1): 13).

WO2010143063A1 divulga compuestos, extractos y fracciones activas de la planta *Geum japonicum* (OEGJ) y métodos para prevenir o tratar enfermedades o afecciones cerebrales, y en particular describe que una fracción activa obtenida de extracto de esta planta, puede inducir *in vitro* la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales.

En el trabajo de Hu L. *et al.* (Hu L. *et al.*, 2011, *J Ethnopharmacol.*, 136(2):334-40), se describe un método *in vitro* para la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales que comprende el cultivo de las mismas en un medio de inducción que incluye un extracto de la especie *Salvia miltorrhiza*, si bien también incluye factores de crecimiento que también contribuyen a inducir la diferenciación neuronal, pero que suponen un mayor costo asociado.

Debido a que la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales tiene un alto interés biomédico, es necesario disponer de métodos *in vitro* alternativos a los

ya existentes de diferenciación de células madre mesenquimales a células neuronales con bajo coste y toxicidad asociados.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para diferenciar células madre mesenquimales a células neuronales mediante el cultivo células madre mesenquimales en un medio de cultivo que comprende un extracto de la planta *Salvia scutellarioides*.

Además, la invención se refiere al extracto de la planta *Salvia scutellarioides*, y a un método para su obtención que comprende:

- (a) Poner en contacto material vegetal de *Salvia scutellarioides* con un disolvente alcohólico,
- (b) Filtrar la disolución de la etapa (a) y eliminar el disolvente alcohólico, y
- (c) Redisolver los sólidos remanentes de la mezcla obtenida en la etapa (b) en un disolvente orgánico.

La diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales a células neuronales mediante el extracto de la planta *Salvia scutellarioides* representa una alternativa a otras estrategias y aproximaciones conocidas en el estado de la técnica, teniendo un bajo coste y evitando la toxicidad asociada.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Las siguientes figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativas de la presente invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La presente invención se entiende de una forma más clara a partir de las siguientes figuras. Las figuras presentadas no pretenden limitar el alcance de la invención, el cual está únicamente determinado por las reivindicaciones adjuntas, en donde:

Figura 1. Resumen de la metodología general utilizada para evaluar el efecto de *Salvia scutellarioides* (SS) sobre la diferenciación de células madre mesenquimales (CMM).

Figura 2. Diseño experimental del aislamiento, mantenimiento y diferenciación de células madre mesenquimales CMM aisladas de médula ósea de ratón incluyendo tiempo y pasajes. SS: *Salvia scutellarioides*.

Figura 3. Reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides en las partes de *Salvia scutellarioides*. [A] Hoja, [B] Tallo y [C] Raíz

Figura 4. Reconocimiento de saponinas en los extractos de *Salvia scutellarioides*. [A] Hoja, [B] Tallo y [C] Raíz.

Figura 5. Reconocimiento de fenoles en los extractos de *Salvia scutellarioides*. [A] Hoja, [B] Tallo y [C] Raíz.

Figura 6. Reconocimiento de antocianinas en los extractos de *Salvia scutellarioides*. [A] Hoja en pH ácido, [B] Hoja en pH básico, [C] Tallo en pH ácido, [D] Tallo en pH básico, [E] Raíz en pH ácido y [F] Raíz en pH básico.

Figura 7. Reconocimiento de cumarinas en los extractos de *Salvia scutellarioides*. [A] Hoja, [B] Tallo y [C] Raíz.

Figura 8. Inmunofluorescencia de células sin tratar (Control) y tratadas con extracto de la especie de planta *Salvia scutellarioides* (SS). Imágenes magnificadas a 20X de células inmunomarcadas con β III-Tubulina (Verde) y NeuN (Rojo), y teñidas con DAPI (Azul).

Figura 9. Inmunofluorescencia de células sin tratar (control) y tratadas con extracto de la especie de planta *Salvia scutellarioides* (SS). La inmunofluorescencia de las células tratadas con extracto de SS se analiza según la parte de la planta de la que procede el extracto (P1 (Hoja), P2 (Tallo) o P3 (Raíz)), y la concentración del extracto (C1 (1 µg/ml), C2 (5 µg/ml) o C3 (10 µg/ml)). Imágenes magnificadas a 20X de células inmunomarcadas con β III-Tubulina (Verde) y NeuN (Rojo), y teñidas con DAPI (Azul). P1C1: 1 µg/mL de Hoja; P1C2: 5 µg/mL de Hoja; P1C3: 10 µg/mL de Hoja; P2C1: 1 µg/mL de Tallo; P2C2: 5 µg/mL de Tallo; P2C3: 10 µg/mL de Tallo; P3C1: 1 µg/mL de Raíz; P3C2: 5 µg/mL de Raíz; P3C3: 10 µg/mL de Raíz.

Figura 10. Morfología de las células (A) tratadas y (B) no tratadas con el extracto de *Salvia scutellarioides* durante 7 días. Imágenes magnificadas a 10X.

Figura 11. Morfología de células tratadas y no tratadas (Control) con los extractos de *Salvia scutellarioides*. Imágenes magnificadas a 20X de células inmunomarcadas con β III-Tubulina (Verde) y NeuN (Rojo), y teñidas con DAPI (Azul).

Figura 12. Morfología de las células del grupo control y de las tratadas con P1C1 y P1C2. Imágenes magnificadas a 20X de células inmunomarcadas con β III-Tubulina (Verde) y NeuN (Rojo), y teñidas con DAPI (Azul). P: Parte de la planta; C: Concentración del extracto. P1C1: 1 µg/mL de Hoja; P1C2: 5 µg/mL de Hoja.

Figura 13. Perímetro celular de células tratadas y no tratadas (control) con los extractos de *Salvia scutellarioides*. Los datos son expresados como la media $\pm$ error estándar. **** = Valor p: < 0.0001, *** = Valor p: 0.0001 a 0.001, ** = Valor p: 0.001 a 0.01, * = Valor p: 0.01 a 0.05 y ns = Valor p: $\geq$ 0.05. P1C1: 1 µg/mL de Hoja; P1C2: 5 µg/mL de Hoja; P2C2: 5 µg/mL de Tallo; P3C1: 1 µg/mL de Raíz; P3C2: 5 µg/mL de Raíz; P3C3: 10 µg/mL de Raíz.

Figura 14. Área celular de células tratadas y no tratadas (control) con los extractos de *Salvia scutellarioides*. Los datos son expresados como la media $\pm$ error estándar. **** = Valor p: < 0.0001, *** = Valor p: 0.0001 a 0.001, ** = Valor p: 0.001 a 0.01, * = Valor p: 0.01 a 0.05 y ns = Valor p: $\geq$ 0.05. P1C1: 1 µg/mL de Hoja; P1C2: 5 µg/mL de

Hoja; P2C2: 5 µg/mL de Tallo; P3C1: 1 µg/mL de Raíz; P3C2: 5 µg/mL de Raíz; P3C3: 10 µg/mL de Raíz.

Figura 15. Número de neuritas contadas en las células tratadas y control con los extractos de *Salvia scutellarioides*. Los datos son expresados como la media $\pm$ error estándar. **** = Valor p: < 0.0001, *** = Valor p: 0.0001 a 0.001, ** = Valor p: 0.001 a 0.01, * = Valor p: 0.01 a 0.05 y ns = Valor p: $\geq$ 0.05. P1C1: 1 µg/mL de Hoja; P1C2: 5 µg/mL de Hoja; P2C1: 1 µg/mL de Tallo; P2C2: 5 µg/mL de Tallo; P3C1: 1 µg/mL de Raíz; P3C2: 5 µg/mL de Raíz; P3C3: 10 µg/mL de Raíz.

Figura 16. Longitud neurítica en las células tratadas y control con los extractos de *Salvia scutellarioides*. Los datos son expresados como la media $\pm$ error estándar. **** = Valor p: < 0.0001, *** = Valor p: 0.0001 a 0.001, ** = Valor p: 0.001 a 0.01, * = Valor p: 0.01 a 0.05 y ns = Valor p: $\geq$ 0.05. P1C1: 1 µg/mL de Hoja; P1C2: 5 µg/mL de Hoja; P2C2: 5 µg/mL de Tallo; P3C1: 1 µg/mL de Raíz; P3C2: 5 µg/mL de Raíz; P3C3: 10 µg/mL de Raíz.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, se definirá la presente invención y la mejor forma de llevar a cabo la misma, donde se incluyen las mejores modalidades o realizaciones de la misma, las cuales se deben entender de la forma más amplia posible sin limitaciones.

La presente invención está dirigida a un método *in vitro* para diferenciar células madre mesenquimales, preferiblemente aislada de un sujeto, a células neuronales mediante su cultivo en un medio que comprende un extracto de la planta *Salvia scutellarioides*.

Para ello, los inventores han obtenido un extracto de planta de la especie *Salvia scutellarioides* mediante un método basado en el uso de disolventes orgánicos. Los inventores demostraron que el extracto de *Salvia scutellarioides* fue capaz de inducir *in vitro* la diferenciación de células madre mesenquimales a células neuronales.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un extracto de planta de la especie *Salvia scutellarioides*, de aquí en adelante “el método de obtención del extracto de la invención”, que comprende las siguientes etapas:

- (a) Poner en contacto material vegetal de *Salvia scutellarioides* con un disolvente alcohólico,
- (b) Filtrar la disolución de la etapa (a) y eliminar el disolvente alcohólico, y
- (c) Redisolver los sólidos remanentes de la mezcla obtenida en la etapa (b) en un disolvente orgánico.

El término "extracto", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia, producto, compuesto, residuo, obtenido a partir de una biomasa vegetal o material vegetal. Particularmente, el extracto de la presente invención es obtenido a partir de biomasa vegetal o material vegetal de la planta *Salvia scutellarioides*.

Salvia scutellarioides es una especie de planta rastrera, perteneciente a la familia Lamiaceae y al género *Salvia*, que se distribuye en áreas geográficas como la región andina de Colombia, Ecuador, y norte de Perú.

El término “disolvente alcohólico”, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto orgánico capaz de disolver o dispersar otras sustancias que incluye, al menos, un grupo hidroxilo. Ejemplos de disolventes alcohólicos incluyen, sin limitar a, etanol, metanol, propanol, butanol, isobutanol, isopropil alcohol, pentanol, o propanodiol, En una realización preferida, el disolvente alcohólico de la etapa (a) se selecciona de una lista que consiste en: etanol, metanol, propanol, butanol, isobutanol, isopropil alcohol, pentanol, propanodiol, y cualquier combinación de ellos. Preferiblemente, el disolvente alcohólico es etanol, más preferiblemente etanol al 99,9%.

El término “disolvente orgánico”, tal y como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto orgánico o compuesto químico que tiene una estructura molecular basada en carbono, o que contiene carbono en su estructura molecular, y que es capaz de disolver o dispersar otras sustancias. Como sabe un experto en la materia, hay diferentes clases de disolventes orgánicos, que incluyen, sin limitar a, alcoholes,

glicoles, ésteres, éteres, cetonas, hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos.

En una realización preferida del método de obtención del extracto de la invención, el disolvente orgánico de la etapa (c) es dimetilsulfóxido (DMSO). Preferiblemente, el DMSO tiene una concentración final en la disolución obtenida en la etapa (c) inferior o igual al 0,2%.

Como entiende un experto en la materia, el tiempo o la duración de la etapa (a) del método de obtención del extracto de la invención, en la que se pone en contacto el material vegetal de *Salvia scutellarioides* con un disolvente alcohólico, puede depender de las condiciones experimentales en las que se lleva a cabo dicha etapa, por ejemplo, el disolvente alcohólico empleado o la concentración del mismo. Así, en otra realización preferida del método de obtención del extracto de la invención, la etapa (a) se lleva a cabo durante 4 a 12 días, preferiblemente 8 días.

En el método de obtención del extracto de la invención, el extracto de *Salvia scutellarioides* se obtiene a partir de una biomasa vegetal o material vegetal. Como es conocido para un experto en la materia, el extracto de una biomasa vegetal o material vegetal puede obtenerse de cualquiera de las diferentes partes que comprende una planta de *Salvia scutellarioides*. Ejemplos de partes de *Salvia scutellarioides* incluyen, sin limitar a hoja, tallo y raíz, rizoides, esporas y esporangio.

Así, en otra realización preferida, el material vegetal se selecciona entre hoja, tallo, raíz, rizoides, esporas y esporangio, y cualquier combinación de los mismos, preferiblemente hoja, tallo o raíz.

Como es sabido por un experto en la materia, es práctica de rutina someter al material vegetal a tratamientos de procesamiento previos a la etapa (a) del método de obtención del extracto de la invención, que pueden incluir, sin limitar a, la trituración, la molienda y la rotura mecánica.

Además, puede ser necesaria una etapa de secado del material vegetal previa a la etapa (a) del método de obtención del extracto de la invención. Así, otra realización preferida comprende una etapa adicional previa a la etapa (a), que comprende:

(a') Secar el material vegetal de la planta *Salvia scutellarioides* a una temperatura entre 40 °C y 60 °C, preferiblemente 50°C, durante 30 min a 90 min, preferiblemente 60 min.

En la etapa (b) del método de obtención del extracto de la invención, la disolución obtenida en la etapa (a) es filtrada, y se elimina el disolvente. Tal y como entiende un experto en la materia, el disolvente puede eliminarse mediante técnicas y/o equipos conocidos en el estado de la técnica, que incluyen, sin limitar a, un evaporador rotativo.

Otra realización particular del método de obtención del extracto de la invención, comprende una etapa adicional (d), que comprende diluir la disolución de la etapa (c) en agua desionizada.

Otro aspecto de la invención se refiere a un extracto alcohólico, preferiblemente etanólico, de la planta *Salvia scutellarioides*, de aquí en adelante, el "extracto de *Salvia scutellarioides*" o "extracto de la invención". Mediante el método de obtención del extracto de la invención, se obtiene un extracto de una planta de la especie *Salvia scutellarioides*.. Así, en una realización preferida de la invención este es obtenido por el método de obtención del extracto de la invención.

En una realización preferida, el extracto de la invención preferiblemente comprende fenoles, taninos, antocianinas y cumarinas. En otra realización preferida, el extracto de la invención además comprende saponinas, esteroides y/o triterpenoides cuando el material vegetal de donde procede el extracto es hoja o tallo.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de cultivo celular, preferiblemente para la diferenciación de células madre mesenquimales a células de linaje neuronal, que comprende el extracto de la invención.

El extracto de *Salvia scutellarioides* es capaz de inducir *in vitro* la diferenciación de células madre mesenquimales a células neuronales. La diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales a células neuronales mediante extracto de *Salvia scutellarioides* representa una alternativa a otras estrategias y aproximaciones

conocidas en el estado de la técnica, con un bajo coste y evitando la toxicidad asociada.

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diferenciar células madre mesenquimales a células neuronales que comprende cultivar las células madre mesenquimales, preferiblemente aisladas de un sujeto, en un medio de cultivo que comprende el extracto de la planta *Salvia scutellarioides*, de aquí en adelante el "método de diferenciación neuronal de la invención". Preferiblemente, el extracto de la planta *Salvia scutellarioides* es el extracto de la invención.

El término "células madre mesenquimales" se refiere a células madre adultas multipotentes que pueden autorrenovarse dividiéndose y diferenciarse en diferentes tipos de células especializadas del organismo.

Como entiende un experto en la materia, las células madre mesenquimales están presentes en múltiples tejidos, que incluyen sin limitar a cordón umbilical, médula ósea y tejido graso.

Las células madre mesenquimales a la que se refiere la presente invención pueden proceder de cualquier tejido del organismo en el que haya células de este tipo. En una realización preferida del método de diferenciación neuronal de la invención, las células madre mesenquimales proceden de médula ósea.

El término "*in vitro*", tal como se usa en la presente invención, se refiere al método o uso del extracto de *Salvia scutellarioides* en una muestra biológica aislada del sujeto o en células aisladas que se encuentran fuera del cuerpo humano o animal (*ex vivo*).

En la presente invención, el término "sujeto", en relación a la procedencia de las células madre mesenquimales, tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero, e incluye, pero no se limita a, roedores (Rodentia) y humanos. Así, en una realización preferida, el sujeto es un roedor, preferiblemente un ratón o una rata. En otra realización preferida, el sujeto es un ser humano.

El término “cultivar”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso que comprende el cultivo de una parte del organismo, en la presente invención células madre mesenquimales, fuera de su entorno natural en condiciones particulares.

Tal y como se ha descrito previamente en el presente documento, la biomasa o material vegetal a partir de la que se obtiene el extracto de la invención incluye diferentes partes de planta de *Salvia scutellarioides*. En una realización preferida del método de diferenciación neuronal de la invención, el extracto de *Salvia scutellarioides* procede de una parte de la planta que se selecciona de hoja, tallo, raíz, rizoides, esporas, esporangio, y cualquier combinación de los mismos, preferiblemente el extracto de *Salvia scutellarioides* es de hoja, tallo o raíz.

En una realización preferida, el método de diferenciación neuronal de la invención comprende cultivar las células madre mesenquimales en el medio de cultivo que comprende el extracto de *Salvia scutellarioides* durante 1 a 15 días.

En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal se cultiva en el medio que comprende el extracto de *Salvia scutellarioides* durante 4 a 12 días, preferiblemente 5 a 9 días, más preferiblemente 7 días.

En otra realización preferida, el medio que comprende el extracto de la planta *Salvia scutellarioides* o medio de diferenciación se reemplaza cada 3 días.

En el presente documento, las frases “medio que comprende el extracto de *Salvia scutellarioides*” o “medio de diferenciación”, se usan indistintamente para referirse al medio de cultivo en el que las células madre mesenquimales se diferencian a células neuronales.

Además de extracto de *Salvia scutellarioides*, que induce la diferenciación neuronal de las células madre mesenquimales, el medio de diferenciación puede comprender un medio basal, y/o suplementos y compuestos necesarios para el mantenimiento y crecimiento de las células en cultivo.

Así, en una realización particular, el medio de diferenciación o medio que comprende el extracto de *Salvia scutellarioides*, puede además comprender medio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) y B27.

En otra realización particular, el medio de diferenciación comprende además suero fetal bovino (SFB), preferiblemente al 15%.

Como entiende un experto en la materia, variaciones en la concentración del extracto de la planta, en la presente invención extracto de *Salvia scutellarioides*, afectan a la diferenciación celular. Así, en una realización preferida del método de diferenciación neuronal de la invención, la concentración del extracto de la planta de *Salvia scutellarioides* es entre 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

En una realización más preferida, la concentración del extracto de la planta *Salvia scutellarioides* se selecciona de la lista que consiste en 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 7 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$.

En otra realización aún más preferida, la concentración del extracto de la planta *Salvia scutellarioides* es entre 3 y 7 $\mu\text{g/mL}$, preferiblemente 5 $\mu\text{g/mL}$.

Como entiende un experto en la materia, el método de diferenciación neuronal de la invención puede comprender etapas previas y/o posteriores de preparación y/o de mantenimiento o almacenaje de las células madre mesenquimales, que comprendan, sin limitar a, su cultivo en un medio de mantenimiento celular.

Así, en una realización preferida, el método de diferenciación neuronal de la invención, además comprende una etapa previa en donde la célula madre mesenquimal se cultiva en un medio de mantenimiento celular.

“Medio de mantenimiento celular”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un medio basal para apoyar el crecimiento y el mantenimiento de células en cultivo, por ejemplo, sin limitar a, medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco

(DMEM, por sus siglas en inglés). Así, en una realización preferida, el medio de mantenimiento celular es DMEM, preferiblemente DMEM bajo en glucosa.

Como entiende un experto en la materia, el medio de mantenimiento celular puede comprender suplementos y compuestos necesarios para el mantenimiento y crecimiento de las células en cultivo.

Así, en una realización preferida, el medio de mantenimiento celular comprende SFB, preferiblemente al 15%.

En otra realización preferida del método de diferenciación neuronal de la invención, el medio de mantenimiento celular comprende al menos un antibiótico, preferiblemente al 1%. En una realización preferida, el antibiótico es penicilina, estreptomicina y/o anfotericina.

En otra realización preferida, el medio de mantenimiento celular comprende L-glutamina.

En otra realización aún más preferida, el medio de mantenimiento celular comprende al menos un antibiótico, preferiblemente al 1%, y/o L-glutamina, preferiblemente al 0,5%.

En otra realización preferida, el medio de mantenimiento celular comprende SFB, preferiblemente al 15%, al menos un antibiótico, preferiblemente al 1%, y L-glutamina, preferiblemente al 0,5%.

En otra realización preferida, el medio de mantenimiento celular se reemplaza cada 3 días.

En el método de diferenciación neuronal de la invención, el extracto de la planta *Salvia scutellarioides* induce la diferenciación *in vitro* de las células madre mesenquimales a células neuronales. Ejemplos de células neuronales incluyen, sin limitar a, neuronas inmaduras, interneuronas o motoneuronas.

Como entiende un experto en la materia, puede emplearse como criterio para comprobar que las células tratadas con el medio de diferenciación presentan características neuronales la determinación de cambios en la morfología celular como la presencia de neuritas, tamaño y número de neuritas, o cambios en el área y/o perímetro celular, y/o la presencia de marcadores neuronales que pueden evaluarse mediante técnicas de visualización que incluyen, sin limitar a, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.

El término “marcador neuronal”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas intracelulares y de la superficie celular presentes en células neuronales, que pueden utilizarse para la identificación y caracterización de las mismas.

Así, en una realización preferida, las células neuronales diferenciadas a partir de las células madre mesenquimales comprenden la presencia de uno o más marcadores neuronales. Preferiblemente, comprenden la presencia de, al menos, dos marcadores neuronales.

En una realización preferida, los marcadores neuronales se seleccionan de la lista que consiste en: NeuN (Neuronal Nuclei), β 3-tubulina, calbindina D, doblecortina, enolasa específica de neurona, MAP-2 (por sus siglas en inglés), NeuroD1, neurofilamento-H (NF-H), neurofilamento-L (NF-L), neurofilamento-M (NF-M), proteína de densidad postsináptica-93 o PSD-93, proteína de densidad postsináptica-95 o PSD-95, y cualquier combinación de ellos.

En otra realización aún más preferida, los marcadores neuronales son β 3-tubulina y NeuN.

Tal como se ha descrito en los párrafos anteriores, el extracto de la planta *Salvia scutellarioides* permite la diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales a células neuronales, representando una alternativa a otras estrategias y aproximaciones conocidas en el estado de la técnica, ya que tiene un bajo coste y evita toxicidad asociada.

Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de un extracto de *Salvia scutellarioides*, preferiblemente del extracto de la invención, para diferenciar células madre mesenquimales a neuronales, de aquí en adelante el “uso de la invención”.

Los términos “extracto”, “*in vitro*” y “célula madre mesenquimal” han sido definidos y explicados anteriormente, y dichas definiciones y las realizaciones preferidas de los mismos son aplicables para el uso de la invención.

Así, en una realización preferida del uso de la invención, el extracto de la planta *Salvia scutellarioides* es de hoja, tallo o raíz.

En otra realización preferida del uso de la invención, la concentración del extracto de la planta *Salvia scutellarioides* se selecciona de la lista que consiste en 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, 6 µg/mL, 7 µg/mL, 8 µg/mL, 9 µg/mL y 10 µg/mL. En otra realización aún más preferida, la concentración del extracto de la planta *Salvia scutellarioides* es entre 3 y 7 µg/mL, preferiblemente 5 µg/mL.

En otra realización preferida del uso de la invención, las células madre mesenquimales proceden de médula ósea.

En una realización preferida del uso de la invención, las células madre mesenquimales están aisladas de un sujeto. Tal como se ha definido previamente, el término “sujeto” hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, roedores (Rodentia) y humanos. Así, en una realización preferida, el sujeto es un roedor, preferiblemente un ratón o una rata. En otra realización preferida, el sujeto es un ser humano.

EJEMPLOS:

A continuación, se ilustrará la invención mediante ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la invención.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada para evaluar el efecto de *Salvia scutellarioides* (SS) sobre la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales (CMM) se resume en la Figura 1.

1.1. Colecta de *Salvia scutellarioides*

Las muestras de la especie *Salvia scutellarioides* se colectaron en el corregimiento de Juntas, en el departamento del Tolima a 1800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Un ejemplar fue depositado en el Herbario Toli de la Universidad del Tolima, donde se confirmó el nombre de la especie.

1.2. Preparación del extracto de la planta *Salvia scutellarioides*

El material colectado se secó a temperatura ambiente durante 8 días y se limpió de arena y otros residuos. Posteriormente, las muestras se separaron en hoja, tallo y raíz, y se secaron en un horno a 50°C durante 1 hora.

El material seco se introdujo en botellas ámbar con etanol al 99,9%, teniendo en cuenta que cada parte de la planta iba en una botella diferente. 8 días después, cada mezcla se filtró y concentró utilizando un evaporador rotativo (Heidolph) acoplado a una bomba (PC 3001 VARIOpro) para finalmente almacenarse en botellas ámbar de menor volumen. Una vez separado el etanol del extracto, las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de su uso.

Al momento de su uso, cada extracto se disolvió en DMSO y para alcanzar una concentración menor o igual a 0,2% de DMSO, concentración en la que este compuesto es inocuo para las células, la mezcla se diluyó en agua desionizada para su posterior adición en el medio de diferenciación.

1.3. Estudio cualitativo de los compuestos presentes en *Salvia scutellarioides*

Se llevó a cabo un estudio cualitativo de los compuestos presentes en *Salvia scutellarioides*.

1.3.1 Reconocimiento de alcaloides: se tomaron 5 g del material vegetal fresco que fueron triturados en trozos de pequeño tamaño. Luego, se adicionó ácido clorhídrico (5%) hasta que se cubrió la muestra, se calentó al baño María durante 10 minutos y se filtró. Posteriormente, en dos tubos de ensayo se colocó 0,5 mL del filtrado anterior y se agregó a uno de los dos tubos 2 gotas de reactivo de Dragendorff y al otro, 2 gotas del reactivo de Mayer para observar presencia de turbidez o precipitado en los tubos y considerar positiva la prueba de estos compuestos en la muestra.

1.3.2 Reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides: se tomó una pequeña cantidad de material vegetal seco y molido, al cual se le adicionó diclorometano hasta cubrir la muestra y posteriormente se filtró sobre sulfato de sodio anhidro. Luego, en un tubo de ensayo se agregó 1 mL del filtrado y por la pared del tubo se adicionó 1 mL de anhídrido acético y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado para observar la coloración, la cual debe ser verde, azul, rojo o violeta para que esta prueba se considere positiva.

1.3.3. Reconocimiento de saponinas: se adicionó agua hasta cubrir 5 g del material vegetal macerado y se filtró. Del filtrado se pasaron 4 mL a un tubo de ensayo y se agitó vigorosamente durante 1 minuto para observar si había presencia de espuma y si esta permanecía durante 5 minutos.

1.3.4. Reconocimiento de compuestos fenólicos: se calentó al baño María 5g del material vegetal macerado cubierto de agua y se filtró. Se pasó 1 ml del filtrado a un tubo de ensayo y se adicionó 2 gotas de solución de tricloruro férrico (FeCl_3) (1%) para observar la coloración, verde, azul o negra.

1.3.5. Reconocimiento de taninos: se calentó al baño María 5 g del material vegetal macerado cubierto de agua y se filtró. En un tubo de ensayo se tomó 1 mL del filtrado y se le agregaron unas gotas de la solución de gelatina-sal para observar partículas en suspensión o precipitado.

1.3.6. Reconocimiento de flavonoides: se adicionó etanol hasta cubrir 10 g de material vegetal y se calentó al baño María durante 5 minutos, se dejó enfriar para realizar el filtrado. Posteriormente, se realizó el Ensayo de Shinona adicionando 1 mL

del filtrado etanólico a un tubo de ensayo, al cual se le adicionaron varias limaduras de magnesio y por la pared de este, se dejó caer ácido clorhídrico (37%) para observar la reacción que genera coloración naranja, rojo, violeta o rosado.

1.3.7. Reconocimiento de leucoantocianidinas: se adicionó etanol hasta cubrir 10 g de material vegetal y se calentó al baño María durante 5 minutos, se dejó enfriar para realizar el filtrado. Se tomó 2 mL del filtrado en un tubo de ensayo y se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico (37%); luego, se calentó durante 15 minutos para observar la coloración, que se esperaba fuera roja.

1.3.8. Reconocimiento de quinonas: se adicionó 20 mL de etanol (95%) sobre 0,5 g de material vegetal en polvo y se calentó al baño María durante 5 minutos hasta ebullición y se filtró en caliente. Luego, se tomaron 5 mL del filtrado y se le agregaron 3 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (10%). Esta mezcla se calentó al baño María hasta ebullición, y después se dejó enfriar la muestra. Posteriormente, se adicionó 5 mL de tolueno al extracto previamente hidrolizado y se agitó suavemente utilizando la cabina de extracción. Finalmente, se tomaron 2 mL de la fase orgánica en un segundo tubo de ensayo y se le adicionó 1 mL de la solución de hidróxido de sodio (5%) en amoníaco (2%) para observar la coloración rojo cereza en la fase acuosa formada durante la reacción.

1.3.9. Reconocimiento de antocianinas: se agregaron 200 mL de agua sobre 100 g de muestra fresca desmenuzada, se calentó a ebullición durante 5 minutos y se filtró. Posteriormente, se adicionó 2 mL del filtrado en un tubo de ensayo y se añadió 1 mL de NaOH diluido para luego observar la coloración formada. En otro tubo de ensayo se adicionó 2 mL del filtrado, al cual se le agregó 6 gotas de HCl (10%) y se observó la coloración, teniendo en cuenta que las antocianinas se caracterizan por presentar diferentes coloraciones en distintos pHs.

1.3.10. Reconocimiento de cumarinas: en un tubo de ensayo grande se tomó 1 g de material vegetal macerado y se agregó etanol comercial hasta cubrir la muestra. Con un trozo de papel filtro se cubrió la boca del tubo, se agregaron unas gotas de NaOH diluido y se calentó hasta ebullición durante 5 minutos. Posteriormente se

enfrió y se retiró el papel filtro, el cual se observó bajo luz ultravioleta a 366 nm debido a que las cumarinas emiten luz fosforescente bajo estas condiciones.

1.4. Aislamiento de células madre mesenquimales (CMM) de ratón

Se utilizaron de 1 a 2 ratones machos Balb/C de 20 ± 2 g y de 6 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el Bioterio de Experimentación Animal de la Universidad del Tolima, en las siguientes condiciones: Temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, humedad relativa de 50-70%, ciclo de iluminación 12x12, agua ad libitum y alimento controlado (3 g diarios/animal).

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se confirmó la muerte del animal por cese de la circulación sanguínea. Posteriormente, se retiró la piel de las extremidades posteriores y anteriores, y se separaron del cuerpo sin dañar los huesos. A continuación, las extremidades del animal se sumergieron en alcohol al 70% frío durante 3 minutos y en tampón o Buffer Fosfato Salino (PBS) mientras se retiraba el músculo, luego se almacenaron en DMEM (por sus siglas en inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina frío hasta que los huesos quedaron completamente limpios. En una cabina de flujo laminar, se separó la epífisis de los huesos y se realizó un aspirado medular utilizando una jeringa de 1 mL y aguja de calibre 27 que contenía DMEM bajo en glucosa con 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina (PSA) (Medio suplementado). Seguidamente, se filtró la muestra obtenida con separadores celulares de 70 μ m y se transportó a un tubo falcón de 15 mL para la centrifugación. Por último, se determinó el rendimiento y la viabilidad de las células por exclusión de azul de tripán y recuento en cámara Neubauer para su posterior siembra con medio suplementado (Ortega et al., *Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de ratón Balb/c*, Universidad del Tolima (2014); Soleimani & Nadri, *Nat Protoc.* 2009;4(1):102-6.; Vatter et al., *Pharmacognosy Res.* 2013;5(1):1-9).

1.5. Expansión y cultivo de CMM de ratón

Las células de la médula ósea (MO) se cultivaron en cajas de Petri plásticas de 60x16 mm a una densidad de entre 7×10^6 - 10×10^6 células/caja y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Tras 6 horas, se reemplazó la mitad del medio de cultivo para eliminar las células no adherentes que se acumulan en la superficie de la placa. 24 horas después, se realizó el cambio completo de medio. A partir de ese momento, se realizó el cambio de medio cada 72 horas.

Cuando las cajas alcanzaron confluencia del 70-80%, las células se disociaron retirando el medio de la caja y realizando dos lavados con PBS (1x). Seguidamente, se adicionó a la caja 2 mL de tripsina/EDTA (0.05%) y se incubó durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Una vez disgregadas las células de la caja, se realizó un lavado con 2 mL de medio suplementado. El contenido de la caja se llevó a un tubo Falcón de 15 mL con 1 mL de DMEM suplementado para su centrifugación a 1500 r.p.m por 5 minutos. Acto seguido, se descartó el sobrenadante, se realizó conteo celular empleando la cámara de Neubauer y de acuerdo a la densidad celular, se sembraron las células en nuevas cajas. Al día siguiente se realizó cambio de medio completo con el propósito de retirar los residuos de tripsina.

1.6. Diferenciación neuronal de CMM usando extracto de *Salvia scutellarioides*

Cuando las CMM alcanzaron tercer pasaje se sembraron en cajas multipozos (12 pozos/caja) y al adherirse, el medio se reemplazó por DMEM/F12 + B27 suplementado con SFB al 15% y se formaron los grupos experimentales tratados con o sin los extractos de la planta *Salvia scutellarioides* que aparecen en la Tabla 1. Los tratamientos con este medio se dejaron durante 7 días y el medio de cultivo se reemplazó cada 72 horas (Figura 2).

Tabla 1. Grupos experimentales utilizados para evaluar el efecto de las partes de la especie SS en la diferenciación neural de CMM.

NOMBRE DEL GRUPO	DESCRIPCIÓN	DOSIS
------------------	-------------	-------

CONTROL	Solo medio de cultivo	-
P1C1	Hoja	1 µg/mL
P2C1	Tallo	1 µg/mL
P3C1	Raíz	1 µg/mL
P1C2	Hoja	5µg/mL
P2C2	Tallo	5µg/mL
P3C2	Raíz	5µg/mL
P1C3	Hoja	10µg/mL
P2C3	Tallo	10µg/mL
P3C3	Raíz	10µg/mL

1.7. Inmunofluorescencia de CMM diferenciadas

Las células de ratón se fijaron con metanol durante 5 minutos. Después de fijadas, se lavaron tres veces con tampón o Buffer Fosfato (PB) (0,1 M), 5 minutos/lavado, y una vez con NH₄Cl (50 mM) durante 10 minutos.

Nuevamente tres lavados con PB fueron realizados para luego adicionar a cada pozo solución de bloqueo durante 20 minutos a 37°C. Acto seguido, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti β -III tubulina (ab78078) (1/2000) a 4°C durante 16 horas para luego ser lavadas 3 veces con PB e incubadas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 de conejo anti ratón (verde) durante 2 horas, protegiendo las cajas de cualquier fuente lumínica.

Seguidamente, se realizó 5 lavados con PB (5 minutos/lavado), 1 lavado con solución de bloqueo durante 20 minutos a 37°C y se incubó las células con anticuerpo primario anti NeuN (MAB377) (1/1000) a 4°C durante toda la noche. Luego, se realizaron 3 lavados con PB y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa fluor 594 (Rojo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, se realizaron 5 lavados con PB y 1 lavado con solución de bloqueo durante 20 minutos a 37°C. Se repitieron los 5 lavados con PB, se agregó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó 5 lavados con PB.

Finalmente, se retiró el PB, se observaron las células usando el FLOID Cell Imaging Station y se tomaron 12 fotografías (por tratamiento).

1.8. Análisis morfológico de CMM diferenciadas

Usando el programa IMAGE J, se estimó área y perímetro celular, número y longitud de neuritas de todas las células observadas por foto. Las medidas se tomaron utilizando una tabla de dibujo con la cual se dibujó el contorno de cada célula y neurita observada por fotografía, mientras el programa mostraba resultados del área, perímetro de las células y la longitud de las neuritas.

2. RESULTADOS

2.1. Compuestos presentes en *Salvia scutellarioides*

Los resultados de las pruebas cualitativas para identificar la presencia de metabolitos secundarios en la hoja, tallo y raíz de la especie *Salvia scutellarioides* se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos o metabolitos secundarios presentes o ausentes en las partes de la especie SS.

PRUEBA	HOJA	TALLO	RAIZ
Alcaloides	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Esteroides/Triterpenoides	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)
Saponinas	Positivo (++)	Positivo (+)	Negativo (-)
Fenoles	Positivo (+++)	Positivo (+)	Positivo (++)
Taninos	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+)
Flavonoides	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Leucoantocianinas	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Quinonas	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Antocianinas	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
Cumarinas	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)

2.1.1. Reconocimiento de alcaloides: ninguna de las partes de la planta presentó alcaloides debido a que en la prueba no se formó turbidez, ni con el reactivo de Mayer, ni con el de Dragendorff.

2.1.2. Reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides: puesto que coloraciones verde, azul, rojo o violeta son positivas para esta prueba, en hoja y tallo hay presencia de esteroides y/o triterpenoides porque tras agregar anhídrido acético y ácido clorhídrico al extracto de estas dos partes de la planta, tomaron una coloración verde (Figura 3A y B). Por el contrario, la raíz no presentó ninguno de esos colores; en consecuencia, en esta parte de la planta no hay presencia de esteroides y/o triterpenoides (Figura 3C).

2.1.3. Reconocimiento de saponinas: para que considerar que hay presencia de saponinas se debe formar espuma después de agitar vigorosamente la muestra y dicha espuma debe permanecer por lo menos 5 minutos. En los extractos de las hoja y tallo, la espuma se formó y permaneció por más de 5 minutos (Figura 4A y B), siendo la presencia de espuma mayor en hoja que en tallo. Con el extracto de la raíz se formó espuma, pero no permaneció más de 1 minuto (Figura 4C).

2.1.4. Reconocimiento de compuestos fenólicos: se considera que hay presencia de compuestos fenólicos cuando aparecen coloraciones verde, azul o negro después de agregar FeCl_3 . Para las tres partes de la planta se observó coloración de este tipo (Figura 5), por lo tanto, las tres partes de la planta presentan fenoles.

2.1.5. Reconocimiento de taninos: una vez se agregó la solución de gelatina sal a las tres muestras, se observaron partículas en suspensión y turbidez en estas, siendo la muestra etanólica de tallo la que mayor turbidez presentó en comparación con las muestras de hoja y raíz. Esto indica la presencia de taninos en las tres partes de la planta.

2.1.6. Reconocimiento de flavonoides: se considera que hay presencia de flavonoides en la muestra cuando hay coloración naranja, roja, violeta o rosada en la muestra. Sin embargo, al agregar las limaduras de magnesio y el HCl a los filtrados etanólicos de los tres extractos, no apareció ninguna de estas coloraciones.

2.1.7. Reconocimiento de leucoantocianinas: se considera que hay presencia de leucoantocianinas si esta prueba muestra coloración roja. Por lo tanto, no hay presencia de este metabolito secundario en ninguna de las muestras debido a que el extracto de la hoja viró a una coloración verde, y los extractos de hoja y tallo terminaron sin coloración (transparente).

2.1.8. Reconocimiento de quinonas: se considera que hay presencia de antocianinas si hay aparición de un color rojo cereza en la capa acuosa de la muestra. Debido a que ninguna de las fases formadas presentaba esta coloración se considera que no hay presencia de quinonas.

2.1.9. Reconocimiento de antocianinas: las antocianinas se caracterizan por mostrar diferentes colores a distinto pH. Con los extractos de las 3 partes de la planta se observaron distintas coloraciones en pH ácido y básico. En pH ácido, el extracto de la hoja mostró coloración café claro, el de tallo color naranja, y el de raíz amarillo claro (Figura 6A, 6C y 6E). Mientras que a pH básico (Figura 6B, 6D y 6F), color café oscuro, amarillo claro y amarillo quemado, respectivamente. Por lo tanto, los extractos de las tres partes de la planta presentan antocianinas.

2.1.10. Reconocimiento de cumarinas: al observar los papeles filtro con el extracto de las tres partes de la planta bajo luz ultravioleta, se observó una luz fosforescente de color amarillo, que indica la presencia de cumarinas en las muestras. El papel filtro de tallo tenía una mayor superficie de la luz ultravioleta de este color (Figura 7B) con respecto al de hoja y raíz (Figura 7A y C).

2.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia mostró que las células tratadas con los extractos de *Salvia scutellarioides* (SS) expresaban los marcadores neuronales β III-tubulina y NeuN. A diferencia de los grupos tratados con los extractos, el grupo control negativo no expresó el marcador neuronal NeuN (Figuras 8 y 9).

2.3. Análisis morfológico

Al tratar las células de ratón con los extractos de SS durante 7 días, estas cambiaron su morfología fibroblastoide característica para presentar una morfología más alargada y con más prolongaciones, las cuales parecían neuritas (Figura 10).

Las células tratadas con los extractos de SS mostraron cambios morfológicos significativos tales como prolongaciones similares a neuritas, con longitudes aparentemente mayores a las células no tratadas ($23,33 \pm 5 \mu\text{m}$ en las células no tratadas y $61,18 \pm 7 \mu\text{m}$ en las células tratadas) (Figuras 11 y 12).

2.3.1. Perímetro celular

Las células tratadas con SS a las concentraciones $5 \mu\text{g/mL}$ y $10 \mu\text{g/mL}$, sin importar la parte de la planta, presentaron mayor perímetro celular (P1C2: $91,43 \pm 5,5 \mu\text{m}$; P2C2: $87,13 \pm 6,9 \mu\text{m}$; P3C2: $161 \pm 6,7 \mu\text{m}$; P3C3: $116,6 \pm 16,14 \mu\text{m}$) respecto al grupo control ($58,57 \pm 3,7 \mu\text{m}$). La prueba de Kruskal Wallis mostró diferencias entre los grupos analizados (Valor $p = < 0,0001$) ($H=31,79$) y la prueba Dunn para múltiples comparaciones señaló diferencias significativas entre: el tratamiento P3C3 y el control, al igual que el grupo P3C2 y el grupo control ($p = 0,0001-0,001$); entre el tratamiento P1C2 y el grupo control (Valor p : $0,001$ a $0,01$); entre el grupo P2C2 y el control ($p = 0,01-0,05$) (Figura 13).

2.3.2. Área celular

Al igual que el perímetro celular, las células tratadas con SS a las concentraciones 2 y 3, independientemente de la parte de la planta mostraron mayor área (P1C2: $560 \pm 67 \mu\text{m}$; P2C2: $505,8 \pm 75,9 \mu\text{m}$; P3C2: $500,9 \pm 21 \mu\text{m}$; P3C3: $740,4 \pm 197,7 \mu\text{m}$) en comparación al grupo control ($211,4 \pm 25,8 \mu\text{m}$). La prueba de Kruskal Wallis mostró diferencias entre los grupos analizados (Valor $p = < 0,0001$) ($H=28,96$). Por su parte, la prueba de Dunn, indicó diferencias significativas entre: el tratamiento P1C2 y el grupo control (Valor $p = < 0,0001$); el tratamiento P3C2 y el grupo control ($p=0,0001-0,001$); entre el tratamiento P2C2 y el grupo control, al igual que el P3C3 y el grupo control ($p = 0,001-0,01$) (Figura 14).

2.3.3. Neuritas

Las células tratadas con los extractos de hoja mostraron mayor número de neuritas (P1C1: $2,4 \pm 0,3$; P1C2: $3,3 \pm 0,74$) respecto al grupo control ($0,64 \pm 0,22$). La prueba Krustal Wallis señaló que existen diferencias entre los grupos analizados (Valor $p=0,0061$) ($H=19,79$) (Figura 15) y la prueba de Dunn indicó que hay diferencia significativa entre el grupo control y los grupos P1C1 y P1C2 (Valor $p: 0,001$ a $0,01$) (Figura 15).

En cuanto al tamaño de las neuritas, el grupo P1C1, fue el que presentó las neuritas más largas respecto al grupo control (P1C1: $61,18 \pm 7,4 \mu\text{m}$; Control: $23,33 \pm 5 \mu\text{m}$). La prueba Krustal Wallis mostró diferencias entre los grupos analizados (Valor $p=0,0204$) ($H=14,98$) y la prueba Dunn una diferencia significativa entre el grupo P1C1 y el grupo control (Valor $p=0,01-0,05$) (Figura 16).

3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La morfología de las células aisladas de médula ósea (MO) de ratón que fueron tratadas con los extractos de la planta durante 7 días indican que esta especie de planta genera cambios a nivel morfológico en las CMM, los cuales incluyen alargamientos similares a neuritas.

Los resultados del análisis por inmunofluorescencia indican que las células tratadas con los extractos de la especie SS expresan β III-tubulina y el marcador neuronal NeuN, el cual no se expresó en el grupo control negativo.

Al igual que las de ratón, las células humanas tratadas con los extractos de SS y el grupo control positivo (tratado con factores neurotróficos) expresaron los marcadores β III-tubulina y NeuN.

Los presentes resultados indican que la hoja parece tener los mejores efectos teniendo en cuenta que fue la única parte que tuvo diferencia significativa respecto al grupo control en cuanto a número de prolongaciones o neuritas y el tamaño de estas.

Estos resultados también muestran que las células tratadas con las tres concentraciones utilizadas expresaron los marcadores NeuN y β III-tubulina, y generaron cambios morfológicos, siendo la concentración 5 μ g/mL del extracto SS la que mostró los resultados más significativos. Además, las células tratadas con esta concentración presentaron diferencias extremadamente significativas respecto al grupo control en cuanto a número de neuritas, perímetro y área celular.

Por otro lado, esta metodología para inducir la diferenciación de CMM presenta ciertas ventajas respecto a las demás debido a que no emplea factores neurotróficos entre otros componentes que son costosos y tampoco compuestos químicos como β -mercaptoetanol, que tienen toxicidad asociada.