



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE
DE LA PLANTA *Ipomoea pes-caprae* (Linn).**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA

PRESENTA

ISAAC CONRADO GALLARDO VARGAS

TUTOR PRINCIPAL:

LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTOR

ROSARIO CLARA VARGAS SOLIS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

JOSÉ RAMÍREZ LEZAMA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F. ABRIL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a mis padres Rosario y Conrado que con tanta paciencia hicieron de mi un profesional, para después realizar mis sueños con bases solidas y poder adquirir habilidades necesarias en mi vida profesional.

Agradecimientos

Les agradezco a mis tutores Laura Romero, José Ramírez y Rosario Vargas , el poder hacer un posgrado y enseñarme cosas que me servirán en mi vida profesional.

Mireya gracias por siempre estar al pendiente de mi y ayudarme incondicionalmente en cada cosa que te pedí.

Don Miguel un gran amigo que siempre me ayudo cuando lo necesite y sobretodo me enseñó el manejo del laboratorio de inmunohistoquímica del departamento de patología.

Amigos Abel, Bernie, Ileana, Yanet, Katy, Chofizz y tantos más que no terminaría de misionarles muchas gracias.

Génesis por estar siempre que te he necesitado y por tu apoyo incondicional en este último paso de mi maestría.

Esli un gran amigo, gracias por todo lo que me aportaste en esta Maestría.

Dra. Ivonne Heuze de Icaza jefa del Bioterio de la UAM-X, gracias por apoyar mi proyecto y darme todas las facilidades para desarrollar mi experimento y a todos su colaboradores Janet, Héctor, Heriberto, Andrés y Eliseo.

Maestro Gerardo Salas Garrido, te agradezco tu amistad y tu gran calidad humana con la que siempre te haz distinguido y por haberme enseñado algunas técnicas diagnósticas.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| Contenido | I |
| Lista de cuadros | II |
| Lista de figuras | II |
| Resumen | IV |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 2 |
| 1.2 Reparación tisular | 3 |
| 1.3 Control de la proliferación tisular | 4 |
| 1.4 Actividad proliferativa tisular | 5 |
| 1.5 Ciclo celular y regulación de la replicación celular | 6 |
| 1.6 Factores de crecimiento | 7 |
| 1.7 Matriz extracelular (MEC) e interacciones célula-matriz | 15 |
| 1.8 Reparación mediante la formación de cicatrices y fibrosis | 18 |
| 1.9 Mecanismo de angiogénesis | 19 |
| 1.10 Reparación de heridas cutáneas | 20 |
| 1.11 <i>Ipomoea pes-caprae</i> (Linn) | 33 |
| II. JUSTIFICACIÓN | 37 |
| III. HIPÓTESIS | 39 |
| IV. OBJETIVOS | 40 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS | 41 |
| VI. RESULTADOS | 47 |
| VII. DISCUSIÓN | 59 |
| VIII. CONCLUSIONES | 66 |
| IX. PERSPECTIVAS | 66 |
| X. REFERENCIAS | 67 |

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen y ejemplos de las interacciones entre componentes de la MEC y factores de crecimiento 22

Cuadro 2: Fase inflamatoria de la reparación: asociación con tiempo, cambios visibles y constituyentes microscópicos (Baum, 2005)

Cuadro 3. Fase proliferativa del proceso de reparación: asociación con tiempos, cambios visibles y constituyentes microscópicos (Baum, 2005)

Cuadro 4. Fase de maduración del proceso de reparación: Asociación con tiempos, cambios visibles y constituyentes microscópicos (Baum *et al.*, 2005)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta *Ipomoea pes-caprae* (Linn).

Figura 2. Piel de la región dorsal. Día 0. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes no adosados.

Figura 3. Piel de la región dorsal. Día 3. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes no adosados que está totalmente cubierta por una formación de material rojo, sólido, seco (costra).

Figura 4. Piel de la región dorsal. Día 6. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes no adosados que está totalmente cubierta por una formación de material rojo, sólido, seco (costra). La incisión de la rata tratada con diclorometano se observa disminuida de tamaño en comparación con el resto de los extractos y la solución salina.

Figura 5. Piel de la región dorsal. Día 9. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes parcialmente adosados. En los tratamientos de solución salina, madecassol y hexano aún se aprecia escaso material rojo, sólido, seco (costra). La incisión de la rata tratada con diclorometano se observa prácticamente adosada.

Figura 6. Piel de la región dorsal. Día 12. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes totalmente adosados. En los tratamientos de solución salina, Madecassol y hexano aún se aprecia una ligera cicatriz mientras que en la rata tratada con diclorometano la incisión es apenas perceptible.

Figura 7. Gráfica del promedio \pm EE de la longitud de la herida inducida sobre piel de ratas macho, medida durante 12 días de tratamiento. La capacidad de cicatrización de los tratamientos se comparó mediante ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. El modelo incluyó como factores principales el tiempo de evaluación y el tratamiento que recibió cada grupo. No se consideró la interacción de factores debido a que dicha información se analizó con otro modelo^{a,b,c}. Para cada grupo en tratamiento, literales distintas entre los días de evaluación indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$.

Figura 8. Curvas de ajuste del efecto de cicatrización tiempo-dependiente. Se presentan los porcentajes de cierre de heridas inducidas en piel de rata y tratadas con los extractos diclorometano y hexano de *Ipomoea*, solución salina y Madecassol. El tiempo se transformó para ajustar curvas de tipo log (tiempo) Vs. cicatrización normalizada. A partir de los ajustes se obtuvieron los parámetros TC_{50} y R^2 . Para comparar la habilidad de cicatrización de los tratamientos se consideró el valor TC_{50} que se comparó estadísticamente mediante la prueba F de suma de cuadrados extra^{a,b}. Entre los grupo en tratamiento, literales distintas indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$.

Figura 9. Análisis de sobrevida del porcentaje de sujetos experimentales que presentaron una cicatrización $> 80\%$ entre los días 9 y 12. La forma de las curvas se comparó mediante el estadístico Log-rank de Mantel-Cox para más de tres grupos. Notar las diferencias en la forma de las curvas de cada tratamiento, así como el porcentaje final de animales que presentaron una cicatrización eficiente ($> 80\%$) durante la fase final de evaluación (días 9-12).

Figura 10. Imagen representativa de un corte de piel intacta de rata macho. H&E.

Figura 11. Comparación histológica del efecto cicatrizante del extracto de diclorometano de *Ipomoea pes-caprae* y solución salina, sobre heridas inducidas en piel de rata. La barra de escala representa 250 μ . H&E.

Figura 12. Inmunotinciones contra FGF y EGFR en cortes de piel intacta de rata macho.

RESUMEN

La planta *Ipomea pes-caprae* se ha utilizado como antiinflamatorio, antiespasmódico y analgésico. El uso de fármacos tópicos de origen vegetal es una práctica frecuente en medicina veterinaria para minimizar el desarrollo del tejido fibroso, que en ocasiones incapacita o compromete el trabajo futuro de un animal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad cicatrizante de los extractos de hexano y diclorometano de *Ipomea pes-caprae* en heridas inducidas en la piel de ratas macho Wistar. Las ratas tratadas con el extracto de diclorometano exhibieron un incremento significativo en la cicatrización. A nivel microscópico se observó menor cantidad de tejido conjuntivo fibroso, regeneración de glándulas accesorias en la dermis y el estrato córneo bien organizado en la epidermis, mientras que los grupos control y tratados con hexano, exhibieron mayor grado de lesión.

Palabras clave: cicatrización, piel, extracto, *Ipomea pes-caprae*, rata Wistar

ABSTRACT

Ipomea pes-caprae plant has been used as anti-inflammatory, anti-spasmodic and as analgesic. The use of topic compounds of vegetal origin is a frequent practice in veterinary medicine to minimize the development of fibrosis, that can disable or compromise the future work of an animal. The objective of this work was to evaluate the healing activity of diclorometane and hexane extracts of *Ipomea pes-caprae* on induced skin surgical injuries on Wistar male rats. The rats treated with the diclorometane extract showed a significant improvement on the healing process. Microscopically, it was found less amount of fibrous connective tissue, regeneration of adnexal glands of the dermis, and a well organized epidermis, while the control groups exhibited a much higher lesion.

Key words: healing, skin, extract, *Ipomea pes-caprae*, Wistar rats

Introducción

Las heridas cutáneas, intencionales o accidentales, son lesiones en las que se activan mecanismos fisiológicos destinados a recuperar la integridad y funcionalidad de la piel; el proceso de reparación inicia con la lesión que activa la formación de un coágulo, el cual actúa como barrera que impide la salida de células de la sangre, activando mediadores químicos y células de defensa.

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde nuestros ancestros para curar heridas que afectan a un gran número de pacientes y que pueden reducir seriamente su calidad de vida. Se estima que existen cerca de 6 millones de pacientes en el mundo que padecen de heridas crónicas. Está reportado que los extractos de algunas plantas, como *Verbascum mucronatum* (Akdemir *et al.*, 2010), *Centella asiática* (Shukla *et al.*, 1999) *Trichosanthes dioica* (Shivhare Y *et al.*, 2010), *Flabellaria paniculata* (Olugbuyiro *et al.*, 2010), *Hypericum perforatum* (Pesin *et al.*, 2010); *Caryocar coriaceum* (Liduína *et al.*, 2010), tienen actividad cicatrizante.

La planta *Ipomea pes-caprae* (riñonina) es una hierba postrada de hojas acorazonadas de consistencia carnosa, con flores muy vistosas de color rosa o morado en forma de campana. Los frutos son esponjosos y contienen abundantes semillas. Se puede encontrar en regiones tropicales y habita en las zonas cálido-húmedas, desde el nivel del mar y hasta los 800 m. En la medicina tradicional se ha usado para inactivar el veneno de las medusas, como antiinflamatorio, antiespasmódico y analgésico, motivo por el cual se inició su estudio para comprobar su efecto en la cicatrización. La información científica acerca de la actividad de la planta *Ipomea pes-caprae* en este proceso es nula, sin embargo, en la herbolaria sí se describen sus efectos cicatrizantes.

1.1 Antecedentes

La Piel

La piel es un órgano complejo que realiza diversas funciones, entre las que se encuentran el servir como barrera entre el medio interno y externo para la protección contra agresiones físicas, como la radiación ultravioleta, o proteger del contacto con sustancias químicas y agentes biológicos; es un órgano de percepción, termorregulación, evaporación (ya que impide la pérdida de líquidos), biosíntesis de vitamina D, blanco de señales neuroendocrinas, absorción de sustancias (intercelular y transcelular), almacén de grasa, excreción a través de las glándulas sudoríparas, y secreción de sebo que, además, es un componente integral del sistema inmunitario y puede considerarse línea frontal de defensa (Castrillon, 2008).

La piel está constituida por la epidermis, que es la capa más superficial y la conforman cinco estratos celulares, que son: córneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal; las células de la capa basal se producen constante mente y sufren un proceso de diferenciación termino terminal desplazándose hacia la superficie. En este proceso las células sufren un cambio gradual de células basales cilíndricas y nucleadas hacia células anucleadas planas y ricas en queratina, que se localizan en las capas externas de la epidermis (Ramírez, 2010).

La dermis sostiene a la epidermis y está conformada por células y una matriz extracelular de fibras de colágena, elastina y la sustancia fundamental compuesta por proteoglicanos y glucosaminoglicanos, irrigadas por varios plexos vasculares; la elasticidad de la piel la provee la elastina, mientras que la fuerza tensil es provista por la colágena. En la unión de la dermis y la epidermis existe una serie de extensiones de la dermis hacia la epidermis llamadas papilas dérmicas se las conoce como clavos interpapilares (Martin *et al.*, 2006, Roh C. y Lyle S, 2006).

En la epidermis se encuentran folículos pilosos que aportan factor de crecimiento de fibroblastos , factor de crecimiento de hepatocitos, factor de

crecimiento derivado de plaquetas, Factor transformante beta, que servirán probablemente para la estimulación del crecimiento del pelo (Castrillon *et al.*, 2008)

Bajo la dermis se encuentra el tejido hipodérmico de sostén, el cual contiene terminaciones nerviosas que inervan a las capas de la piel, así como vasos sanguíneos y linfáticos que la irrigan (Navarrete, 2003).

1.2 Reparación Tisular

Cuando se presenta una lesión celular o tisular, se activan una serie de mecanismos cuyo fin es el control del daño, y posteriormente, el inicio del proceso de reparación. Este proceso se puede llevar a cabo de dos maneras, por regeneración o por cicatrización. La regeneración permite la restitución total del tejido afectado, recuperándose tanto la morfología como su funcionamiento; mientras que en la cicatrización, únicamente se reconstituye la continuidad del tejido afectado, dejando como consecuencia cambios estructurales en la organización y función tisular (Mcheik *et al* 2014).

La regeneración se refiere a la proliferación de las células de un tejido lesionado a fin de reemplazar las estructuras perdidas. En el caso específico de los mamíferos, los órganos y tejidos complejos se regeneran tras una lesión severa; sin embargo, es común emplear el término para referirse al crecimiento compensatorio del hígado (hiperplasia) después de una resección o necrosis. Por otro lado, tejidos con elevada capacidad proliferativa, como el tejido hematopoyético o los epitelios de recubrimiento que se encuentran en constante renovación, por lo que tras una agresión pueden regenerarse, siempre y cuando las células madre no hayan sido destruidas al afectarse la membrana basal (Nathoo *et al* 2014).

La cicatrización, por otro lado, suele ser una combinación de regeneración y formación de cicatriz. La participación de estos dos componentes en la reparación, dependerá principalmente de la capacidad regenerativa del tejido o tipo celular involucrado y de la extensión de la lesión. Una herida epitelial superficial sanará mediante proliferación celular; contrario a las lesiones de

mayor magnitud que llegan a comprometer la matriz extracelular (MEC), que sanarán mediante la formación de cicatriz, al igual que las lesiones persistentes que ocasionan inflamación de tipo crónica. El término fibrosis hace referencia al depósito excesivo de colágena que se produce en estas circunstancias (Kumar *et al.*, 2010).

Comprender los mecanismos de la regeneración y reparación nos obliga a conocer algunos factores que permiten el control de la proliferación celular, así como las diversas funciones de los componentes de la MEC (Mcheik *et al* 2014).

1.3 Control de la proliferación celular

El proceso de la proliferación celular esta a cargo de los queratinocitos localas que se encuentran en los bordes de la herida y por las células madre epiteliales de los folículos pilosos o glándulas sudoríparas. Este proceso es activado por las vías de señalización de las células epiteliales y no epiteliales en los bordes de la herida, que liberan diferentes citoquinas y factores de crecimiento, por ejemplo, EGF, KGF, IGF-1 y NGF. Además, la inhibición por contacto y la tensión física de los desmosomas y hemidesmosomas produce mediadores de lípidos y activa quinasas asociadas a la membrana (SRC quinasas), resultando en un aumento de la permeabilidad de las membranas para los iones, por ejemplo, calcio. Esto transmite una señal de iniciación a las células a los bordes de la herida con una retracción y reorganización de sus tonofilamentos intracelulares en la dirección de la migración (Reinke y Sorg, 2012).

En organismos adultos, el tamaño de las diferentes poblaciones celulares estará determinada por tres aspectos: la velocidad de proliferación celular, la diferenciación y por último la muerte por apoptosis. Por lo tanto, es posible que ocurra un incremento de células, ya sea por un aumento en la proliferación, o bien, por disminución de la muerte celular. La influencia de la diferenciación, dependerá del tejido, ya que en algunos las células diferenciadas no podrán reponerse, mientras que en otros, las células que mueren son remplazadas continuamente por células nuevas a partir de células madre.

Es posible estimular la proliferación celular en condiciones fisiológicas y patológicas, dicha proliferación es controlada en gran parte por señales del micro-entorno, solubles o de contacto, que pueden estimularla o inhibirla.

1.4 Actividad proliferativa tisular

Podemos dividir a los tejidos corporales en tres grupos, dependiendo de la actividad proliferativa de las células que los constituyen: en los tejidos lábiles las células están en constante división, en los tejidos estables las células son quiescentes y finalmente, en tejidos permanentes las células no se dividen. Sin embargo, a la luz de los hallazgos recientes que conciernen la reprogramación de la diferenciación celular, esta clasificación debe de ser interpretada cuidadosamente.

- Las células lábiles, son aquellas que se dividen continuamente y proliferan durante toda la vida, sustituyendo a las células que se destruyen. Entre ellas se incluyen los epitelios de recubrimiento como los epitelios estratificados escamosos de la piel, cavidad oral, vagina y cuello uterino, el epitelio de transición del sistema urinario; las células de la médula ósea. En la mayoría de estos tejidos, las células maduras derivan de células madres, cuya capacidad proliferativa es extraordinaria.
- Los tejidos quiescentes suelen tener un nivel de replicación bajo, pero cuando el tejido requiere células, se estimulan para que comiencen las divisiones celulares, por lo que son capaces de reconstruir el tejido de origen. Dentro de este grupo podemos encontrar a las células parenquimatosas hepáticas, renales y pancreáticas; células mesenquimatosas, como fibroblastos, hueso, cartílago y músculo liso; células endoteliales vasculares. La capacidad regenerativa de estas células se pone de manifiesto en la regeneración del hígado tras una hepatectomía parcial o lesión química aguda. Los fibroblastos, en concreto, pueden proliferar de forma amplia, como sucede en los procesos de cicatrización y fibrosis.

- Los tejidos permanentes no se dividen; contienen células que se han quedado en la fase G_1 prolongada y no pueden sufrir mitosis en la vida posnatal. En este grupo se incluyen las neuronas y las células musculares cardíacas y esqueléticas. Si las neuronas del sistema nervioso central se destruyen, el tejido se suele sustituir por una proliferación de elementos de soporte del sistema nervioso central, las células gliales. Sin embargo, estudios recientes demuestran que es posible una neurogenia limitada a partir de células madre en los encéfalos adultos. El músculo cardíaco muestra una capacidad de regeneración nula, por lo que tras una lesión del músculo cardíaco, como se produce en un infarto, se forma una cicatriz.

1.5 Ciclo celular y regulación de la replicación celular

La replicación celular es un proceso estrictamente regulado por factores de crecimiento o mediante la transmisión de señales por elementos de la MEC a través de las integrinas. Para lograr la replicación del DNA y división de la célula, ésta debe sufrir una serie de eventos regulados de manera estrecha que se llama ciclo celular. El ciclo celular está integrado por las fases G_1 (presintética), S (síntesis de DNA), G_2 (premitótica) y M (mitótica). Las células quiescentes que no han entrado al ciclo celular se encuentran en la fase G_0 . En el ciclo celular, al ser un proceso crítico en el que pueden ocurrir diversas fallas en la replicación del DNA, se disponen múltiples controles y redundancias a lo largo del ciclo, sobre todo en la transición de la fase G_1 a S.

Las células quiescentes pueden entrar a G_1 desde un estado de G_0 (primer paso que conduce hacia el ciclo celular), o tras completar la mitosis (en el caso de células que se replican de forma continua). Posteriormente, las células en G_1 progresan tras el ciclo, alcanzando un estado crítico entre la transición G_1/S , llamado punto de restricción; paso limitante de la velocidad de replicación, así como un punto de control que vigila la integridad del DNA antes de la replicación. Una vez superado este punto de restricción, las células quedan comprometidas de forma irreversible para la replicación. Sin embargo, cuando las alteraciones del DNA son demasiado graves para su reparación, estas

células entraran en un proceso de apoptosis, o bien, en un estado de no replicación llamado senescencia. Es posible también que defectos en estos puntos de control, permitan que células con daños graves a nivel genómico se dividan, ocasionando mutaciones en las células hijas, lo que a su vez puede llevar a la formación de neoplasias.

1.6 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son péptidos que regulan la proliferación de diferentes tipos celulares, que de igual forma pueden fomentar la supervivencia celular, el movimiento, la contractilidad, la diferenciación y la angiogénesis, funciones de vital importancia en el proceso de reparación. Todos los factores de crecimiento actúan como ligandos que se unen a receptores específicos, los cuales conducen las señales a las células diana; señales que pueden inducir la transcripción de genes que controlan la entrada o progresión dentro del ciclo celular. Múltiples estudios han demostrado efectos benéficos por parte de estos factores de crecimiento, sin embargo, el rol de los factores de crecimiento endógenos en la respuesta reparadora y regeneradora han sido sólo parcialmente descritos, y en la mayoría de los casos, la función sugerida de estas moléculas está basada en estudios descriptivos y/o datos recolectados a partir de cultivos celulares (Werner 2003).

A continuación se describen algunos de los factores de crecimiento importantes en el proceso de reparación tisular.

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante α (TGF- α). El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) es una familia de mitógenos dentro de los que se incluye el Factor de Crecimiento Transformante alfa (TGF- α). Todos los miembros de esta familia ejercen su función al unirse a cuatro diferentes receptores de alta afinidad: EGFR1/Erb1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4, tirosina quinasas transmembranales expresadas en gran variedad de tipos celulares. Estos receptores modulan etapas claves del desarrollo de un organismo, tales como proliferación celular, motilidad, diferenciación y homeostasis del tejido; lo cual se lleva a cabo por la

activación de diversas vías de transducción en las cuales se incluyen las cascadas de RAS/RAF/MEK/ERK, PLC-gamma/PKC, P13K/AKT, JAK/STAT, NF- κ B (Campbell *et al.*, 2014). Estos receptores requieren dimerizarse, lo cual es un proceso independiente de la acción de las citocinas, aunque estas últimas son necesarias para su activación, sin embargo, también se ha reportado que existe una considerable cantidad de dímeros preformados de EGFR en la superficie celular (Poger *et al.*, 2014).

Se reportan 3 principales funciones biológicas y de mayor importancia en la reparación: citoprotección, mitogénesis y migración (Bodanar *et al.*, 2011). Originalmente, TGF- α fue extraído de las células de un sarcoma transformado por virus y se encontró que participa en la proliferación de células epiteliales en embriones y adultos, así como en la transformación de células normales que pueden dar origen a cáncer. TGF- α muestra cierta homología con EGF, ya que puede unirse a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y comparten algunas de sus actividades biológicas (Toru, 2014).

Con ayuda de técnicas histológicas y de ELISA, en un modelo de lesión cutánea fue posible observar un aumento en la cantidad de receptores antes del aumento del grosor de la epidermis afectada; luego de este aumento, siguió un decremento de EGFR que resultó posteriormente en la disminución del espesor de la epidermis. Este patrón de expresión sugiere que EGFR juega un papel importante en la reepitelización de heridas cutáneas (Campbell *et al.*, 2014).

Todos los ligandos de EGFR son sintetizados en su forma anclada a membrana, las cuales son procesadas en el retículo endoplasmico para que el receptor se exprese en la membrana celular. La forma transmembranal también es capaz de estimular el crecimiento de células adyacentes. Sin embargo, se ha observado que cuando se suprime el procesamiento proteolítico del ligando, se ve suprimida la migración de queratinocitos, además ocasiona un marcado retraso en la reparación de heridas (Werner *et al.*, 1998).

El EGF es mitogénico para diversas células epiteliales, hepatocitos y fibroblastos, distribuido de forma amplia en secreciones y líquidos tisulares. Los queratinocitos, macrófagos y otras células inflamatorias reclutadas durante la cicatrización de una herida, son los encargados de producir EGF y FGF, que son considerados los principales estimuladores de la migración de fibroblastos, así como del fenómeno de contracción de la herida (Ramírez, 2010).

Factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF). Aislado inicialmente de plaquetas y suero, posteriormente fue demostrado como idéntico a un factor previamente identificado y aislado en los fibroblastos llamado factor de dispersión.

HGF tiene efectos mitogénicos sobre los hepatocitos y células epiteliales, incluidas las células de revestimiento. Durante el desarrollo embrionario, HGF suele comportarse como un morfógeno, induciendo la dispersión y migración celular, fomentando también la supervivencia de los hepatocitos. Es producido por los fibroblastos y la mayor parte de las células mesenquimales, endoteliales y células hepáticas no parenquimatosas (Gurtner *et al.*, 2008).

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Familia de proteínas constituida por proteínas de doble cadena que pueden existir en tres isoformas (AA, AB, BB). PDGF es producido por macrófagos activados, células endoteliales, musculares lisas y muchas células neoplásicas; se almacena en los gránulos de las plaquetas y se libera cuando estas se activan. Después de ocurrir una herida, PDGF se libera en grandes cantidades mediante la degranulación de plaquetas. Ejerce sus funciones al unirse a tres diferentes receptores de tirosina quinasa transmembranales. Se ha sugerido que tiene dos funciones principales, pero distintas, durante la reparación de una herida: tiene una función temprana que condiciona la migración y proliferación de fibroblastos y la secreción de MEC, así como la migración de células musculares lisas y monocitos hacia la zona de inflamación y cicatrización en las heridas cutáneas; su otra función induce el fenotipo miofibroblasto como consecuencia de la estimulación de los fibroblastos para obtener matrices de

colágena, lo que induce a estas células a cambiar a dicho fenotipo (Werner *et al.*, 2003).

La expresión de PDGF y sus receptores se vio afectada en heridas de ratones diabéticos (*db/db*) genéticamente modificados, con afección de la reparación, indicando que cierto nivel de expresión de PDGF y sus receptores, es esencial en el proceso de reparación (Werner *et al.*, 2003).

Por otra parte, el aumento de la secreción de PDGF puede estar involucrado en la patogénesis de la cicatrización hipertrófica y queloide, como sugiere el potente efecto de PDGF en la proliferación de fibroblastos y la producción de MEC por estas células (Werner *et al.*, 2003).

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Los VEGF son una familia de proteínas homodiméricas que incluyen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF (Factor de crecimiento placentario). Esta familia ejerce su función biológica a través de tres diferentes receptores de tirosina quinasa (Werner and Grose 2003). La mayor expresión del gen VEGF-A es justo después de una lesión cutánea, siendo los queratinocitos y macrófagos sus mayores productores, lo que apoya su importancia en el proceso de reparación. Además, sus receptores también fueron detectados en vasos sanguíneos del tejido de granulación, lo que sugiere su participación en la angiogénesis, mediante estímulos parácrinos (Werner and Grose 2003). Así mismo, VEGF es un potente inductor de la formación de vasos durante las fases tempranas del desarrollo (vasculogénesis) y tiene un papel esencial en el crecimiento de nuevos vasos en individuos adultos, durante la inflamación crónica, cicatrización de las heridas y en los tumores. Esto se ha podido demostrar cuando se aplican antígenos neutralizantes anti-VEGF-A, lo que ocasiona una súbita disminución de la angiogénesis en las heridas (Johnson y Wilgus, 2014).

Diversos tipos celulares como los fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, son capaces de producir VEGF. Se ha reportado que se expresa en niveles basales en piel intacta, pero su expresión aumenta en queratinocitos durante la reparación. VEGF quizás sea crucial para la

angiogénesis durante la fase de proliferación del tejido de granulación. Debido a su potente acción de vasopermeabilidad, la cual permita la extravasación de proteínas, también es conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF) (Li *et al.*, 2003).

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Familia de factores de crecimiento con más de veinte miembros de los que son mejor conocidos el FGF ácido (aFGF o FGF-1) y básico (bFGF o FGF-2), y FGF-7 (llamado factor de crecimiento de los Queratinocitos o KFG). Sus señales son enviadas a través de cuatro proteínas tirosina quinasa transmembranales de alta afinidad, los llamados receptores de FGF (FGFR1-4). Una propiedad característica de los FGF es su interacción con proteoglicanos de heparina o heparán sulfato, los cuales estabilizan a los FGF para prevenirlos de la desnaturalización térmica y proteólisis, y limita fuertemente su difusión. Aun más importante, la interacción con heparina y heparán sulfato activa los receptores de señalización (Werner and Grose 2003). FGF-2 unido a heparán sulfato también muestra una actividad prolongada; esto ha sido demostrado en células endoteliales, en donde diez minutos de exposición a FGF-2 más heparán sulfato, estimuló durante más tiempo la producción de activador de plasminógeno, que cuando únicamente se utilizó FGF-2 (Schultz *et al.*, 2008).

La mayoría de los miembros de la familia de los FGF tienen un amplio espectro mitogénico. Estimulan varias células de origen mesodérmico, ectodérmico e incluso de origen endodérmico (Werner and Grose, 2003). Además de su efecto mitogénico, también regula la migración y diferenciación de sus células blanco; algunos FGF han demostrado ser citoprotectores, ayudando a mantener la supervivencia celular durante condiciones de estrés (Werner *et al.*, 1992).

Mediante el uso de inmunohistoquímica, FGF ha sido localizado en piel lesionada. En un modelo de herida por incisión en ratones, FGF2 fue hallado extracelularmente en la superficie de la herida, así como entre la dermis adyacente, esto únicamente en animales adultos (Withby *et al.*, 1991). En otro estudio similar, FGF2 se encontró asociado a folículos pilosos localizados en

los bordes de la herida, al igual que en queratinocitos basales del epitelio normal e hiperproliferativo de la epidermis dañada, aunque sorprendentemente no se encontró inmunoreactividad en el tejido de granulación dérmico (Kurita *et al.*, 1991). La expresión de FGF-1, FGF-2, FGF-5 y FGF-7 se indica como un hallazgo común tanto en piel normal como lesionada, pero la expresión de todos estos incrementa después de una lesión (Toru, 2014). En especial FGF-7, cuya transcripción del RNAm para dicho factor puede incrementarse hasta 160 veces después de una lesión cutánea, inducción única de tal magnitud, lo que no solo señala su importancia en la renovación fisiológica de la epidermis, sino también como un orquestador en la proliferación celular de la epidermis en el proceso de reparación de una herida (Werner *et al.*, 1992).

El papel de FGF2 en el proceso de reparación tisular fue establecido en experimentos con ratones carentes de FGF2, usados en estudios de reparación y regeneración de heridas. Curiosamente, estos ratones parecían indiferenciables de sus compañeros que no tenían dicho defecto. Sin embargo, cuando fueron desafiados mediante una incisión, los ratones deficientes de FGF2 mostraron un retraso importante en la reparación. En contraste, no se encontraron anomalías en la reparación en ratones cuya expresión de FGF1 fue suprimida (Werner and Grose, 2003). En adición a su efecto mitogénico, también promueven la proliferación y diferenciación endotelial, así como la migración de estas mismas células en la fase temprana de la reparación y durante la formación del tejido de granulación, la primera mediante el aumento del plasminógeno tipo uroquinasa, o bien, por la inducción de integrinas $\alpha\beta3$ en la superficie celular endotelial (Li *et al.*, 2003).

Los FGF contribuyen a la respuesta de cicatrización de las heridas, hematopoyesis y otros procesos a través de varios mecanismos:

- Reparación de las heridas: FGF-2 y KGF, contribuyen a reepitelizar las heridas cutáneas.
- Formación de nuevos vasos (angiogénesis): FGF-2 es especialmente capaz de inducir la formación de nuevos vasos.

- Hematopoyesis: relacionado con la diferenciación de células sanguíneas específicas y con el desarrollo del estroma de la médula ósea.
- Desarrollo: los FGF juegan un papel importante en el desarrollo del músculo cardíaco y esquelético, maduración del pulmón.

Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factores de crecimiento relacionados. Familia constituida por alrededor de 30 proteínas, entre las que se incluyen tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3). TGF- β 1 es la más común en los mamíferos, es producida por plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. Esta proteína tiene múltiples efectos, frecuentemente contradictorios, según el tejido y el tipo de lesión (Deminovarice *et al.*, 2012).

Inmediatamente después de ocurrida la lesión, TGF- β 1 es liberado en grandes cantidades por las plaquetas. Esta forma inicial derivada de las plaquetas actúa como quimiotáctico para neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, y estas células en otros tipos celulares a la aumentar los niveles de TGF- β 1. Esta combinación de diferentes fuentes celulares y almacenajes temporales aseguran el abastecimiento continuo de TGF- β durante todo el proceso de reparación (Werner and Grose 2003).

TGF- β inhibe el crecimiento de la mayoría de las células epiteliales. Sin embargo, también se ha sugerido que puede estimular la re-epitelización y la formación de tejido de granulación, lo que como se comentó antes, hace su efecto “paradójico”. Es un potente agente fibrogénico que estimula la quimiotaxis de los fibroblastos e induce la producción de colágena, fibronectina y proteoglicanos; inhibe la degradación del colágena al reducir las proteasas de la matriz y al aumentar la actividad de los inhibidores de las proteasas (Igotz 1986). Además, TGF- β cuenta con una potente acción antiinflamatoria, pero puede fomentar algunas funciones inmunitarias.

El TGF- β 1 puede ser considerado como el inductor directo del fenotipo miofibroblástico, debido a que es capaz de aumentar la síntesis de actina de

músculo liso, lo cual se cree que puede generar el incremento de la fuerza contráctil en el miofibroblasto, hecho que se correlaciona con el incremento de actina de músculo liso en el sitio de lesión. Esto se ha observado mediante la aplicación exógena de TGF- β 1, la cual aumenta la contracción de los miofibroblastos en mallas de colágena en una forma dosis dependiente, a través del aumento de miofibroblastos y de la expresión de actina de músculo liso (Vaughan *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Brown *et al* en 1995, en el cual se utilizaron ratones transgénicos deficientes del gen *tgf- β 1*, que transcribe para TGF- β 1, se observó que no mostraban anomalías en el desarrollo y parecían fenotípicamente normales, hasta tres semanas después, cuando desarrollaron síndrome de emaciación acompañado de una respuesta inflamatoria multifocal, resultando en una falla multisistémica y muerte. Los ratones fueron desafiados a los diez días de edad mediante un corte escisional. En los primeros días, las heridas parecían sanar normalmente en los ratones TGF- β 1 deficientes. Aunque en la valoración histológica, al día diez posterior a la realización de la herida, fue revelado un tejido de granulación de menor grosor y menos vascularizado en los ratones transgénicos. Esto sugiere que la falta de TGF- β 1 puede ser compensada por otras isoformas del factor durante la etapa temprana del proceso de reparación, lo que indica el papel primordial que juega TGF- β 1 en la etapa tardía del proceso (Brown *et al.*, 1995). Aunque el papel de TGF- β 1 durante la reparación puede considerarse bifásico, ya que inicialmente puede incrementar la migración de fibroblastos a la herida, por su habilidad para estimular su quimiotaxis y migración celular. Fuerzas de tracción ejercidas por este fenómeno pueden promover el cierre inicial de la lesión; con el tiempo, la tensión comenzará a desarrollarse y bajo estas condiciones los fibroblastos llegarán a adquirir el fenotipo de miofibroblastos, con la formación de fibras tensiles (Vaughan *et al.*, 2000).

Citocinas. Las citocinas realizan importantes funciones como mediadores de la inflamación y las respuestas inmunitarias. Algunas de ellas pueden ser

consideradas de igual manera como factores de crecimiento, debido a su actividad inductora de proliferación en algunas líneas celulares.

Entender el mecanismo por el cual la unión de un factor de crecimiento con su receptor induce la transmisión de una señal a través del citoplasma celular es importante. Por mucho tiempo fue aceptado que la activación del receptor resultaba a causa de la dimerización del mismo más la subsecuente unión del ligando. Actualmente, estudios de algunos receptores de citocinas sugieren que la dimerización, por si sola, no es capaz de inducir su activación. En su lugar, reconfiguraciones conformacionales dentro de los protómeros (sitios de unión de tres moléculas) son consideradas de mayor importancia. Los receptores de tirosina quinasa, son miembros de los receptores de membrana de citocinas, con un dominio intramembranal que posee actividad fosforilativa (Poger *et al.*, 2014).

1.7 Matriz extracelular (MEC) e interacciones célula-matriz

La reparación y regeneración no solo dependen de los factores solubles, sino también de las interacciones entre las células y los componentes de la matriz extracelular (MEC). Además de brindar turgencia a los tejidos, la MEC regula procesos tales como el crecimiento, proliferación y movimiento de las células que se encuentran asociadas a ella. Se remodela de forma constante en un ciclo de síntesis y degradación durante la morfogénesis, regeneración y cicatrización de las heridas. La síntesis y deposición de MEC ocurre mayoritariamente en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y estímulos físicos mediados por receptores localizados en la superficie celular (Schultz *et al.*, 2008). Sus diversas funciones incluyen las de soporte mecánico, control del crecimiento celular, mantenimiento de la diferenciación celular, andamiaje para la renovación tisular, establecimiento de un microambiente tisular, así como almacenamiento y presentación de proteínas reguladoras. Las heridas crónicas que no sanan, no pasan por las fases normales de reparación, por lo que se cree que esto es en gran parte debido a interacciones alteradas entre los factores de crecimiento y la MEC (Wilgus, 2012). Además, estudios recientes indican que los cambios en la matriz pueden ocurrir incluso antes de alguna

lesión, hecho que parece predisponer a individuos a procesos de reparación de tipo crónico (Schultz *et al.*, 2008).

La MEC está compuesta principalmente por tres tipos de macromoléculas: proteínas estructurales fibrosas, como colágena y elastina, que aportan fuerza tensil y capacidad retráctil; glucoproteínas adhesivas, que conectan a sus elementos entre ellos.

El tapón de fibrina por sí solo constituye una matriz extracelular provisional, que por sí mismo puede inducir la secreción de IL-8 por células endoteliales, al igual que TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP-1, MIP-2 y MCP-1 por linfocitos mononucleares (Marquart *et al.*, 2014).

Adherencia celular a la MEC es requerida para la respuesta a factores de crecimiento: En la superficie celular hay un gran número de moléculas de adhesión a la MEC, que facilitan el contacto célula-célula o célula-matriz. Dichas interacciones activan la migración y señales de crecimiento y diferenciación. Estas moléculas están involucradas en interacciones diferentes: aquéllas que se unen en la superficie basal de la célula y funcionan como receptores de adhesión célula matriz, como las integrinas y los receptores CD44; moléculas presentes en el punto de contacto entre células adyacentes que mantienen la adhesión entre ellas, tal es el caso de las cadherinas y las moléculas de adhesión intercelular 1 y 2 (ICAM-1, ICAM-2) (Mutsaer *et al.*, 1997). Con unas cuantas excepciones, las células deben adherirse a la MEC para sobrevivir y crecer. Es bien sabido que la propiedad clave que separa a las células tumorales de células normales, es la necesidad de anclaje a la MEC para su sobrevivencia y crecimiento (Schultz, 2008). Finalmente, aquéllas moléculas presentes en la superficie luminal con funciones de adhesión célula-célula, importantes en la adhesión leucocitaria y plaquetaria, como la molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial 1 (PECAM-1) (Mutsaer *et al.*, 1997).

Las integrinas son la familia principal de receptores de la superficie celular que regulan la adhesión a la MEC. Las integrinas se encuentran involucradas de manera crítica en la sobrevivencia celular, apoptosis, crecimiento, desarrollo, y

eventos de fosforilación durante la traducción de señales (Schultz *et al.*, 2008), migración celular, deposición de MEC y contracción de la herida (Mutsaer *et al.*, 1997).

La adhesión celular a la MEC induce la expresión de factores de crecimiento: El mantenimiento del crecimiento del epitelio estratificado de la dermis, es un claro ejemplo de que MEC interviene en proliferación celular *in vivo*, ya que las células que están en contacto con la lámina basal se encuentran en constante división, mientras que las células que ya no se encuentran adheridas migran hacia arriba, cambian de forma y se diferencian en las capas superiores de la epidermis.

Regulación de MEC por los factores de crecimiento: Los factores de crecimiento también regulan la MEC estimulando a las células a aumentar la producción de sus componentes, o aumentando la síntesis de metaloproteinasas (MMP) que sintetizan a la MEC. De este modo, las interacciones entre factores de crecimiento y la MEC son bidireccionales (Schultz *et al.*, 2008) (Cuadro 1).

Implicaciones en heridas crónicas y difíciles de sanar: En heridas crónicas y aquellas que atraviesan por procesos complicados de reparación, la interacción entre la MEC y los factores de crecimiento se encuentra alterada, las causas más frecuentes suelen ser anomalías sistémicas, como diabetes e insuficiencia venosa. De hecho, las heridas crónicas están fundamentalmente caracterizadas por anomalías bioquímicas de la MEC, al igual que niveles incrementados de proteasas, tales como las MMP y elastasas liberadas por los neutrófilos (Schultz *et al.*, 2008), lo que puede modificar la actividad de algunos factores de unirse a sus receptores, como el FGF-2 (Wilgus *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Resumen y ejemplos de las interacciones entre componentes de la MEC y factores de crecimiento

| Descripción | Ejemplo |
|--|--|
| Factores de crecimiento unidos a componentes de la MEC | FGF-2 debe unirse a cadenas de heparán sulfato para actuar como mitógeno |
| Interacciones mediadas por integrinas | La presencia de integrinas es necesaria para la |

| | |
|---|---|
| | angiogénesis inducida por VEGF |
| Componentes de la MEC | Migración de fibroblastos |
| Regulación de factores de crecimiento por parte de la MEC | TGF- β controla la producción y degradación de la MEC |

MEC, matriz extracelular; TGF, factor de crecimiento transformante; FGF, factor de crecimiento fibroblástico; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular (Schultz *et al.*, 2008)

Matriquinas: Las matriquinas son dominios específicos de macromoléculas extracelulares, liberadas por proteólisis, capaces de unirse a receptores celulares de superficie, activarlos y regular muchas de las actividades celulares (Marquart *et al.*, 2014). Pueden dividirse en dos grupos: matriquinas naturales, las cuales son capaces de señalizar en su forma original; mientras que las matricriptinas (o matriquinas crípticas) requieren un cambio conformacional o corte proteolítico para llegar a ser matriquinas funcionales. Como ejemplo está la proteína laminar 332, la cual contiene repeticiones de unidades parecidas a los EGF, por lo que pueden ser traducidas a través de los EGFR, sin embargo, la proteína laminar 332 es considerada una matricriptina ya que tiene que ser cortada por MMP para exponer las repeticiones de unidades parecidas a EGF (Wilgus *et al.*, 2012).

Mucha de la información publicada sugiere que las matriquinas quizás tengan un papel preponderante en el control del proceso de reparación. Éstas pueden ser producidas durante la degradación proteolítica de la MEC. Por ejemplo, se demostró que la reparación fue severamente afectada en ratones deficientes de colagenasas y plasminógeno, y se ha observado que productos de la degradación proteolítica de la MEC, funcionan como potentes quimiotácticos de neutrófilos (Marquart *et al.*, 2014).

1.8 Reparación mediante la formación de cicatrices y fibrosis

Si la gravedad de la lesión, el daño celular y daño al soporte estructural son graves, el tejido no podrá repararse por regeneración. En estos casos, el proceso de reparación se realizará mediante la deposición de colágena y otros componentes de la MEC, lo que determina la formación de una cicatriz. En

lugar de la regeneración de los tejidos, lo que ocurre es una respuesta fibroproliferativa que sustituye el tejido en lugar de recuperarlo. La reparación mediante depósito de tejido conjuntivo se desarrolla de la siguiente manera:

- Inflamación
- Angiogénesis
- Migración y proliferación de fibroblastos
- Formación de cicatriz
- Remodelación de tejido conjuntivo

En la mayoría de los casos en el proceso de cicatrización se produce una combinación de reparación y regeneración, y esto se verá determinado por: 1) la capacidad proliferativa de las células, 2) la integridad de la MEC y 3) resolución de la cronicidad. Cuando una lesión persiste, se favorece el crecimiento excesivo de tejido conjuntivo, fenómeno conocido como fibrosis.

1.9 Mecanismos de angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fundamental que afecta reacciones tales como la regeneración y cicatrización de las heridas, procesos isquémicos y menstruación. Se le denomina angiogénesis o neovascularización a la formación de vasos en organismos adultos, puede consistir en la ramificación y extensión de vasos previos, o bien, puede producirse por la estimulación y reclutamiento de células endoteliales progenitoras en la médula ósea. Este evento tan complejo es estrictamente regulado por diversos factores solubles que actúan de forma consecutiva y concertada. El factor de crecimiento vascular (VEGF), angiopoyetinas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), son algunas de las sustancias críticas en la angiogénesis (Li *et al.*, 2003). La hipoxia también actúa como regulador de este proceso, pues se ha encontrado que el gradiente de oxígeno en la herida es menor que en todo el tejido que lo rodea, siendo el centro de la lesión hipóxico con respecto al tejido adyacente, lo cual puede ser ocasionado por el aumento de la distancia de la fuente de oxigenación (capilares), en adición a la actividad fagocítica consumidora de oxígeno de los

macrófagos (Benavides, 2008). La tensión baja de oxígeno, al igual que altas concentraciones de lactato o iones de hidrógeno, observado también en el área afectada, puede convertir a los macrófagos en angiogénicos (fenotipo M2) (Mahdavian *et al.*, 2011).

Angiogénesis a partir de vasos preexistentes. En este tipo de neovascularización primero se observa vasodilatación a causa del óxido nítrico y aumento en la permeabilidad mediada por VEGF, a esto le sigue la degradación de la membrana basal del vaso original mediada por las metaloproteinasas de la matriz (MMP), posteriormente, las células endoteliales comenzarán a migrar hacia el estímulo angiogénico, seguido por la proliferación de células endoteliales. Después de esto, comienza la maduración de las células endoteliales, lo que da lugar a la inhibición del crecimiento y remodelado del tubo capilar, finalmente ocurre el reclutamiento de células periendotheliales, como los pericitos y células musculares lisas vasculares, para dar lugar a un vaso maduro. (Hang *et al.*, 2013).

Angiogénesis a partir de células precursoras endoteliales (CPE). Las CPE son reclutadas desde la médula ósea hacia los tejidos para dar paso a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estas células también pueden contribuir a la re-endotelización de los implantes vasculares en los procesos isquémicos, las heridas cutáneas y los tumores, ya que las CPE circulantes aumentan cuando hay isquemia, lo que sugiere que pueden participar en la función vascular y determinar el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares.

1.10 Reparación de heridas cutáneas

La curación de heridas cutáneas puede dividirse en tres fases: inflamación, proliferación y maduración. Debido a que algunos de los sucesos de cada etapa se traslapan, esta división suele ser subjetiva, pero es de ayuda para entender la secuencia de acontecimientos que suceden durante la cicatrización cutánea.

La forma más sencilla de reparación de una herida cutánea es la cicatrización de una incisión quirúrgica no infectada que se aproxima por puntos. A este tipo de reparación se le denomina cicatrización por primera intención; en ésta se produce una reepitelización para cerrar la herida con formación de una cicatriz relativamente fina. La situación es otra cuando se produce una herida escisional con amplia pérdida de células y tejidos. La curación de este tipo de heridas se encuentra asociada a reacciones inflamatorias intensas, con formación de abundante tejido de granulación y amplios depósitos de colágena, que dan lugar a una cicatriz importante que en general se contrae con el tiempo, a este tipo de curación se le denomina cicatrización por segunda intención. A pesar de las diferencias citadas, los mecanismos básicos de cicatrización por primera o segunda intención, son parecidos. A continuación se comenta la secuencia de acontecimientos en la cicatrización de una herida (Schultz y Wysocki, 2009).

Fase inflamatoria

La inflamación es una importante consecuencia al daño, la cual normalmente lleva a la reparación del tejido y a la restauración de su función. La respuesta inflamatoria puede ser subdividida en respuesta vascular y celular (Li jie *et al.*, 2007).

Respuesta vascular y hemostasis (formación del coágulo). El daño tisular ocasiona disrupción de vasos sanguíneos y consecuentemente hemorragias, las plaquetas se adhieren, comenzando a aglutinarse y a liberar mediadores que facilitan la coagulación. Aunque la hemostasis es la principal función de la coagulación sanguínea, una función secundaria de las plaquetas, pero de igual importancia, es el iniciar la respuesta de reparación vía liberación de factores quimiotácticos y crecimiento (Li jie *et al.*, 2007). El coágulo está compuesto por eritrocitos, fibrina, fibronectina y componentes del complemento, cuya función es detener la hemorragia y servir como soporte para las células que migran atraídas por las citocinas y quimiocinas liberadas en la zona. En 24 horas aparecen neutrófilos en los márgenes de la incisión que aprovechan el andamiaje del coágulo y ayudan a remover restos celulares y bacterias invasoras a través de fagocitosis.

Respuesta celular e inflamación. La respuesta celular en la fase inflamatoria es caracterizada por la infiltración leucocítica en el área afectada. En la fase inflamatoria temprana, neutrófilos y monocitos son las poblaciones celulares predominantes en el sitio de lesión, siendo los neutrófilos los primeros en llegar; posteriormente, el número de neutrófilos declina y los macrófagos predominan (Li jie *et al.*, 2007). Neutrófilos y macrófagos son reclutados por las sustancias quimiotácticas liberadas por los mastocitos (histamina e interleucinas) y por factores generados durante la coagulación (fibrinógeno y fibrinopéptidos). La infiltración neutrofílica sólo dura un par de días, pero la existencia de contaminación en la herida puede prolongar su presencia e interferir en la reparación (Li jie *et al.*, 2007). Dentro de las primeras horas también los linfocitos T se infiltran en la epidermis y se adhieren a los queratinocitos, activándose ambos para generar citocinas pro-inflamatorias. IL-1, IL-6, TNF- α y GM-CSF son producidos por los queratinocitos, e IL-2, IL-3 e IL-4 por los linfocitos T (Atif *et al.*, 1999).

Estudios recientes *in vitro* han demostrado que los neutrófilos aislados del sitio de reparación pueden modular el fenotipo y el perfil de expresión de citocinas por parte de macrófagos, llegando a regular la respuesta inmune innata durante la reparación (Emig *et al.*, 2007). Por otro lado, es importante tener en cuenta que aún no se ha definido claramente el papel de los neutrófilos en la reparación, ya que en un estudio realizado con ratones neutropénicos se encontró que estos ratones pasan por un proceso más rápido de reepitelización, no se observaron efectos sobre la resistencia y fuerza del colágena, y no hubo influencia sobre el número de macrófagos en el sitio de lesión; finalmente, en ratones diabéticos la afectación típica en el proceso de reparación se vio disminuida en ratones con depleción neutrofílica, hallazgos que de hecho sugieren que los neutrófilos retardan la reepitelización (Dovi, 2003). De igual manera, se ha reportado que la presencia de neutrófilos no es esencial para la colonización de fibroblastos y angiogénesis para la posterior formación del tejido de granulación, dejándole únicamente un papel de importancia en la remoción de glóbulos en el área afectada (Christian *et al.*, 2005).

En otro estudio realizado por Delvalajara *et al* (2000), en el cual utilizaron ratones deficientes del receptor de quimiocina CXC-2 (CXCR-2), se observó que los ratones exhibían una resolución de la herida retardada, que *in vivo* parece estar relacionada con un pobre reclutamiento de neutrófilos durante la fase aguda de la fase de inflamación; también se ha encontrado que los neutrófilos pueden regular la expresión de genes (aumentando la de los genes anti-apoptóticos y disminuyendo la de los apoptóticos), destruyen las formaciones de fibrina, degradan la MEC, y promueven la migración de poblaciones celulares importantes al sitio de lesión, como queratinocitos y fibroblastos (Theilgaard-Monch *et al.*, 2004). Lo que está claro es que los neutrófilos son una de las principales fuentes de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Mahdavian *et al.*, 2011).

Se ha reportado que las células NK actúan mayoritariamente en la fase temprana de la reparación. Estas células aparecen en grandes cantidades a las 24 horas post-agresión y alcanzan su pico para el día 3; posteriormente su número decae a niveles indetectables, lo que es seguido por el periodo de predominancia neutrofílica. Su función está relacionada con la defensa de microorganismos patógenos (Atif *et al.*, 1999).

Para el caso de los macrófagos, son atraídos por las mismas sustancias que atraen a los neutrófilos, pero su reclutamiento continúa, mediado por sustancias quimiotácticas específicas para monocitos. Los macrófagos son considerados las células regulatorias más importantes en la reacción inflamatoria; fagocitan, digieren, eliminan patógenos, limpian desechos tisulares, destruyen cualquier neutrófilo remanente, y liberan factores quimiotácticos que atraen a los fibroblastos. Los macrófagos pueden ser considerados como verdaderas fábricas de producción de factores de crecimiento, tales como PDGF, FGF, VEGF y TGF (Li jie *et al.*, 2007) (Cuadro 2).

Mecanismos de resolución inflamatoria. La reparación exitosa después del daño tisular requiere de la resolución de la respuesta inflamatoria, esto se logrará mediante mecanismos que pueden incluir: disminución de la expresión

de quimiotácticos mediante citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 o el TGF- β , o bien, mediante el aumento en la síntesis de moléculas anti-inflamatorias como el antagonista de los receptores a IL-1 o receptores solubles del TNF (Emig *et al.*, 2007).

En el 2002 se identificó que el Nrf-2, un factor de transcripción activado por el factor de crecimiento de queratinocitos 1, regula la respuesta inflamatoria durante la reparación; se pudo observar que en ratones carentes de este factor, la reparación de las heridas se caracterizó por una respuesta inflamatoria prolongada. De igual forma se ha estudiado la influencia de las hormonas reproductivas sobre este proceso, área en la que se ha demostrado que la reducción de los niveles de estrógenos trae como consecuencia inflamación y cicatrización excesiva (Emig *et al.*, 2007).

Cuadro 2: Fase inflamatoria de la reparación: asociación con tiempo, cambios visibles y constituyentes microscópicos (Baum, 2005)

| Tiempo aprox. | Proceso | Cambios visibles asociados | Células | Componentes de la MEC | Reguladores clave |
|-----------------|-------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|---|
| 0 a 15 min | Hemostasia | Palidez | Células endoteliales | | Epinefrina Prostaglandinas Tromboxanos |
| | | Formación de coágulo | Plaquetas Células endoteliales | Fibrina Fibronectina | Trombina |
| 15 min a 6° día | Inflamación | Rubor, calor, tumor y dolor | Células endoteliales Mastocitos Neutrófilos Macrófagos Linfocitos T | Matiz provisional a base de fibrina | Sistema nervios simpático Histamina Cininas Leucotrienos Trombina Complemento PDGF IL-8 GRO-2 α / CXCL-1 TGF- β IL-1 α IL-1 β IL-6 TNF- α |

Fase de proliferación

En esta fase la actividad celular predomina. Es aquí cuando se construye la barrera permeable (re-epitelización), se establece una apropiada irrigación sanguínea (angiogénesis) y se refuerza el tejido dérmico dañado (fibroplasia).

Reepitelización. Es un proceso de restauración de una epidermis intacta después de una lesión. Generalmente involucra muchos fenómenos, incluida la migración de queratinocitos epidermicos adyacentes a la herida, la proliferación de queratinocitos con el fin de abastecer a la nueva capa creciente, la diferenciación de neoepitelio a epidermis estratificada, y la restauración de una zona con membrana basal intacta que conectará la epidermis y la dermis subyacente. El TGF- β 1 es considerado uno de los ligandos más importantes en la migración de células epiteliales durante la re-epitelización, ya que estimula la producción de subunidades de integrinas que a su vez promueven la migración de queratinocitos a la MEC provisional. Otros factores de crecimiento importantes para este fenómeno son el EGF, TGF- α , KGF y el EGF unido a heparina HB-EGF (Mahdavian *et al.*, 2011).

Recientemente, el reconocimiento de nuevas funciones por parte de los microRNA's (miRs) en queratinocitos y células endoteliales ha ampliado la complejidad de este fase, ya que se ha demostrado que en ratones deficientes de miR-155 ocurre una mejora del cierre de la herida cuando son comparadas con el tipo silvestre. Con una menor cantidad de área de tejido de granulación, sorprendentemente la aceleración del cierre de la herida estuvo asociada con la presencia de un mayor número de macrófagos en el sitio de lesión, y aún más importante, se halló formación *de novo* de folículos pilosos en los bordes de la lesión (Soligen *et al.*, 2014).

Angiogénesis y formación de tejido de granulación. El tejido de granulación es un tipo especializado de tejido formado por la proliferación de fibroblastos y

células endoteliales formado durante las primeras 24 a 72 horas del proceso de reparación. Su típica apariencia histológica consiste en la presencia de pequeños vasos de nueva formación (angiogénesis) y proliferación de fibroblastos; debido a que los vasos tienen fugas, presenta edema. La cantidad de tejido de granulación depende del tamaño del defecto tisular creado por la herida y de la intensidad de la inflamación. De 5 a 7 días posteriores al daño tisular, el tejido de granulación llena la zona afectada y la angiogénesis alcanza su punto más alto (Wong et al., 2007).

Proliferación celular y depósito de colágena (Fibroplasia). Los macrófagos que sustituyen a los neutrófilos, son células con mayor capacidad de eliminar restos celulares y cuerpos extraños e inducir la angiogénesis y la remodelación de la MEC. Estos macrófagos son atraídos por quimiocinas, TNF, PDGF, TGF- β y FGF y pueden mostrar distintos fenotipos funcionales, por lo que pueden ser divididos en dos grupos: macrófagos M1 (activados por la vía clásica) y M2 (activados por la vía alterna). Existen diferentes estímulos para causar la diferenciación en estos dos fenotipos, siendo el principal para los M1 productos bacterianos similares a lipopolisacáridos (LPS) y citocinas inflamatorias, como el interferón. El fenotipo M1 exhibe propiedades antimicrobianas por su liberación de mediadores de la inflamación como TNF- α , óxido nítrico e IL-6; citocinas capaces de inducir serios daños tisulares secundarios. Del lado contrario están los macrófagos activados por IL-4 e IL-13, diferenciándose en los llamados alternamente activados (M2), que suprimen la reacción inflamatoria e inmune específica, pero que a la vez se encargan de la remoción de restos celulares, promueven la angiogénesis y la remodelación del tejido. Es así como se presenta en la fase temprana, mayoritariamente (85%) el fenotipo M1 dentro de la población de macrófagos, que posteriormente tras fagocitar células apoptóticas, pueden revertir al fenotipo M2, contribuyendo a la resolución de la inflamación en esta etapa (Mahdavian *et al.*, 2011).

En esta fase, ya se reconocen fibras de colágena en los márgenes de la incisión. A las 24-48 horas, brotes de células epiteliales se desplazan desde el margen de la herida y depositan componentes de la membrana basal mientras

avanzan. Se fusionan en la línea media por debajo de la costra superficial, produciendo una capa de epitelio delgado que cierra la herida. Este proceso es mucho más lento en cicatrices por segunda intención, debido a que el espacio a cubrir es mucho más extenso. Los macrófagos estimulan la producción de KGF-7 (Factor de crecimiento de queratinocitos) e IL-16, que estimulan la migración y proliferación de queratinocitos. Entre los 8 y 14 días post incisión se ha reportado la mayor la cantidad de linfocitos T recultados, los cuales pueden persistir en pequeñas cantidades de 7 a 8 meses (Atif *et al.*, 1999).

Mientras la epitelización ocurre, aumenta la cantidad de fibrillas de colágena, que empiezan a crear un puente entre los bordes de la incisión. La fibroplasia describe un proceso de proliferación de fibroblastos, la cual comienza aproximadamente el día 4 y una vez que han llegado al sitio donde se produjo el daño tisular, gradualmente cambian a fenotipos pro-fibróticos, activando su función principal que es la síntesis de proteína (Jie Lie *et al.*, 2007). En un comienzo se produce una matriz provisional, que comprende fibrina, fibronectina plasmática y colágena tipo III, pero pronto es sustituida por una matriz de colágena de tipo I y con la presencia TGF- β , factor que aumenta la proliferación y migración de fibroblastos, aumenta la síntesis de colágena y disminuye su degradación mediada por metaloproteinasas. La importancia de los fibroblastos en el proceso de reparación se ha visto en los últimos años al ser incorporados en implantes sintéticos de piel, lo que ha resultado en una reparación tisular más rápida con un mejor proceso de cicatrización y excelentes resultados cosméticos (Wong *et al.*, 2007).

Formación de la cicatriz. Durante la segunda semana el infiltrado leucocitario, edema y aumento de la vascularización desaparecen. Debido al aumento de la cantidad de colágena dentro de la zona de la herida, comienza el blanqueamiento de la cicatriz. Entonces, el tejido de granulación ha quedado reducido a una cicatriz pálida, avascular, constituida por fibroblastos fusiformes, colágena denso, fragmentos de tejido elástico y otros elementos de la MEC. Los apéndices dérmicos destruidos en la herida no recuperan su forma, aunque las ratas pueden desarrollar nuevos folículos pilosos en las grandes heridas

bajo la estimulación del ligando Wnt, que se encarga de la estimulación de las células madre (Wang *et al.*, 2015).

Contracción de la herida. La contracción de la herida comienza tan pronto como es realizada y tiene su pico en la segunda semana. El grado de contracción de la herida puede variar según la profundidad de la misma, para heridas que abarcan todo el espesor de la piel, la contracción es un parte importante en la reparación, llegando a reducir el tamaño de la herida hasta en un 40% (Jie Lie *et al.*, 2003). El proceso de contracción ayuda a cerrar la herida, debido a que disminuye el espacio entre los extremos dérmicos y la superficie de la lesión. Por tanto, es un rasgo más importante en la cicatrización por segunda intención.

Los mediadores predominantes en este proceso contráctil son los miofibroblastos mediante la señalización ocasionada por el depósito previo de fibronectina y la exposición de TGF- β 1 (Serini *et al.*, 1998); debido a su capacidad de contracción y relajación, durante la formación del tejido de granulación, los fibroblastos gradualmente se transforman en miofibroblastos que se caracterizan por poseer microfilamentos de actina, similares a los vistos en células musculares lisas (Li jie *et al.*, 2007). Aunque se sabe que algunos factores de crecimiento, tales como PDGF o FGF-2, y algunas citocinas como el IFN γ , parecen inhibir este fenotipo de fibroblasto al interferir con la síntesis de actina (Desmouliere *et al.*, 1994), efecto que al parecer comparte la hormona de crecimiento (GH), debido a que en ratones que sobre-expresan la GH se ha observado un menor número de miofibroblastos en el sitio de lesión, sumado a esto, los miofibroblastos presentes mostraron una menor cantidad de fibras de actina, lo que dió como resultado una ineficiente contracción de la herida (Thorey *et al.*, 2004).

Comparado con los fibroblastos normales de la dermis, los miofibroblastos sintetizan una mayor cantidad de los componentes de la MEC (Mahdavian *et al.*, 2011) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fase proliferativa del proceso de reparación: asociación con tiempos, cambios visibles y constituyentes microscópicos (Baum, 2005)

| Tiempo aprox. | Proceso | Cambios visibles asociados | Células | Moléculas de adhesión | Componentes de la MEC | Reguladores clave y enzimas | |
|-----------------|---|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------|
| 24 a 48 horas | Desprendimiento de costra Neoepidermis | Reepitelización | Queratinocitos | Integrinas $\beta 1$ | Provisional ECM | MMP/TIMP | TGF- β |
| | | | | | Colágeno | FGF-2 | NGF |
| | | | | | Fibronectina | FGF-7 | HGF |
| | | | | | Vitronectina | FGF-10 | HB-EGF |
| | | | | | Tenascina E | GM-CSF | IL-6 |
| | | | | | Oxido Nítrico | Leptina | |
| 4° a 7° día | Tejido de Granulación | Angiogénesis | Células endoteliales | Integrina α, β_3 | Provisional ECM | MMP/TIMP | |
| | | | | | Colágeno | VEGF | |
| | | | | | GAG | FGF | |
| | | | | | Proteoglicanos | Angiopoyetina | |
| | | | | | | TGF- β | |
| | | | | | PDGF | | |
| 3° a 21° día | | Deposición de la red de colágeno | Fibroblastos | Integrinas | | | EGF |
| | | | | | | | IGF-1 |
| | | | | | | | FGF-2 |
| Día 2 a semanas | | Producción de factores de crecimiento | Macrófagos | | | | CTGF |
| | | | | | | | Cyr61 |
| | | | | | | STP | |

Fase de remodelación

La remodelación consiste en la deposición de una matriz y sus subsecuentes cambios con el tiempo. Esta ocurre a lo largo de todo el proceso de reparación, tan pronto como el tapón de fibrina en la fase inflamatoria temprana es remplazado por el tejido de granulación, que es rico en colágena tipo III y vasos sanguíneos, y que subsecuentemente es remplazado por colágena de tipo I con mucho menos irrigación (Jie Lie *et al.*, 2007).

Una de las características más emblemáticas de la fase de remodelación es el cambio de la composición de la MEC. Durante la fase temprana de la reparación, el colágena tipo III es el que predominantemente sintetizan los fibroblastos entre el día 3 y 5 post-lesión, estimulados por el TGF- β , PDGF, FGF-2 y el IGF-1, factores producidos fundamentalmente por macrófagos (Mahdavian *et al.*, 2011); durante el transcurso de un año o más, la dermis gradualmente regresa a su fenotipo normal estable, consistiendo mayormente en colágena de tipo I (Jie Lie *et al.*, 2007).

Remodelado del tejido conjuntivo. El cambio de tejido de granulación por una cicatriz implica cambios en la composición de la MEC. Existen dos determinantes para este evento: la velocidad de síntesis y de degradación.

La habilidad para degradar proteínas extracelulares es esencial para cualquier célula, para que ésta pueda interactuar correctamente con el ambiente que la rodea, para el desarrollo de una función apropiada (Mark *et al.*, 2001). La degradación de la colágena se consigue por las metaloproteinasas de la matriz (MMP), llamadas así debido a que son sintetizadas como zimógenos, dependen de iones de metal para poder realizar su actividad catalítica; dentro de este grupo de enzimas se incluyen a las colagenasas intersticiales (MMP-1, 2 y 3), que rompen colágena fibrilar de los tipos I, II y III; las gelatinasas (MMP-2) que degradan la colágena y fibronectina; estromelisin (MMP-3, 10 y 11), que actúan sobre diversos componentes de la MEC.

Como se mencionó anteriormente, las MMP son sintetizadas como enzimas inactivas o zymógenos. Su latencia es mantenida por un grupo cisteína-sulfhidrilo desapareado, cerca del extremo C-terminal del dominio pro-peptídico. Este grupo sulfhidrilo actúa como un cuarto ligando para el sitio activo del ion zinc, para cuya activación es necesario que ocurra la sustitución de la cisteína por el zinc mediante una remoción proteolítica de dominio pro-peptídico, o por una perturbación ectópica de la interacción cisteína-zinc. Una vez desplazado, el grupo thiol es remplazado por una molécula de agua, entonces puede atacar a los enlaces peptídicos, sitios blanco de las MMP (Mark *et al.*, 2001). Debido a esto, también se ha señalado que los requerimientos de zinc en el sitio de lesión son altos durante el proceso de reparación, fenómeno observado por (Lansdown *et al* 1999), en donde a partir del día 5 hasta el día 7 post-lesión las concentraciones de zinc se incrementaban de manera importante, sobrepasando los niveles previos a la lesión; de igual manera, se ha observado que en ratas deficientes de zinc la re-epitelización se ve retardada, así como la fuerza tensil de la cicatriz resultante; de hecho una de las formas de inhibir a las MMP es a través de la remoción del zinc mediante agentes quelantes (Schwartz *et al.*, 2005).

Las MMP también pueden degradar factores de crecimiento y factores angiogénicos, así como sus receptores. Asimismo, se conoce que las MMP juegan un papel esencial en la liberación de factores de crecimiento y durante el corte de proteínas de la MEC, que pueden activar a receptores de factores de crecimiento, revelando que estas enzimas no únicamente se encargan de degradar componentes de la MEC, si no que, en última instancia, incluso pueden influenciar el comportamiento celular (Schultz *et al.*, 2008), como lo ha demostrado (McQuibban *et al.*, 2002) al descubrir que las MMP son capaces de regular la respuesta inflamatoria al procesar las moléculas quimiotácticas de monocitos (MCP-3), y no sólo eso, sino que los productos truncados de estas moléculas muestran una actividad anti-inflamatoria, lo que puede significar su papel vital en la regulación de la respuesta inmune.

La secreción de MMP es inducida por factores de crecimiento (PDGF, FGF), citocinas y fagocitosis en los macrófagos. Se sintetizan como precursores (precolagenasas) y son activadas por sustancias químicas como los radicales libres. Tras su formación, las colagenasas activas son inhibidas por moléculas específicas de cada tejido llamadas inhibidores de las metaloproteinasas, producidos en su mayoría por células mesenquimatosas, lo que impide la acción descontrolada de esta proteasa. Es importante considerar que aunque la secreción de proteasas es esencial para un buen proceso de reparación de las heridas, niveles crónicos elevados de ciertos tipos de proteasas pueden conducir a la degradación de la MEC, asociada con procesos de regeneración alterados.

Recuperación de la fuerza tensil. Las colágenas fibrilares son de vital importancia para la recuperación de la fuerza en heridas posterior a la cicatrización. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, su acumulación en el sitio de reparación no solo depende de la velocidad de su síntesis, sino también de la reducción de su degradación. La resistencia de la herida aumenta con rapidez en las 4 semanas siguientes, y tras el tercer mes de haber ocurrido la herida llega a un equilibrio, con recuperación del 70 a 80% de la fuerza tensil de la piel no lesionada.

Cuadro 4. Fase de maduración del proceso de reparación: Asociación con tiempos, cambios visibles y constituyentes microscópicos (Baum *et al.*, 2005)

| Tiempo aprox. | Proceso | Cambios visibles asociados | Células | Componentes de la MEC | Reguladores clave |
|-----------------|--|--|----------------------------|------------------------------------|--|
| 4° a 14° día | Contracción | Aproximación de los bordes | Miofibroblasto | Colágena | PDGF TGF- β NGF |
| 3° semana | Remodelación de la MEC | Resistencia aumentada (20% restaurada) | Fibroblasto | Colágena Proteoglicanos Agua | MMP/TIMP TGF- β PDGF |
| 6° semana | | Resistencia aumentada (70% restaurada) | | | IL-6 Cyr61 |
| 6° mes | | Resistencia aumentada (80% restaurada) | | | |
| semanas a meses | Regresión de la inflamación | Dureza reducida | Macrófagos Linfocitos T | | IL-10 |
| semanas a meses | | Rubor y densidad capilar reducida | Células endoteliales | | TSP-1 TSP-2 Angiostatina Endostatina Vasostatina |
| Indefinido | Inhabilidad de producir un nicho apropiado | Ausencia de anexos cutáneos | | | |

1.11 *Ipomoea pes-caprae* (riñonina)

Descripción de la planta

La llegada de los españoles cambió radicalmente la medicina nativa y los usos de las plantas medicinales. En diversos documentos de los primeros años de la colonización, se muestra que el conocimiento de la botánica proviene de los indios prehispánicos de México (Aguilar, 2001).

En la actualidad existe un interés por las plantas medicinales en las diferentes regiones del mundo, lo cual deriva de la preocupación por regresar a los modos de vida naturales debido a las limitaciones en la asistencia médica actual, lo que provoca un deterioro de la calidad de vida, esta situación lleva a un incremento en la demanda de plantas medicinales en nuestro país (Aguilar, 2001).

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, donde se registran poco más de 3000 especies que se emplean en remedios naturales, a pesar de que se tiene esta riqueza, son pocas las investigaciones en el uso y manejo de las plantas medicinales, y por lo tanto, hay escasa información etnobotánica sobre el tema (Gómez Álvarez *et al.*, 2012).

Las plantas del género *Ipomoea* son ampliamente estudiadas para encontrar nuevos principios activos, ya que contienen una gran cantidad de componentes llamados metabolitos secundarios; a partir de estos compuestos, se modifican químicamente para generar nuevos medicamentos, con lo que se pretende que sean más específicos y se potencie su efecto principal, aumentando el tiempo efectivo de acción dentro del organismo y disminuyendo los efectos colaterales. Los metabolitos secundarios son moléculas que la planta produce como mecanismos de señalización y defensa contra agresiones del ambiente (estrés abiótico: cantidad de luz, agua, cambios extremos de temperatura, heridas), la producción depende del estado de desarrollo y del estado fisiológico en que se encuentre la planta (Pontones *et al.*, 2009).

La planta *Ipomoea pes-caprae* pertenece al reino Plante, Filo Traqueófitas, Clase Magnoliopsida, Orden Solanales, Familia Convolvulaceae y Género *Ipomoea*. Los nombres comunes que recibe esta planta son: vid ferrocarril, la gloria de la playa en la mañana, riñonina, salsa-da-praia o batateira-da-praia y bejuco de playa (CONABIO, 2013).

Distribución

Ipomoea pes-caprae es una de las plantas de playa más ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se encuentra a lo largo de las cadenas de playas costeras e islas tropicales de América del Norte y del Sur, al este de África central, el oeste de África, India, Asia y Australia. En el norte de América, *Ipomoea pes-caprae* se distribuye desde Florida hasta las Bahamas pasando por las costas del golfo de México, pero se puede encontrar en prácticamente todas las playas de nuestro país: Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Tamaulipas; esta planta se considera nativa mexicana (Villaseñor *et al.*, 1998).

El área de distribución se extiende desde aproximadamente 30° de latitud norte y sur. La localización esta determinada directamente por el clima, ya que *Ipomoea pes-caprae* no tolera condiciones heladas prolongadas, sin embargo, soporta temperaturas más allá de los 40°. Se cree que su dispersión fue por la capacidad que tienen sus semillas de ser impermeables y de poder flotar en agua salada, además, crece en los suelos salinos y arenosos de playas, y las semillas no tienen latencia, pero la testa tiene que ser desgastada un poco en la arena, porque sin esto no entra el agua y no puede germinar.

Usos

Se han descrito diferentes componentes de la planta *Ipomoea pes-caprae* como: eugenol, 4-vinyguaiacol, actinidols, β -damascenone, (E)-phytol, ácido betulíbico, isoquercitrina, α y β - amirina y ésteres de ácido quínico (Tao, Hao *et al.* 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados con esta planta han sido elaborados con semillas, hojas y tallos en extractos o infusiones, y con

resinas. Por ejemplo, las semillas de *Ipomoea pes-caprae* han sido utilizadas como antipiréticas, antieméticas y laxantes. Algunas plantas de este género se utilizan con frecuencia para el tratamiento de cólicos. En la medicina tradicional tailandesa y china, la planta *Ipomoea pes-caprae* se utiliza para tratar diferentes tipos de inflamación; una infusión de esta especie se utiliza vía oral, para curar la rubéola y prurito causado por el veneno de las medusas (dermatitis por veneno de medusa) y se aplica externamente para tratar el dolor y úlceras. Las infusiones también se han utilizado para el tratamiento de problemas renales, gastrointestinales, hipertensión, lumbalgia, artritis, reumatismo, diuresis, gota, gonorrea, hidropesía y fatiga (Pontones, 2009; Khan et al., 1994; Bhat et al., 2005; Maria de Souza et al., 2000). En México, esta planta es conocida como “riñonina”, debido a que de acuerdo a la medicina tradicional, los extractos de la planta *Ipomoea* regulan el calor del riñón afectado mejorando su función (Escobedo-Martínez et al., 2007). En modelos animales, los extractos obtenidos de las hojas de *Ipomoea pes-caprae*, han demostrado tener actividad antiinflamatoria, disminuyendo la síntesis de prostaglandinas *in vivo* e inhibiendo la contracción del músculo (Pongprayoon et al., 1992). Se ha demostrado que los extractos de *Ipomoea* tienen actividad antagónica para la histamina, neutralizan la actividad tóxica del veneno de medusas, tienen propiedades antinociceptivas y muestra efectos inhibitorios en agregación plaquetaria, así como liberador de serotonina.

Algunas resinas y alcaloides de esta planta son utilizadas por los nativos de la India como purgante y tónico. También se cree que tiene actividad antienvjecimiento (Khan et al., 1994). En un estudio realizado en la India se evaluó la actividad antifúngica de *Ipomoea pes-caprae* utilizando el extracto crudo de flores en diversos grupos de hongos productores de aflatoxinas: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*; hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium oryzae*, y hongos patógenos humanos: *Candida albicans* y *Microsporium audouinni*. El estudio tuvo resultados favorables con el extracto etanólico de la flor *Ipomoea pes-caprae* pues se observó un efecto inhibitorio significativo en la producción de aflatoxinas (Parasakthy et al., 1993).



Figura 1. Imagen de la planta *Ipomoea pes-caprae* (Linn).

II. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas por nuestros ancestros para curar las heridas, agudas y/o crónicas, que afectan a un gran número de pacientes y que reduce seriamente su calidad de vida. Se estima que existen cerca de 6 millones de pacientes en el mundo que padecen de heridas crónicas (Kumar, 2007). En los animales se presentan lesiones frecuentes en la piel, en algunos, como los caballos, es necesario un adecuado manejo de las heridas para minimizar el desarrollo del tejido fibroso, que en ocasiones incapacita o compromete el trabajo futuro del animal (Bogado, 2005)

La terapéutica convencional consiste en fármacos tópicos de origen vegetal (Menéndez, 2007), en el mercado existen diversas formulaciones como el Madecassol, elaborado de la planta *Centella asiática* (Shukla *et al*, 1999) el cicatrizante Cicatrivet, usado en el campo veterinario, elaborado a partir de *Tonkinesis sp* (bejuí), *Matricaria sp*, *Chamomilla* (manzanilla), los cuales se han usado en pruebas de laboratorio para probar su actividad sobre heridas de piel en rata y no han mostrado resultados satisfactorios, así como crema, pomada o tintura de *Calendula officinalis*, utilizada por su actividad cicatrizante tanto en humanos como en animales (Menéndez, 2007).

En la literatura científica reciente, podemos encontrar estudios hechos con plantas medicinales sobre la actividad cicatrizante, ejemplos de ellos son *Verbascum mucronatum* llamado vulgarmente gordolobo negro (Akdemir *et al*, 2010), *Serpervivum tectorum* conocido como siempreviva (Domínguez *et al*, 2001), *Caryocar coriaceum* llamada pequi o piqui (Liduína *et al*, 2010), *Flabellaria paniculata* o cereza (Olugbuyro *et al*, 2010), *Hipericum perforatum* (Pesin *et al*, 2010), *Trichosanthes dioica*, nombrada pimienta de jamaica (Shivare *et al*, 2010). La información científica acerca de la actividad cicatrizante de la planta *Ipomea pes-caprae* es nula, sin embargo, en la herbolaria se describen sus efectos cicatrizantes, como es el caso de que ayuda a sanar las lesiones producidos por las medusas (Pongprayoon, 1994).

Motivo por el cual se decidió estudiar la actividad biológica de esta planta preparando extractos de hexano y diclorometano, probándolos sobre un modelo de herida inducida.

Esto indica la importancia de los estudios fitoquímicos y farmacológicos para el aislamiento de nuevos productos naturales, con propiedades cicatrizante, más efectivos y que no produzcan efectos nocivos

Es importante continuar con la búsqueda de plantas cuyos extractos tengan efectos cicatrizantes potentes, para que en un futuro se puedan aislar los principios activos de estas especies.

III. HIPÓTESIS

La aplicación de extractos de hexano y diclorometano de *Ipomea pes-caprae* en heridas inducidas en piel de rata, favorecerá el proceso de cicatrización al disminuir el tiempo de cierre de la herida, incrementar el proceso de remodelación tisular y aumentar la expresión de los factores EGFR y FGF, en comparación a un cicatrizante comercial.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad cicatrizante de los extractos de hexano y diclorometano de *Ipomea pes-caprae* en heridas inducidas en la piel de ratas macho Wistar.

Objetivos particulares

1. Determinar el tiempo de cicatrización de las heridas inducidas en piel de rata, mediante la medición macroscópica de las heridas desde la inducción y hasta un período de 12 días.
2. Evaluar el proceso de cicatrización a nivel histológico, mediante la observación de los cortes de piel teñidos con H&E y el análisis semi-cuantitativo de la presencia de los tipos celulares durante el proceso de reparación tisular.
3. Determinar la expresión de los factores de crecimiento: factor de crecimiento epidermal alfa (EGF- α) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), mediante la técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio farmacológico de cicatrización en ratas de la cepa Wistar con extractos de la planta *Ipomea pes-caprae*, colectada en el estado de Veracruz México, durante los meses de agosto y septiembre.

La planta fue procesada para obtener los diferentes extractos; para ello se secó a la sombra, se cortaron las hojas y los tallos para introducirlos al molino del laboratorio de bromatología de la UAM-X, cuando se terminó de moler se guardó toda la molienda en bolsas de plástico para almacenarlo en un lugar seco y fresco hasta su posterior uso para la extracción.

Preparación de los extractos

Se colocaron 35g de la planta seca previamente molida en un cartucho de papel filtro cubierto con algodón en un soxlet, se agregó el disolvente diclorometano o hexano, cada uno de los ellos se procesaron durante 8 h. por 3 días, dejando secar el cartucho durante 24 h.; al cambiar de disolvente, éste arrastrará los metabolitos de la planta disueltos en él y después de 24 h., se retirará del soxlet.

Posteriormente, el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio a presión reducida y el residuo se dejó enfriar para ser utilizado en las pruebas farmacológicas. Esto se repitió con cada uno de los disolventes mencionados. Los extractos representaron un rendimiento de 0.714 g para diclorometano y 2.5 g para hexano.

Los extractos de hexano y diclorometano se disolvieron en metanol y diclorometano, se les agregó PVP (Polyvinylpyrrolidone) y se colocaron en un baño María para eliminar el disolvente. El residuo se mezcló con solución de NaCl al 0.9 %, para obtener una concentración de 10%.

Pruebas experimentales

Para realizar las pruebas de cicatrización se utilizaron ratas de la cepa Wistar producidas en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio- Bioterio (UPEAL-B), machos de 2 meses de edad, con un peso de 200 ± 50 g; se mantuvieron con iluminación controlada, con periodos de luz-oscuridad de 12:12 horas; temperatura de 25°C; humedad de 55%; alimentación y agua *ad libitum*.

Los animales se agruparon de la siguiente manera:

| GRUPO | TRATAMIENTO |
|----------------------------|-----------------------------------|
| I Control negativo (n=12) | Solución fisiológica 0.9% de NaCl |
| II Control positivo (n=12) | Madecassol 35mg |
| III Experimental (n=12) | Extracto de Hexano 0.02 ml |
| IV Experimental (n=12) | Extracto de Diclorometano 0.02 ml |

Los grupos se dividieron y a cada uno se les aplicaron diferentes soluciones sobre la herida: Al grupo control positivo se le aplicó 35 mg de Madecassol sobre la herida con una espátula de plástico, al grupo control negativo se le aplicó 0.2 ml de solución salina (0.9%) con un gotero, a los grupos experimentales se les aplicó 0.2 ml de alguno de los 2 extractos de *Ipomea pes-caprae*, con una concentración al 10%.

Preparación de los animales

Todas las ratas fueron anestesiadas con ketamina a una dosis de 75-95 mg/kg y xilacina de 5 mg/Kg. Ambos medicamentos se aplicaron en forma intramuscular, una vez anestesiados los animales, se rasuró la región dorsal el día previo al inicio del experimento. El día que se realizó la incisión se anestesiaron los animales, se realizó la asepsia y antisepsia de la región dorsal con cloruro de Benzalconio al 1% para la desinfección del área quirúrgica y posteriormente se realizó una incisión profunda que abarco desde la epidermis

hasta el tejido subcutáneo de 1.5 cm de longitud con bisturí estéril del No. 22 (Vargas, 2009).

Una vez que los animales recibieron el tratamiento de acuerdo al grupo en que fueron seleccionados, se colocaron en jaulas con hojas de papel absorbente como sustrato, para que se recuperaran de la anestesia; posteriormente fueron colocadas en sus jaulas individuales, con camas de viruta, hasta el final del experimento.

Los extractos de diclorometano y hexano al 10%, el Madecassol y la solución fisiológica, se aplicaron diariamente a la misma hora hasta que se observó la cicatrización completa en cualquiera de los grupos. La pauta para determinar que la piel había cicatrizado fue cuando se observó la herida sin costra y con una tonalidad rosa pálido, lo que nos indicó que se había resuelto la herida (Robbins, 2010).

Evaluación macroscópica

La longitud de la herida se midió con una regla y se hizo para los cuatro grupos, durante la duración del experimento con una periodicidad de tres días, obteniendo las medidas en los días 0, 3, 6, 9 y 12 del experimento.

A partir del día 3 del experimento se realizó la eutanasia de 3 animales de cada grupo con una sobredosis de anestesia, con el fin de recuperar muestras de piel los días 3, 6, 9 y 12 para su estudio histopatológico.

Evaluación microscópica

Con la finalidad de determinar el efecto del extracto diclorometano, hexano y solución salina sobre la cicatrización de heridas inducidas en piel de rata, se tomaron muestras cutáneas de las heridas quirúrgicas; la piel se fijo en formol buferado al 10% durante 24 a 48 horas, se trabajaron en el procesador automatizado de tejidos para luego elaborar ser incluidos en parafina, a partir de los cuales se realizaron cortes a 5µm de espesor mediante el uso del micrótomo. Los cortes histológicos se colocaron en láminas portaobjetos, se desparafinaron en la estufa y se procedió a realizar la coloración con

Hematoxilina & Eosina (Thomas, 1995). La evaluación microscópica fue realizada en los cuatro grupos en los días 3, 6, 9, y 12 del experimento. En ésta se evaluaron parámetros como: hiperplasia epitelial, tejido de granulación, presencia de macrófagos, linfocitos, neutrófilos, fibroblastos, necrosis, hemorragia y fibrosis. A dichos parámetros se les asignó una puntuación de acuerdo a su presencia en el tejido siendo (+) leve, (++) moderado, (+++) abundante.

Inmunohistoquímica

Las pruebas se realizaron en el laboratorio de inmunohistoquímica del Departamento Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Con el fin de identificar factores de crecimiento en las heridas de las ratas, se solicitaron cortes histológicos de 5 µm de grosor montadas en laminillas electrocargadas, los cuales fueron marcados con 2 diferentes anticuerpos, EGFR (Factor de Crecimiento Epidermal; Bioworld Technology, Estados Unidos, EGFR L1116 pAb) y FGF-2 (Factor de Crecimiento de Fibroblastos; abcam discover more, Inglaterra, Anti-FGF-2).

Como controles, se usaron 2 laminillas (positiva y negativa) con secciones de piel positivos a factor de crecimiento a la hora de aplicar el anticuerpo, al control negativo se le sustituyó el anticuerpo primario por Tris, con el fin de que no se marcara los sitios de unión antígeno anticuerpo.

Se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para cada uno de los anticuerpos y se aplicó la siguiente metodología:

Las laminillas se dejaron en la estufa a una temperatura de 60°C por una hora para desparafinarlas, para completar este procedimiento se sumergieron en xilol, realizando 2 cambios de 10 minutos cada uno. Para la rehidratación del tejido, los porta-objetos se sumergieron en alcohol etílico a diferentes concentraciones, absoluto, 96%, 80% y 70%, realizando 3 cambios de 3 minutos cada uno, por cada concentración de alcohol, y finalmente se sumergieron en agua destilada realizando un cambio de 3 minutos a temperatura ambiente.

Inhibición de la peroxidasa endógena

Para inhibir la actividad de peroxidasa endógena, los órganos se trataron con peróxido de hidrogeno y metanol absoluto, en una relación 1:8, realizando 2 cambios de 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se hizo un lavado con agua destilada durante 3 minutos.

Proteasa

Posteriormente se decantó el agua destilada y se agregó la proteasa (SIGMA P-5147) al 0.1% para incubar en cámara húmeda durante 10 min, en estufa a 37°C. Se lavó con agua destilada y se hicieron 2 cambios de 5 min.

Se lavó con Tris, un cambio de 5 minutos.

Se decantó el Tris

Se bloquea la avidina endógena y se incubó en cámara húmeda durante 30 min en estufa a 37°C. Una vez que salió de la estufa se lavó con Tris y se hizo un cambio de 5 min.

Se decantó el Tris

Se bloquea la biotina endógena y se incubó en la estufa durante 30 min a una temperatura de 37°C. Se lavó con Tris y se hizo un cambio de 5 min.

Anticuerpo Primario

Se decantó el Tris y se agregó el anticuerpo primario EGFR (L1116) pAb o Anti FGF (Basic antibody ab8880) ambos de isotipos IgG a una dilución en PBS de 1:300; se dejó incubando toda la noche en al refrigerador a una temperatura de 4°C. Se lavó con Tris con un cambio de 5 min.

Anticuerpo secundario

Se aplicó el anticuerpo secundario (anti-conejo, isotipo IgG, acoplado a biotina ®) y se incubó en cámara húmeda durante 20 min, en la estufa a 37°C. Se hizo un lavado con Tris.

Se agregó el conjugado de enzimas, se incubó en cámara húmeda durante 20 min en la estufa a 37°C. Se hizo un lavado con Tris, y se hizo un cambio de 5 min.

Revelado

Se aplicarán dos gotas (20 µl/gota) de cromógeno (3-amino-9-etil carbazol), y se observó la reacción del colorante al microscopio; se estableció un tiempo de 1 min con 10 segundos para el revelado. Se lavaron las laminillas con agua destilada y se dejaron en un vaso de Coplin por 5 min.

Una vez terminado el tiempo se aplicó hematoxilina como contraste durante 7 min, se lavó con agua destilada utilizando la pizeta y se sumergieron en Tris durante 30 segundos, posteriormente se dejaron en agua destilada para realizar el montaje con resina de agua.

Métodos estadísticos

La capacidad de cicatrización de los tratamientos se comparó mediante ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. El modelo incluyó como factores principales el tiempo de evaluación y el tratamiento que recibió cada grupo.

Para comparar el efecto cicatrizante entre los distintos tratamientos se utilizó el porcentaje de cierre de la herida; tomando como el valor máximo de la misma (100%), aquella longitud registrada al momento de la inducción (día 0). De esta forma, se dividió entre dicho valor la longitud de la herida de cada día posterior y se obtuvo así el porcentaje de cicatrización. A partir de los porcentajes de cierre, se realizaron ajustes no lineales del cierre de la herida a través del tiempo. Mediante dichos ajustes se obtuvieron parámetros de la habilidad de cicatrización, tal es el caso del valor TC₅₀ (tiempo de cicatrización del 50% de la herida) y el coeficiente de determinación (R^2), que es un indicativo de la bondad de ajuste del modelo.

Finalmente, se realizó un análisis de sobrevida para conocer el tratamiento que presentó la mayor cantidad de individuos experimentales que tuvieron una

cicatrización > 80%. Para ello se compararon los días 9 y 12, en los cuales se presentaron los cambios significativos en la cicatrización de acuerdo al ANOVA, utilizando el estadístico Log-rank de Mantel-Cox para compararlas.

VI. RESULTADOS

Para evaluar la capacidad cicatrizante de los extractos diclorometano y hexano de la planta *Ipomoea pes-caprae*, se indujeron heridas en piel de rata. Los resultados comparativos indican de forma general que en todos los tratamientos se desarrolló una cicatrización dependiente del tiempo, es decir; que posterior al momento de inducción (día 0), se observó un decremento en la longitud de la herida (fig. 1). Sin embargo, la cicatrización presentó diferencias de acuerdo al tratamiento empleado, que a continuación se presentan.

A partir del momento de inducción, el grupo que recibió solución salina presentó un cambio significativo ($p < 0.05$) en la longitud de la herida hasta el día 6, seguido de un decremento significativo ($p < 0.05$) en el tamaño de la herida hacia los días 9 y 12; no obstante, no hubo diferencia entre estos dos últimos días ($p > 0.05$), mostrando una longitud de 6.8 ± 1.9 y 4.3 ± 1.2 mm, respectivamente. Por su parte, el grupo que recibió Madecassol presentó un comportamiento similar al de solución salina, caracterizado por un cambio discreto en el cierre de la herida durante los primeros seis días de evaluación, seguido de una reducción significativa al final del tratamiento.

Los extractos de *Ipomoea* presentaron resultados contrastantes en su habilidad para cerrar la herida. Particularmente, el extracto diclorometano logró una cicatrización mucho más eficiente desde el día 6 ($p < 0.05$), seguido de los valores más pequeños de herida a los días 9 y 12 (2.3 ± 0.8 y 2.0 ± 0.5 mm, respectivamente). La herida tratada con el extracto de hexano no cicatrizó de forma tan exitosa; este hecho se manifestó al comparar los tres primeros días de evaluación, en los cuales no se observaron diferencias significativas con los otros tratamientos ($p > 0.05$). Únicamente hasta llegar a los días 9 y 12 se observó una disminución importante en la longitud de la herida, sin embargo, los valores fueron similares (7.3 ± 0.7 y 4.6 ± 0.35 mm a los 9 y 12 días, respectivamente; $p > 0.05$) a los presentados en el grupo de solución salina.

Imágenes macro de la las ratas tratadas

Figura 2. Piel de la región dorsal. Día 0. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes no adosados.

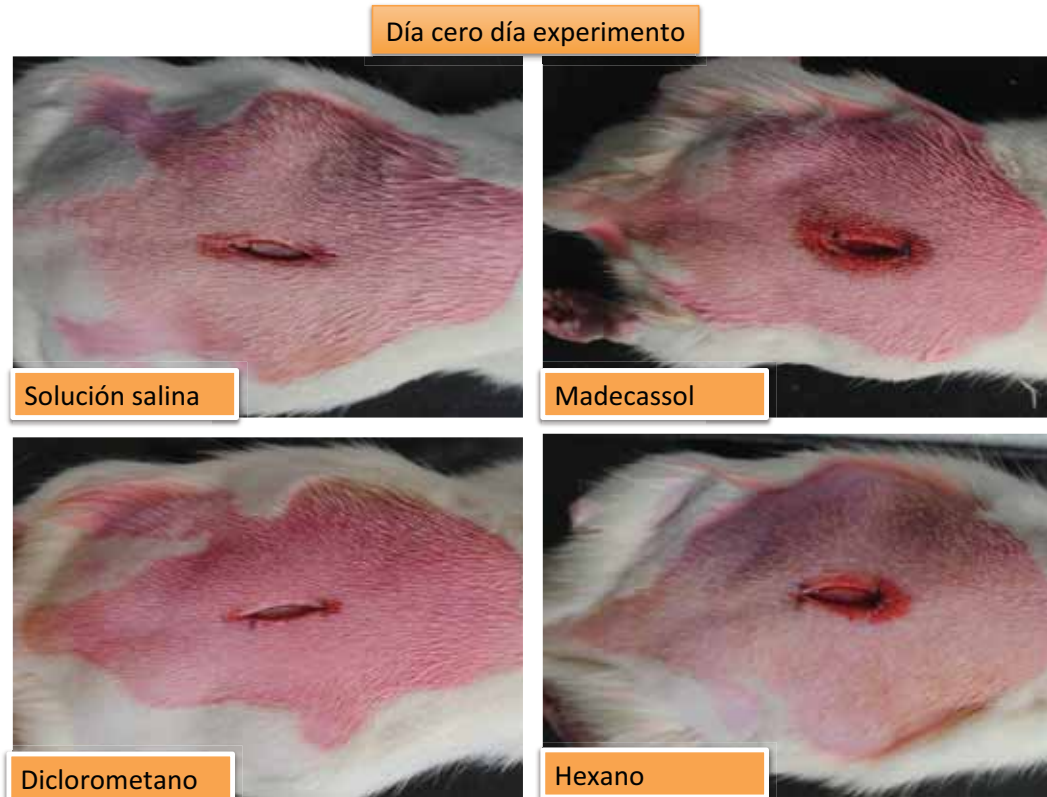


Figura 3. Piel de la región dorsal. Día 3. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes no adosados que está totalmente cubierta por una formación de material rojo, sólido, seco (costra).



Figura 4. Piel de la región dorsal. Día 6. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes no adosados que está totalmente cubierta por una formación de material rojo, sólido, seco (costra). La incisión de la rata tratada con diclorometano se observa disminuida de tamaño en comparación con el resto de los extractos y la solución salina.

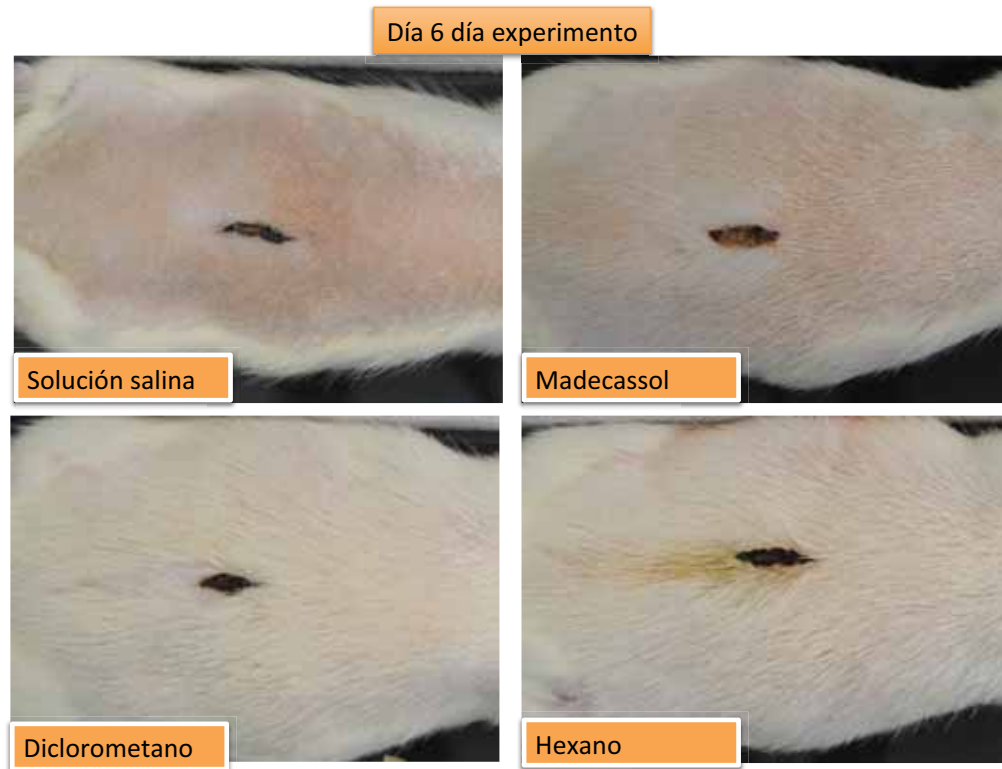


Figura 5. Piel de la región dorsal. Día 9. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes parcialmente adosados. En los tratamientos de solución salina, madecassol y hexano aún se aprecia escaso material rojo, sólido, seco (costra). La incisión de la rata tratada con diclorometano se observa prácticamente adosada.



Figura 6. Piel de la región dorsal. Día 12. Incisión quirúrgica sobre la línea media de bordes totalmente adosados. En los tratamientos de solución salina, Madecassol y hexano aún se aprecia una ligera cicatriz mientras que en la rata tratada con diclorometano la incisión es apenas perceptible.



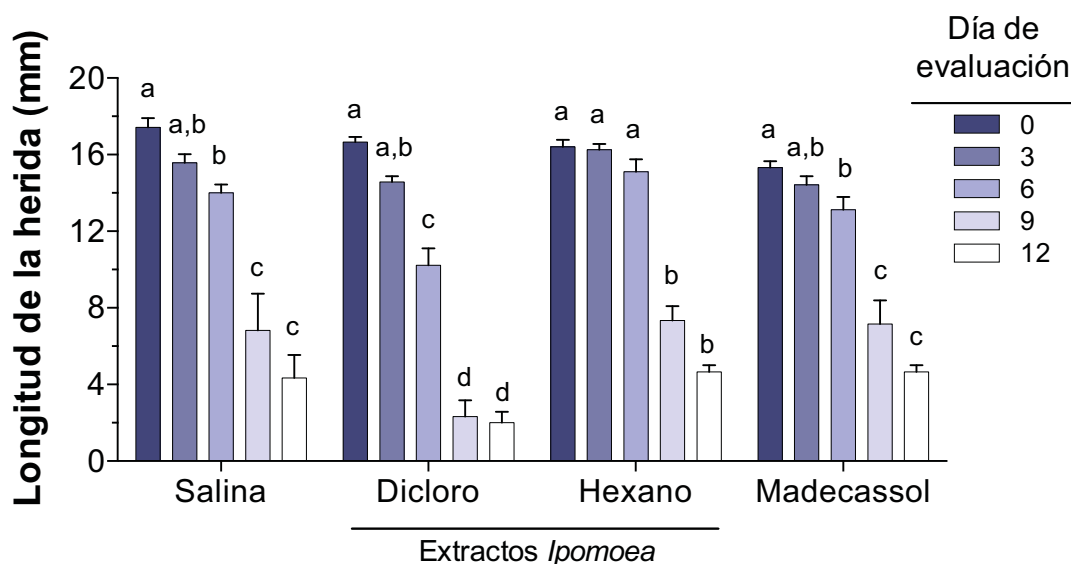


Figura 7. Gráfica del promedio \pm EE de la longitud de la herida inducida sobre piel de ratas macho, medida durante 12 días de tratamiento. La capacidad de cicatrización de los tratamientos se comparó mediante ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. El modelo incluyó como factores principales el tiempo de evaluación y el tratamiento que recibió cada grupo. No se consideró la interacción de factores debido a que dicha información se analizó con otro modelo^{a,b,c}. Para cada grupo en tratamiento, literales distintas entre los días de evaluación indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$.

Para comparar el efecto cicatrizante entre los distintos tratamientos se utilizó el porcentaje de cierre de la herida, tomando como el valor máximo de la misma (100%), la longitud registrada al momento de la inducción (día 0). De esta forma, se dividió entre dicho valor la longitud de la herida de cada día posterior y se obtuvo así el porcentaje de cicatrización. A partir de los porcentajes de cierre, se realizaron ajustes no lineales del cierre de la herida a través del tiempo. Mediante dichos ajustes se obtuvieron parámetros de la habilidad de cicatrización, tal es el caso del valor TC_{50} (tiempo de cicatrización del 50% de la herida) y el coeficiente de determinación (R^2) que es un indicativo de la bondad de ajuste del modelo.

Los resultados del ajuste del porcentaje de cicatrización logrado en cada grupo de tratamiento se presentan en la figura 8 (*panel* izquierdo). La forma de las curvas ajustadas demuestra las diferencias entre el grupo que recibió el

extracto diclorometano y los otros grupos. Es evidente el desplazamiento hacia la izquierda en la curva de diclorometano, lo cual se reflejó en un tiempo menor para lograr cerrar el 50% de la longitud inicial de la herida, además, en dicho tratamiento se presentó la mayor reducción porcentual de la herida al día 12, el cual correspondió al 12% del valor original. De forma contraria, los demás grupos presentaron curvas similares, caracterizadas por un retraso en el cierre de la mitad de la herida, con un porcentaje de entre 20-30% en la longitud final de la herida, es decir; con una cicatrización deficiente. Para corroborar este conjunto de observaciones se comparó el parámetro TC_{50} que resultó significativamente distinto ($p < 0.05$) sólo para el grupo que recibió el extracto diclorometano y que se ubicó en un valor de 6.4 días (fig. 8, *panel* derecho).

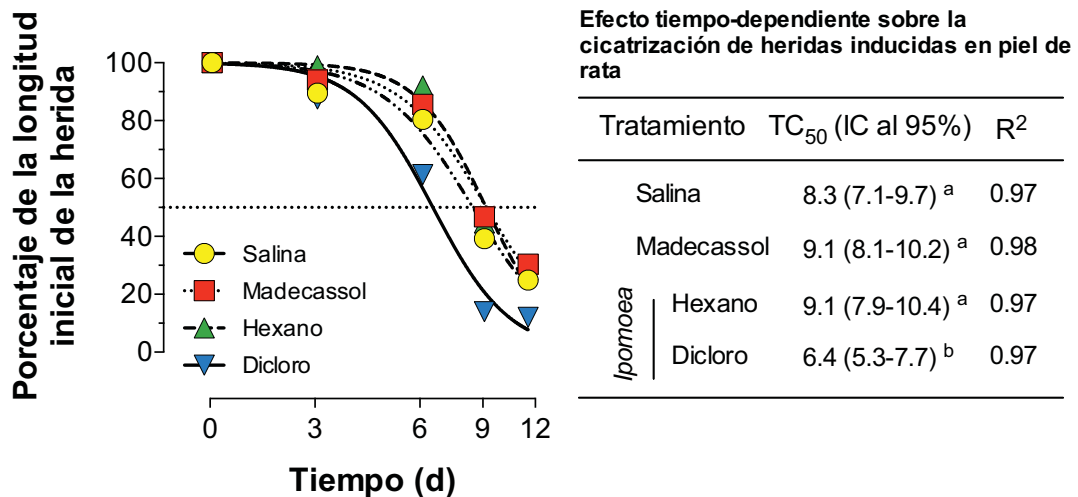


Figura 8. Curvas de ajuste del efecto de cicatrización tiempo-dependiente. Se presentan los porcentajes de cierre de heridas inducidas en piel de rata y tratadas con los extractos diclorometano y hexano de *Ipomoea*, solución salina y Madecassol. El tiempo se transformó para ajustar curvas de tipo log (tiempo) Vs. cicatrización normalizada. A partir de los ajustes se obtuvieron los parámetros TC_{50} y R^2 . Para comparar la habilidad de cicatrización de los tratamientos se consideró el valor TC_{50} que se comparó estadísticamente mediante la prueba F de suma de cuadrados extra^{a,b}. Entre los grupo en tratamiento, literales distintas indican diferencias significativas al nivel de $p < 0.05$.

Finalmente, se realizó un análisis de sobrevida para conocer el tratamiento que presentó la mayor cantidad de individuos experimentales que tuvieron una cicatrización > 80%. Para ello se compararon los días 9 y 12, en los cuales se presentaron los cambios significativos en la cicatrización de acuerdo a la comparación presentada en la figura 1. Los resultados se presentan en la figura 3 y sugieren que la capacidad de cicatrización entre los tratamientos fue significativamente ($p < 0.05$) diferente, lo anterior a juzgar por la diferencia en la forma de las curvas y de acuerdo al estadístico de Mantel-Cox utilizado para compararlas.

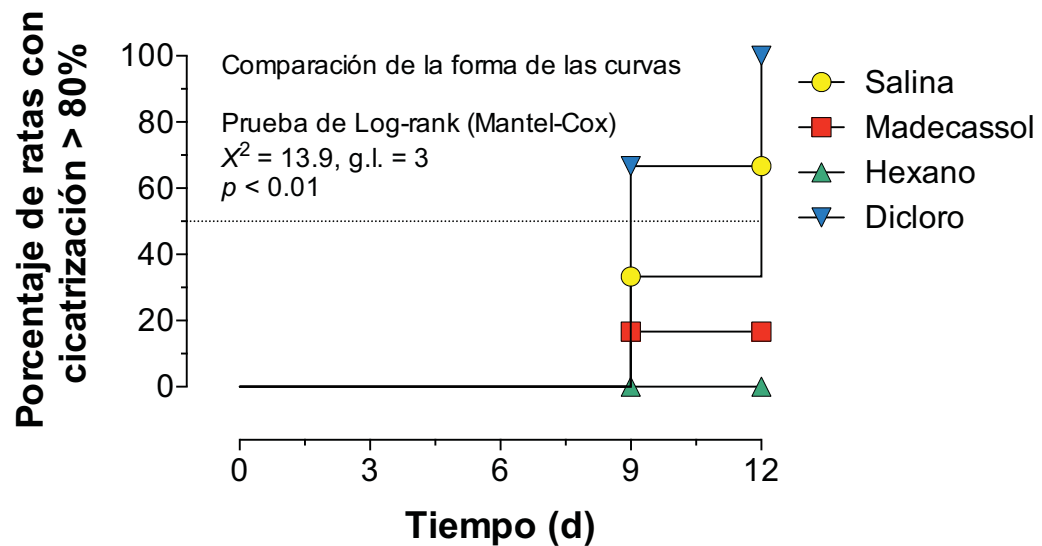


Figura 9. Análisis de sobrevida del porcentaje de sujetos experimentales que presentaron una cicatrización > 80% entre los días 9 y 12. La forma de las curvas se comparó mediante el estadístico Log-rank de Mantel-Cox para más de tres grupos. Notar las diferencias en la forma de las curvas de cada tratamiento, así como el porcentaje final de animales que presentaron una cicatrización eficiente (> 80%) durante la fase final de evaluación (días 9-12).

En resumen, tomando todos los resultados en conjunto, el extracto diclorometano indujo la mayor capacidad de cicatrización en heridas inducidas en piel de rata. Es por ello que a continuación, únicamente se presentaron los

resultados comparativos entre el grupo que recibió solución salina y aquel que recibió extracto diclorometano de *Ipomoea*.

Para determinar histológicamente el efecto del extracto diclorometano de *Ipomoea* y de la solución salina sobre la cicatrización de heridas inducidas en piel de rata, se utilizaron tinciones H&E de secciones de la piel tratada durante los días de experimentación. Para iniciar, en la figura 10 se presenta una imagen representativa de piel intacta de rata macho, la cual se tiñó con H&E para revelar las características histológicas y determinar en los grupos tratados los cambios inducidos sobre el proceso de remodelación tisular. El inserto muestra una imagen a mayor aumento. En la fotomicrografía se observan las capas de la piel, desde la más superficial (epidermis), hasta la más profunda (tejido subcutáneo); en la región central del corte se aprecia la dermis, región donde se encuentran los anexos cutáneos, glándulas sebáceas y folículos pilosos.

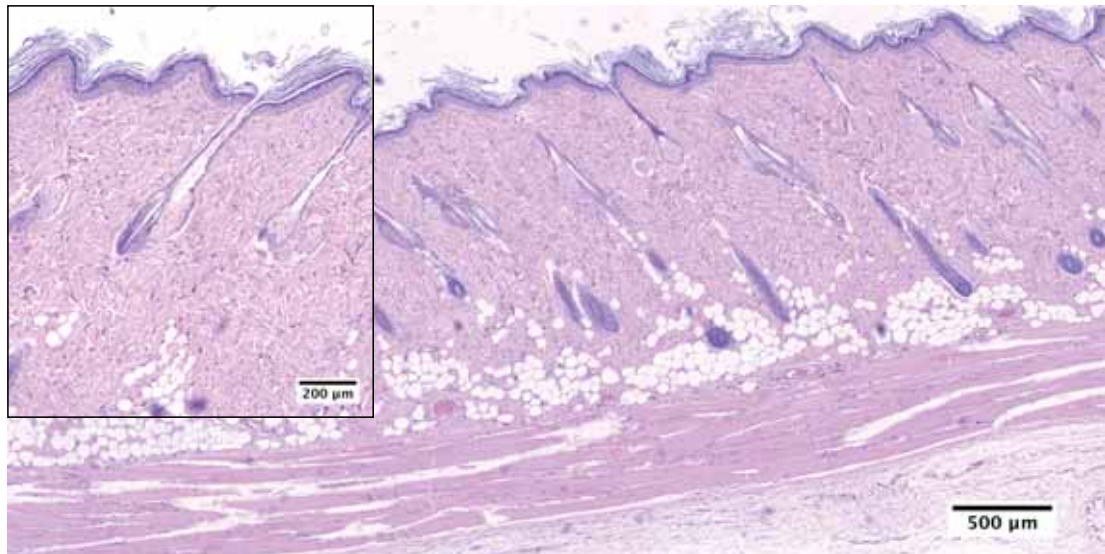


Figura 10. Imagen representativa de un corte de piel intacta de rata macho. H&E.

A continuación se presentan las características histopatológicas de las heridas inducidas en piel de rata. Para ello se muestran imágenes representativas en la figura 5, para solución salina (*panel A*) y diclorometano (*panel B*) por cada día evaluado. Los siguientes son los cambios que ocurrieron a lo largo del período experimental, además de las características de cicatrización que definieron a los grupos comparados.

Evaluación microscópica

En los animales tratados con solución salina, a nivel histológico se observó la presencia de fibroblastos, edema, abundantes células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos), así como capilares de nueva formación. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos eran prominentes, mientras que los fibroblastos y fibras de colágena estaban orientados hacia la superficie de la piel.

Con el extracto diclorometano, se observó la presencia de fibroblastos, edema moderado, células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos), y capilares de nueva formación. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos eran prominentes, los fibroblastos y fibras de colágena estaban orientados a la superficie de la piel, además, se regeneraron las glándulas accesorias en la dermis y el estrato córneo se aprecia bien organizado en la epidermis.

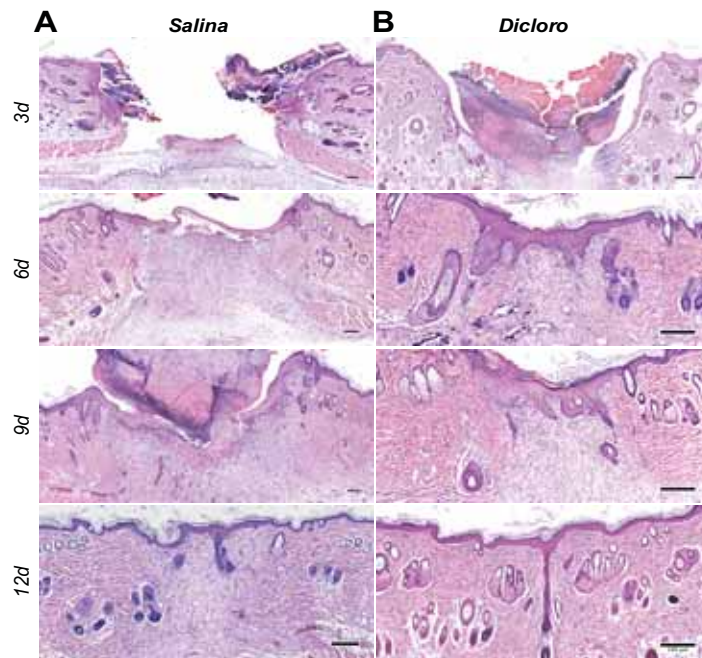


Figura 11. Comparación histológica del efecto cicatrizante del extracto de diclorometano de *Ipomoea pes-caprae* y solución salina, sobre heridas inducidas en piel de rata. La barra de escala representa 250 μ . H&E.

Por último, se realizaron pruebas de inmunohistoquímica contra el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y el EGFR (receptor al factor de crecimiento epidermal) que son dos moléculas fundamentales durante la remodelación tisular. Lo anterior fue con el propósito de evaluar si en los grupos tratados se presentaba la expresión de dichas moléculas, y sí el patrón de expresión cambiaba a lo largo del proceso de cicatrización. De forma representativa, en la Figura 6 se muestra la inmunohistoquímica contra FGF y EGFR en piel intacta de rata. De esta forma fue posible evaluar en el tejido pre-tratado el patrón de expresión de cada molécula, para posteriormente determinar si en los grupos tratados se presentaban cambios.

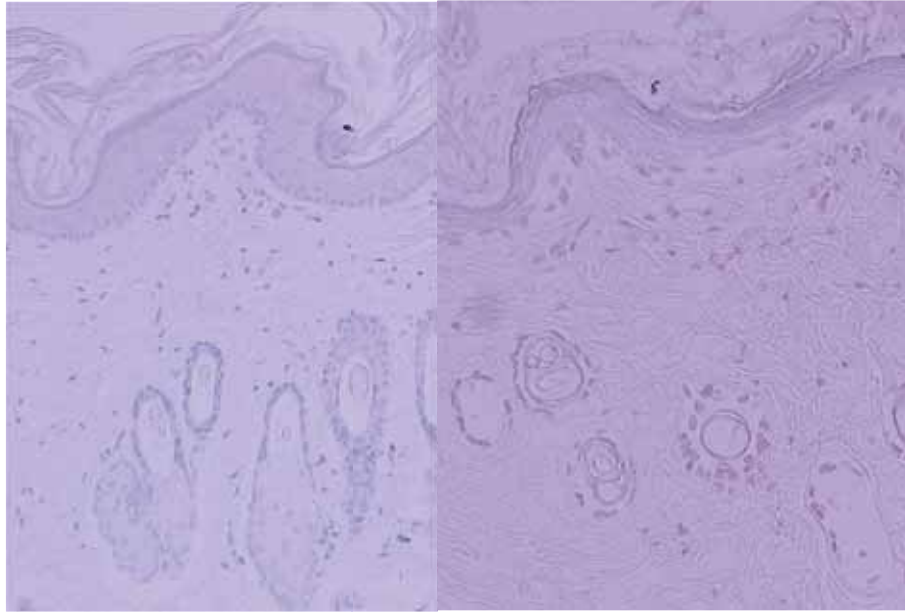


Figura 12. Inmunotinciones contra FGF foto del lado izquierdo y EGFR foto del lado derecho en cortes de piel intacta de rata macho.

Los resultados obtenidos en las muestras provenientes de tejido tratado con solución salina y diclorometano no mostraron diferencias en el patrón e intensidad de expresión de FGF y EGFR, por tal razón no se incluyen imágenes representativas de las inmunohistoquímicas realizadas.

VII. DISCUSIÓN

El tratamiento de heridas tiene un enorme impacto en la economía sanitaria, representando para muchos países uno de los mayores gastos en los recursos destinados a la salud (Wang, 2012). A pesar de los avances en la industria farmacológica, la disponibilidad de sustancias capaces de estimular los procesos de reparación siguen siendo limitadas (Csupor, 2010).

Diversos estudios han mostrado el efecto benéfico de ciertas plantas o sus extractos en el proceso de reparación de heridas cutáneas, señalando que compuestos derivados de plantas deben ser considerados como prospectos para el tratamiento de heridas (Bhaskar *et al.*, 2012, Mehmood, 2010; Mekonne *et al.*, 2013; Balekar *et al.*, 2012). En el presente estudio se evaluaron macroscópica y microscópicamente, heridas cutáneas tratadas con extractos

de hexano y diclorometano de la planta *Ipomea pes-caprae*, utilizando como control negativo solución fisiológica de NaCl al 0.9%, y como control positivo, ungüento con 35mg de Madecassol (Zelinha et al., 2010; Ipek et al., 2012).

Se ha reportado en algunos países que *Ipomea pes-caprae* es usada en la medicina tradicional como tratamiento para la neuralgia y artritis, así como para el tratamiento de cólicos (Chistensen and Reese, 1983); de igual forma, se ha encontrado que extractos de *I. pes-caprae* contrarrestan la actividad proteolítica y hemolítica de ciertas toxinas de medusa, e inhiben contracciones entéricas en cuyos inducidas por histidina, acetil-colina y bradicinina (Sampson, 2000). En el presente trabajo se ha demostrado otro uso posible de esta planta en el tratamiento de heridas cutáneas, ya que los extractos de diclorometano y hexano mostraron tener efectos positivos en la reparación de heridas cutáneas inducidas en ratas.

En este estudio, en la evaluación macroscópica se observaron diferencias significativas entre los extractos de diclorometano y hexano, los cuales mostraron reducir la longitud de la herida de manera más marcada a partir de los días 6 y 9, respectivamente; en el caso del extracto de hexano, la diferencia en la longitud de la herida no fue estadísticamente significativa sino hasta el noveno día del experimento. Este hallazgo demuestra una mayor eficacia del extracto de diclorometano, lo cual puede deberse a que ambos extractos difieren en las sustancias activas obtenidas con cada disolvente. La mayoría de los reportes farmacológicos de diversas plantas evalúan la capacidad de extractos orgánicos solubles o acuosos por su habilidad en la reparación de heridas de ratas o ratones, lo cual representa que los constituyentes químicos pueden ser muy diversos entre los extractos, y por lo tanto, pueden tener diferentes acciones sobre el microambiente de la herida (Kumar et al., 2007). Esto se ha podido demostrar debido a que los compuestos polifenólicos de plantas pueden tener un efecto inespecífico al actuar contra infecciones bacterianas y estimular la proliferación y diferenciación de queratinocitos (Werdin et al., 2009, Deters et al., 2001), mientras que los oligo y polisacáridos estimulan la proliferación de queratinocitos y fibroblastos (Brunold et al., 2004;

Deters *et al.*,2008; Zippel *et al.*, 2009), así como la formación de colágeno y componentes de la matriz extracelular (Deters *et al.*, 2005).

Por otro lado, la evaluación histopatológica confirmó una mejor reparación de las heridas tratadas con el extracto de diclorometano, debido al incremento en la deposición de colágena y fibroblastos en el tejido de granulación. La capacidad curativa de algunos extractos y compuestos ha sido atribuida al aumento de la formación de colágena y a la angiogénesis (Shukla *et al.*, 1999). La angiogénesis en el tejido de granulación mejora la circulación del sitio de la herida, y por lo tanto, la oxigenación y llegada de nutrientes esenciales para el proceso de reparación (Szabo *et al.*, 1995). La estimulación y proliferación de células epiteliales son importantes en este proceso; esto es evidente en el estudio de Habibipour (2003), en el cual heridas tratadas con fenitoína contenían una mayor cantidad de fibroblastos, colágena y neovascularización, lo cual al final resultó en un incremento de la fuerza tensil y aceleración de la reparación de la herida.

Los resultados del extracto de diclorometano de *I. pes-caprae* muestran que al día 6 después de la lesión, hay necrosis moderada, angiogénesis y tejido de granulación abundante, en cuanto a los tipos celulares existen macrófagos, fibroblasto y neutrófilos, sin embargo, no hay diferencias con los otros grupos; al final de esta fase (día 9) con dicho extracto no hay tejido de granulación y se observan abundantes vasos sanguíneos, la reepitelización está avanzada al igual que el proceso de remodelación, esto se correlaciona con el corte histológico obtenido el día 12, donde finalmente se llega a la remodelación con escaso tejido fibroso, lo cual no se observó en los demás grupos comparados.

Todo esto sugiere que la actividad cicatrizante se debe a la activación de fibroblastos, los cuales están presentes en la etapa final de remodelación para convertirse en miofibroblastos y favorecer una mejor cicatriz (Spiekstra *et al.*, 2007).

La estimulación de la proliferación y diferenciación de ciertas poblaciones celulares importantes en el proceso de reparación (macrófagos, fibroblastos,

queratinocitos) es un proceso mediado de forma específica por factores de crecimiento, tales como HGF, KGF, TGF (Zippel *et al.*, 2010). En nuestro estudio no fue posible observar cambios en el factor de crecimiento FGF-2 ni en el receptor para EGF (EGFR) en los animales tratados con el extracto de diclorometano, de acuerdo a la bibliografía también se sugiere que los folículos pilosos de la piel, son reservorios de células madre, que cuando hay una herida en la piel se pueden diferenciar a células epiteliales, para resarsir el daño. Esto nos indica que posiblemente los componentes del extracto no tengan efecto en el aumento de secreción del FGF-2, ni en el aumento de la expresión de los EGFR en la superficie celular. Consideramos importante estudiar si existe efecto de dicho extracto en la secreción de ligandos de otros factores de crecimiento, lo cual no fue posible debido a la poca disponibilidad de reactivos para inmunohistoquímica, que nos forzó a la utilización de un anticuerpo para receptor en vez de uno para su ligando (EGF).

El proceso de reparación es promovido por diversos productos naturales; productos de plantas que están compuestos esencialmente de taninos, saponinas, flavonoides, triterpenos, alcaloides y naftoquinonas, entre otras biomoléculas (Sumitra *et al.*, 2005). Estos agentes tienen actividad sobre una o más fases de la reparación, y están involucradas en la desinfección de la herida, además de promover un ambiente húmedo que ayude al establecimiento de un medio propicio para el proceso de reparación natural.

En los extractos de *Ipomoea pes-caprae* se han encontrado compuestos como E-fitol y damascenona (Pongprayoon *et al.*, 1990 y 1992), que poseen actividad antiinflamatoria y analgésica a través de la inhibición de la prostaglandina E₂, lo cual nos hace pensar que dichos compuestos pueden regular esta respuesta inespecífica del sistema inmune durante la fase inflamatoria del proceso de reparación (Bohlin *et al.*, 1993). Por otro lado, se observa una mejor remodelación, probablemente por una mayor cantidad colágena; esto debido a que de esta planta se han aislado 8 ésteres de ácido quínico que inhiben la actividad de la colagenasa (Teramachi *et al.*, 2005), además de no tener actividad citotóxica. Es importante mencionar que los

compuestos aislados por Pongprayoon (1992), presentan actividad antiespasmódica, lo que ayudaría a la reparación de la lesión cutánea, debido a que aumenta la permeabilidad vascular. En la literatura se ha reportado que algunas plantas, como *Flabellaria paniculata* (Joseph *et al.*, 2010), aceleran la reparación de heridas a través de su efecto antimicrobiano. Este podría ser el caso, debido a que *I. pes-caprae* se ha usado en la medicina tradicional para tratar la gonorrea (Khan *et al.*, 1994), además, se han aislado oligosacáridos que contienen xilosa y que presentan esta actividad contra *Staphylococcus aureus* (Escobedo-Martínez *et al.*, 2010).

La vía por la cual los dos extractos de *Ipomea pes-caprae* mejoran el proceso de reparación de heridas cutáneas no ha podido ser explicado en este estudio, pues es necesario estudiar el mecanismo de acción de estos extractos; aunque es evidente que los compuestos apolares del extracto de dicloro juegan un papel más importante en el efecto terapéutico. Este fenómeno fue compartido por extractos etanólicos no polares de *Centaurea sadleriana*, los cuales mostraron superioridad terapéutica en la reparación de heridas sobre los extractos polares de la misma planta (Csupor *et al.*, 2010). De esta forma se podría decir que las propiedades benéficas de *Ipomoea pes-caprae* durante la reparación pueden ser atribuibles a los metabolitos secundarios presentes en la planta y en los extractos y un proceso más rápido de reparación puede estar en función al efecto individual de ellos o bien, a su efecto en conjunto, dependiendo de los compuestos extraídos por el disolvente.

Cabe mencionar que diversos estudios señalan tres mecanismos generales por los cuales diferentes extractos de plantas ejercen la actividad cicatrizante, que son: actividad antibacteriana, efecto antioxidante y aumento de la migración, proliferación y diferenciación celular. En algunos casos, las plantas o sus extractos presentan estas tres características, siendo el caso de *Bridelia ferruginea*, cuyos extractos acuosos y etanólicos inhibieron el crecimiento bacteriano y estimularon la proliferación de fibroblastos *in vitro*, e igualmente protegieron a estos últimos de daños por radicales libres (Adetutu *et al.*, 2011). De igual forma, la planta *Morinda citrifolia* conocida comúnmente como noni,

cuenta con propiedades antibacterianas, antioxidantes, analgésicas, hemostáticas y astringentes; en ella se ha demostrado la presencia de sustancias activas como saponinas, triterpenos, taninos, alcaloides, glucósidos iridoides y flavonoides, responsables de dichos efectos en la reparación de heridas (Fehmeeda *et al.*, 2014, Suwiti *et al.*, 2010; Mills y Bone *et al.*, 2000; Rasal *et al.*, 2008). Sin embargo, su actividad antioxidante no fue evidente en un modelo *in vivo* en heridas de ratas, poniendo en duda dicho efecto sobre el proceso de reparación (Yuslianti *et al.*, 2013).

Se ha reportado que los antioxidantes son importantes coadyuvantes en la reparación al proteger a los tejidos de daño oxidativo (Martin, 1996). Además, se ha demostrado que existe una correlación entre extractos de plantas de uso medicinal para el tratamiento de heridas (*Phyllanthus muellerianus*, *Pycnanthus angolensis* y *Combretum smeathmanni*) con su capacidad para alterar la fisiología de fibroblastos y queratinocitos, y su capacidad antioxidante (Agyare *et al.*, 2009; Pattanaik *et al.*, 2014).

En cuanto a la actividad antibacterial, se ha demostrado que diferentes extractos de diferentes partes de las plantas (*Agrimonia eupatoria*, *Arctium minus* y *Potentilla reptans*) usadas para el tratamiento de heridas en Reino Unido, poseen dicha actividad, llegando a inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias gram-positivas y algunas veces de gram-negativas (Watkins *et al.*, 2012). En estudios recientes se ha demostrado que consituyentes fitoquímicos como los flavonoides (Tsuchiya *et al.*, 1996) y terpenoides (Scortichini *et al.*, 1991) son conocidos por su capacidad para mejorar el proceso de reparación, principalmente mediante sus acciones astringentes y antimicrobianas, que parecen ser responsables de la contracción de la herida y del aumento en la tasa de re-epitelización (Jain, 2010). En un estudio realizado en el 2014 por Fahmeeda *et al* (2014), se demostró la presencia de alcaloides, terpenoides, taninos, flavonoides y esteroiedes en un extracto a base de etanol de la planta *Aegle marmelos*, el cual mostró poseer actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas y gram negativas, y actividad antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida sp* (Fahmeeda *et al.*, 2014).

Sin embargo estudios realizados con extractos de etanol y hexano de las plantas *Brugmansia suaveolens*, *Eupatorium laevigatum*, *Galinsonga parviflora*, *Iresine herbstii*, *Kalanchoa turbiflora*, *Petiveria alliacea*, *Pluchea sagittalis*, *Piper regnellii*, *Schinus molle*, *Sedum dendroideum*, *Waltheria douradinha*, *Xanthium cavanillesii*; demostraron actividad antibacterial *in vitro* de moderada a nula (Schmidt *et al.*, 2009).

Ebelin, en el 2014, encontró que los triterpenos de la planta *Betula alba*, aumentaron la migración de queratinocitos *in vitro*, así como la expresión de estructuras de actina tales como, filopodias, lamelipodias y fibras de tensión, las cuales contribuyen a la migración celular. Sin embargo, no encontró ningún aumento en la proliferación de queratinocitos (Ebelin *et al.*, 2014).

En resumen, podemos concluir que, sea cual sea la planta, su actividad sobre el proceso de reparación recae en sus componentes fitoquímicos. Estos componentes han sido estudiados y discutidos en gran número de trabajos, siendo los principales los taninos, las saponias y los flavonoides.

Se ha encontrado que los taninos son benéficos en el tratamiento de la dermatitis al coagular proteínas de superficie, reduciendo así la permeabilidad y secreción, al formar una capa protectora y debido a su propiedades antimicrobiales (Bedi *et al.*, 2002). *Vermonia scorpioides*, *Terminalia arjuna* y *Hibiscus rosa sinesis* tienen actividad pro-reparativas debido a la presencia de taninos, con un efecto sobre la regeneración y organización de los tejidos (Bashkar *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2002; Chaudhari *et al.*, 2006). Los polisacáridos de *Opuntia ficus indica* también demostraron facilitar el cierre de heridas cutáneas (Trombetta, 2006). Además, también se sabe que las saponinas promueven el proceso de reparación debido a su actividad antioxidante y antimicrobial (Mukherjee, 2002). Finalmente, los flavonoides detectados en plantas medicinales evitan la lipoperoxidación, por lo tanto, incrementan la viabilidad de las fibras de colágena facilitando la vascularidad y resistencia de las mismas, además de proteger la síntesis de DNA y disminuir la necrosis (Getie *et al.*, 2002; Shetty *et al.*, 2008).

VIII. CONCLUSIONES

El extracto de diclorometano aceleró la cicatrización, lo cual marca la pauta para utilizar otras concentraciones con el fin de evaluar si hay una mejora en la cicatrización.

La planta *Ipomoea pes-caprae* demostró actividad cicatrizante al tener una mejor remodelación de la herida, en un tiempo menor que los controles.

Es necesario realizar estudios de purificación del extracto para aislar los componentes fitoquímicos presentes, responsables de la actividad cicatrizante.

IX. PERSPECTIVAS

Para futuras investigaciones sobre esta planta, será necesario realizar pruebas complementarias, para saber como es que acelera la cicatrización, cual es el ingrediente activo que ayuda al proceso de cicatrización y estudiar en que parte de la planta se encuentra presente el ingrediente activo.

X. REFERENCIAS

- Adetutu A., Morgan W.A., Corcoran O. 2011. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* 133(1):116-9.
- Agaiby A.D., Dyson M. 1999. Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. *Journal of anatomy* 195(4): 531-542.
- Aguilar, B. R. (2001). Plantas, cultura y sociedad: estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa 311-315.
- Agyare C., Asase A., Lechtenberg M., Niehues M., Deters A., Hensel A. 2009. An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* 125(3):393-403.
- Agyare C., Asase A., Lechtenberg M., Niehues M., Deters A., Hensel A. 2009. An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* 125:393–403.
- Akdemir Z., Kahraman C., Irem T.I., Kupeli A. E., Suntar I.; Keles H. 2010 Bioassay-guided isolated of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flower of *Verbascum mucronatum* Lam. *Journal of the Ethnopharmacology* 136: 436-443.
- Atif D., Mary D. 1999. Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. *Journal Anatomy* 195:531-542.
- Balekar N., Katkam N.G., Nakpheng T., Jehtae K., Srichana T. 2012. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 141:817–824.
- Baum C.L., Arpey C.J. 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatology surgery* 31(6): 674-686.
- Bedi M.K., Shenefelt P.D. 2002. Herbal therapy in dermatology. *Archives of Dermatology* 138(2):232-42.
- Benavides J. 2008. Reparación de heridas cutáneas. *Revista de la Asociación Dermatológica* 16:(1)29-35.

Bhaskar A., Nithya V. Evaluation of the wound-healing activity of *Hibiscus rosa sinensis* L (Malvaceae) in Wistar albino rats. 2012. Indian Journal of Pharmacology 44(6):694-8.

Bhat S. C., Goswami., Ghosh U.C. 2005. Removal of trace chromium (VI) from contaminated water: bio-sorption by *Ipomea aquatica*. Journal of Environmental Engineering and Science 47(4): 316-321.

Bodnar J.R. 2011. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. Advances in wound care 2(1): 24-29.

Bogado E. F.; Lozina L. A.; Ríos E. E.; Acosta de Pérez O. C. 2005. Evolución de heridas en equinos tratados con distintos cicatrizantes elaborados en la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas . Universidad Nacional de Nordeste. V-014.

Bohlin, L. 1983. Research on ethnopharmacologically active natural products at the Department of Pharmacognosy, Uppsala University. Journal of Ethnopharmacology 38: 225-231.

Brown R.L., Ormsby I., Doetschman T.C., Greenhalgh D.G. 1995. Wound healing in the transforming growth factor-beta-deficient mouse. Wound repair and regeneration 3(1): 25-36.

Brunold C., Deters A., Knoepfel-Sidler F., Hafner J., Müller B., Hensel A. 2004. Polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* flowers stimulate proliferation and differentiation of human keratinocytes. Planta Medica 70(4):370-3.

Campbell P., Morton P., Takeichi T., Salam A., Roberts N., Proudfoot L.E., Mellerio J.E., Aminu K., Wellington C., Patil S.N., Akiyama M., Liu L., McMillan J.R., Aristodemou S., Ishida-Yamamoto A., Abdul-Wahab A., Petrof G., Fong K., Harnchoowong S., Stone K., Harper J.I., McLean W.H., Simpson M.A., Parsons M., McGrath J.A. 2014. Epithelial Inflammation Resulting from an Inherited Loss-of-Function Mutation in EGFR. The journal of investigative dermatology.

Castrillon R.L.E., Palma R.A., Padilla D.C., 2008. La función inmunológica de la piel. Dermatología Revista Mexicana 52(5) 211-224.

Chaudhari M., Mengi S. 2006. Evaluation of phytoconstituents of *Terminalia arjuna* for wound healing activity in rats. Phytotherapy Research 20(9):799-805.
Christian L., Baum M.D., Christopher J., Arpey M.D. 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. Dermatol Surg. 31:674-686.

CONABIO (2013). "Convolvulaceae, *Ipomea pes-caprae* (L.) R. Br., Bejuco de playa." from

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/convolvulaceae/ipomoea-pes-caprae/fichas/ficha.htm>.

Csupor D., Blazsó G., Balogh A., Hohmann J. 2010. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 127(1):193-5.

Desmoulière A., Gabbiani G. 1994. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during pathological situations: the role of extracellular matrix and cytokines. *Cell motility and the cytoskeleton* 29(3):195-203.

Deters A., Dauer A., Schnetz E., Fartasch M., Hensel A. 2001. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry* 58(6):949-58.

Deters A., Petereit F., Schmidgall J., Hensel A. 2008. N-Acetyl-D-glucosamine oligosaccharides induce mucin secretion from colonic tissue and induce differentiation of human keratinocytes. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 60(2):197-204.

Deters A.M., Schröder K.R., Hensel A. 2005. Kiwi fruit (*Actinidia chinensis* L.) polysaccharides exert stimulating effects on cell proliferation via enhanced growth factor receptors, energy production, and collagen synthesis of human keratinocytes, fibroblasts, and skin equivalents. *Journal of Cell Physiology* 202(3):717-22.

Demidova-Rice T.N., Hamblin M. R., Herman I. M. 2012. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: Role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv Skin Wound Care*. 25(8): 349–370.

Devalaraja R.M., Nanney L.B., Du J., Qian Q., Yu Y., Devalaraja M.N., Richmond A. 2000. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *The Journal of investigative dermatology* 115(2):234-44.

Domínguez S. A.: Acosta U. L.; Cuello D. 2001. Efecto cicatrizante de extracto fluido de hojas de siempreviva. *Revista Cubana Planta Médica* 1: 16-18.

Dovi J.V., He L.K., DiPietro L.A. 2003. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *Journal of leukocyte biology* 73(4): 448-455.

Ebeling S., Naumann K., Pollok S., Wardecki T., Vidal-Y-Sy S., Nascimento J.M., Boerries M., Schmidt G., Brandner J.M., Merfort I. 2014. From a traditional medicinal plant to a rational drug: understanding the clinically proven wound healing efficacy of birch bark extract. *PLoS One* 22;9(1):e86147.

Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology* 127(3):514-25.

Escobedo M. C., Pereda M. R. 2007. Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *Journal of Natural Products* 70(6): 974-978.

Escobedo-Martínez, C. and R. Pereda-Miranda (2007). "Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*." *Journal Natural Products* 70(6): 974-978.

Fehmeeda B., Jayaprakashreddy G., Shivakrishna, Rajitha K. 2014. Wound healing antimicrobial and antifungal activities of ethanolic leaf extract of *Eagle marmelos* in rats. *Journal of Cell and Tissue Research* 14(1): 4173-4179.

Getie M., Gebre-Mariam T., Rietz R., Neubert R.H. 2002. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae). *Pharmazie* 57(5):320-2.

Gómez Álvarez, R. (2012). "Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México." *Revista fitotecnia mexicana* 35(1): 43-49.

Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453: 314-321.

Habibipour S., Oswald T.M., Zhang F., Joshi P., Zhou X.C., Dorsett-Martin W., Lineaweaver W.C. 2003. Effect of sodium diphenylhydantoin on skin wound healing in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery* 112(6):1620-7.

Hang T.C., Tedford N.C., Reddy R.J., Rimchala T., Wells A., White F.M., Kamm R.D., Lauffenburger D.A., 2013. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Platelet (PF-4) Factor 4 Inputs Modulate Human Microvascular Endothelial Signaling in a Three-Dimensional Matrix Migration Context. *Molecular & Cellular Proteomics* 12: 3704-3718.

Ignotz R.A., Massagué J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry* 261(9): 4337-45.

Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in wound healing sites of mouse skin. *Archives of dermatology research* 284(4): 193-197.

Jain N., Jain R., Jain A., Jain D.K., Chandel H.S. 2010. Evaluation of wound-healing activity of *Acorus calamus* Linn. *Natural Product Research* 24(6):534-41.

Johnson K.E., Wilgus T. A. 2014. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *ADVANCES IN WOUND CARE*, 3(10): 647-661.

- Khan M.M., Ahmad F., Rastogi A.K., Kidwai J.R. 1994. Insulinogenic and hypoglycemic activities of *Ipomoea pes-caprae*. *Fitoterapia* 65: 231-234.
- Kumar B., Vijayakumar M., Govindarajan R., Pushpangadan P. 2007. Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology* 114(2):103-113.
- Kumar V., Abbas K. A., Fausto N., Aster C. J. 2010 *Pathologic Basis of Disease*. Editorial Saunders Elsevier. Eighth edition. 79-109pp. Philadelphia.
- Kurita Y., Tsuboi R., Ueki R., Rifkin D.B., Ogawa H. 1991.
- Lansdown A.B., Sampson B., Rowe A. 1999. Sequential changes in trace metal, metallothionein and calmodulin concentrations in healing skin wounds. *Journal of Anatomy*(3):375-86.
- Leite S.N., Palhano G., Almeida S., Biavatti M.W. 2002. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. *Fitoterapia* 73(6):496-500.
- Li J., Chen J., Kirsner R. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology* 25: 9-18.
- Li J., Zhang Y.P., Kirsner R.S. 2003. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy research and technique* 60(1):107-14.
- Liduína M. M., De Oliveira M., Sousa N-P D., Rocha T. A., Freitas M. E., Araujo L-V. I., De Melo P. F., Cabral C. C., De Morales M. S. 2010 In vivo tropical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm, seed. *Journal of Ethnopharmacology* 129:214-219.
- Mahdavian Delavary B., van der Veer W.M., van Egmond M., Niessen F.B., Beelen R.H. 2011. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216(7): 753-762.
- Maquart F.X., Monboisse J.C. 2014. Extracellular matrix and wound healing. *Pathologie-biologie* 62(2):91-5.
- Maria de Souza M., Madeira A., Berti C., Krogh R., A Yunes R., Cechinel-Filho V. 2000. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *Journal Ethnopharmacology* 69(1):85-90.
- Mark D. S., Zena W. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:143-516.
- Martin A. 1996. The use of antioxidants in healing. *Dermatology Surgery* 22(2):156-60.

Martin J., Hoogduijn, Erwin G., PAUL G. G. 2006. Comparative Characterization of Hair Follicle Dermal Stem Cells and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 15:49–60.

Mcheik J.N., Barrault C., Levard G., Morel F., Bernard F.X., Lecron J.C. Epidermal Healing in Burns: Autologous Keratinocyte Transplantation as a Standard Procedure: Update and Perspective. 2014. *Plastic and reconstructive surgery*. Global open. 72(9):218.

McQuibban G.A., Gong J.H., Wong J.P., Wallace J.L., Clark-Lewis I., Overall C.M. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100(4):1160-7.

Menéndez B. A.; Lagarto P. A.; Bueno P. V.; Carrillo D. C.; Valdéz M. O. Sardiñas G. I.; Muñoz A. 2007. Actividad cicatrizante y ensayos de irritación de la crema de *Calendula officinalis* al 1 %. *Latin American Journal of Pharmacy* 26(6): 811-817.

Mekonnen T., Urga K., Engidawork E. 2013. Evaluation of the diuretic and analgesic activities of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* Jacq in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 127:433–439.

Mills S., Bone K. 2000. Principles and practice of phytotherapy: Modern herbal medicine. Churchill Livingstone, Edinburgh U.K. pp 27-58.

Mukherjee P.K. 2002. Quality control herbal drugs: An approach to evaluation of botanicals. New Delhi: Business Horizons 546-549.

Mutsaers S.E., Bishop J.E., McGrouther G., Laurent G.J. 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29(1):5-17.

Nathoo R., Howe N., Cohen G. 2014. Skin substitutes: an overview of the key players in wound management. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* 7(10):44-8.

Navarrete G.F., 2003. Histología de la piel. *Rev. Fac. Med. UNAM* 46:(4) 130-133.

Olugbuyro A.J.; Abo K.A.; Leigh O.O.; 2010. Wound healing effect of *Flabellaria paniculata* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 127:786-788.

Parasakthy, K., Shantji S., Devaraj. 1993. Lung injury by furanoterpenoids isolated from *Fusarium solani* infected sweet potato, Ipomea batatas. *Indian Journal of Experimental Biology* 31(4): 397-398.

Pattanaik S., Candra S.S., Pal A., Panda J., Shankar N.S. 2014. Wound healing activity of methanolic extract of the leaves of *Crataeva magna* and

Euphorbia nerifolia in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science 4 (3): 46-49.

Pesin S.I. Kupeli A. E. Yilmazer D. Baykal T. Kirmizibekmez H. Alper M. Yesilada E. 2010. Investigation on the in vivo wound healing potential of *Hipericum perforatum* L. Journal of Ethnopharmacology 127:468-477.

Poger D, Mark A.E., 2014. Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor: A Series of Twists and Turns. Biochemistry.

Pongprayoon U., Baeckström P., Jacobsson U., Lindström M., Bohlin L. 1991. Compounds inhibiting Prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. Planta medica 57:515-518.

Pongprayoon U., Baeckström P., Jacobsson U., Lindström M., Bohlin L. (1992). Antispasmodic activity of β -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. Planta medica 58(01): 19-21.

Pontones, D. M. D. (2009). *Ipomoea*: un género con tradición. Contactos Revista de Educación e Ingeniería 73: 36-44.

Rasal V.P., Sinnathambi A., Ashock P., Yeshmaina S. 2008. Wound healing and antioxidant activities of *Morinda citriflora* leaf extract in rats. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics 7:49-52.

Ramírez H.G.R. 2010. Fisiología de la Cicatrización Cutánea. Revista Facultad de Salud. 2(2):68-78. Colombia.

Reinke J.M., Sorg H. 2012. Wound repair and regeneration. Review Articles, Systematic Reviews and Meta-Analyses. 49:35-43.

Robbins, S. L. (2010). Robbins basic pathology. V. Kumar, A. K. Abbas, & J. C. Aster (Eds.). Elsevier Health Sciences.

Sampson JH, Phillipson JD, Bowery NG, O'Neill MJ, Houston JG, Lewis JA. 2000. Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of in vitro biological activity in receptor binding assays. Phytotherapy Research 14(1):24-9.

Schmidt C., Fronza M., Goettert M., Geller F., Luik S., Flores E.M., Bittencourt C.F., Zanetti G.D., Heinzmann B.M., Laufer S., Merfort I. 2009. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. Journal of Ethnopharmacology 122(3):523-32.

Schultz G.S., Wysocki A. 2008. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. Wound repair and regeneration 17(2): 153-162.

Schwartz J.R., Marsh R.G., Draelos Z.D. 2005. Zinc and skin health: overview of physiology and pharmacology. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery* 7 (2):837-47.

Schultz G. S., Wysocki A. 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Rep Reg* 17 153–162.

Scortichini M., Pia Rossi M. 1991. Preliminary in vitro evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpeoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill). *Journal of Applied Bacteriology* 71(2): 109-112.

Serini G., Bochaton-Piallat M.L., Ropraz P., Geinoz A., Borsi L., Zardi L., Gabbiani G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *The Journal of cell biology* 142(3):873-81.

Shetty S., Udupa S., Udupa L. 2008. Evaluation of Antioxidant and Wound Healing Effects of Alcoholic and Aqueous Extract of *Ocimum sanctum Linn* in Rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5(1):95-101.

Shivhare Y. Pradeep K. Singour U.K. Patil R. S. Pawar R. S. 2010 Wound healing potential of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Rokb (fruits) in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 127:614-619.

Shukla A., Rasik A.M., Jain G.K., Shankar R., Kulshrestha D.K., Dhawan B.N. 1999. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology* 65(1):1-11.

Solingen V.C., Araldi E., Chamorro-Jorganes A., Fernández-Hernando C., Suárez Y. 2014. Improved repair of dermal wounds in mice lacking microRNA-155. *Journal of cellular and molecular medicine*.18(6):1104-12.

Spiekstra S.W., Breetveld M., Rustemeyer T., Scheper R.J., Gibbs S. 2007. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Rep Reg* 15:708–717.

Sumitra M., Manikandan P., Suguna L. 2005. Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37(3):566-73.

Szabo S., Kusstatscher S., Sakoulas G., Sandor Z., Vincze A., Jadus M. 1995. Growth factors: new 'endogenous drugs' for ulcer healing. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 210:15-8.

Theilgaard-Mönch K., Knudsen S., Follin P., Borregaard N. 2004. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *Journal of immunology* 172(12):7684-93.

Thomas A. 1995. Hematoxilina y Eosina. Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). pp. 55-58.

Thorey IS, Hinz B., Hoeflich A., Kaesler S., Bugnon P., Elmlinger M., Wanke R., Wolf E., Werner S. 2004. Transgenic mice reveal novel activities of growth hormone in wound repair, angiogenesis, and myofibroblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 279(25):26674-84.

Trombetta D., Puglia C., Perri D., Licata A., Pergolizzi S., Lauriano E.R., De Pasquale A., Saija A., Bonina F.P. 2006. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. *Phytomedicine* 13(5):352-8.

Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Iinuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 50(1):27-34.

Toru Imamura. 2014. Physiological functions and underlying mechanisms of fibroblast growth factor (FGF) family members: recent findings and implications for their pharmacological application. *Biol. Pharm. Bull.* 37(7) 1081–1089.

Vargas S. R., Pérez G. R. M., Cervantes R. M., Gallardo V. I. C. 2009. Estudio preliminar de la actividad cicatrizante de *Prostechea michuacana*. VII Congreso Internacional AMCAL. 23-26 de septiembre. Zacatecas, Zac.

Vaughan M.B., Howard E.W., Tomasek J.J. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Experimental cell research* 257(1):180-9.

Villaseñor, R. JL y FJ Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario, Fondo de Cultura Económica. México, DF.

Wang J., Zhang Y., Zhang N., Wang C., Herrler T., Li Q. 2015. An updated review of mechanotransduction in skin disorders: transcriptional regulators, ion channels, and microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Review

Wang R., Lechtenberg M., Sendker J., Petereit F., Deters A, Hensel A. 2013. Wound-healing plants from TCM: in vitro investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Fitoterapia* 84:308-17.

Watkins F., Pendry B., Sanchez-Medina A., Corcoran O. 2012. Antimicrobial assays of three native British plants used in Anglo-Saxon medicine for wound healing formulations in 10th century England. *Journal of Ethnopharmacology* 144(2):408-15.

- Werdin F., Tennenhaus M., Schaller H.E., Rennekampff H.O. 2009. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty* 9:e19
- Werner R., Grose R. 2003. Regulation of wound of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 83(3): 835-870.
- Werner S. 1998. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine & growth factor reviews* 9(2): 153-165.
- Werner S., Peters K.G., Longaker M.T., Fuller-Pace F., Banda M.J., Williams L.T. 1992. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proceedings of the national academy of science of United States of America* 89(15): 6896-6900.
- Whitby D.J., Ferguson M.W. 1991. Immunohistochemical localization of growth factor in fetal wound healing. *Developmental biology* 147(1): 207-215.
- Wilgus T.A. 2012. Growth factor-extracelullar matrix interactions regulate wound repair. *Advances in wound care* 1(6): 249-254.
- Wong T., McGrath J.A., Navsaria H. 2007. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *The British journal of dermatology* 156(6):1149-55.
- Yuslianti E.R., Sabirin I.P.R., Sovia E. 2013. Effect of topical ethanol extracts of *Morinda citriflora* L. leaves on excisional wound healing. *International Journal of Pharmacology* 9(5): 318-321.
- Zippel J., Wells T., Hensel A. 2010. Arabinogalactan protein from *Jatropha curcas* L. seeds as TGF β 1-mediated inducitor of keratinocyte in vitro differentiation and stimulation of GM-CSF, HGF, KGF and in organotypic skin equivalents. *Fitoterapia* 81(7):772-8.