



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del efecto cicatrizante del
extracto acuoso de *Malva parviflora***

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
GARCÍA FLORES EDUARDO**

Director: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor: M.C. Maurilio Flores Pimentel



MÉXICO, D.F. 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.

Agradecimientos

El presente trabajo se concluyó por medio de la contribución de varias personas con distintas especialidades, que aportaron su conocimiento para sumar esfuerzos y abarcar en conjunto más sabiduría. Con alegría se les agradece pero además se les respeta con igualdad y fraternidad.

Se agradece también a la Universidad Nacional Autónoma de México por el lugar otorgado para el estudio de la carrera pero sobre todo se agradece a sus trabajadores, profesores, estudiantes y a todas esas personas que con su trabajo logran que nuestra Universidad esté viva.

Directamente en la creación de este estudio se agradece al profesor Ricardo por la ayuda para interpretación de cortes histológicos, también se reconoce y agradece el apoyo del profesor Luis Mora en el manejo estadístico de datos; a las maestras Yolanda Flores, Taide Arista, al doctor José Angel Rojas, al profesor Maurilio Flores, al doctor Rubén Marroquín y a ese laboratorio en conjunto que llevó de la mano la construcción de esta tesis.

El respeto por la vida misma hace mencionar como organismos sacrificados a los ratones que fueron tratados dentro de este estudio. Siempre se les trató respetuosamente.

Finalmente se dedica todo este trabajo contribuido a los inversionistas económicos y emocionales que creen en este proyecto de vida, mis amigos y familia, en especial a mi mamá Virginia Flores y a mi papá Miguel García, sin olvidar que también dedico mi trabajo a ti.

Contenido

I. Introducción	1
II. Marco teórico	2
2.1. Utilización de <i>Malva parviflora</i>	3
2.2. Características de <i>Malva parviflora</i>	3
2.3. Definición de herida y fases de la cicatrización	4
2.3.1. Inflamación	5
2.3.2. Proliferación	7
2.3.3. Formación de tejido de granulación	9
2.3.3.1 Reepitelización	9
2.3.4.1. Consumación de la reepitelización	11
2.3.5. Contracción de la herida	12
2.3.6. Remodelación	13
2.4. Características de un ungüento	14
2.5. Pruebas para verificar la cicatrización	14
2.5.1. Cuantificación de nitritos	14
2.5.2. Cuantificación de ceruloplasmina	14
2.5.3. Cuantificación de peroxidación lipídica	15
III. Planteamiento del problema	16
IV. Hipótesis	17
V. Objetivos	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos particulares	18
VI. Diseño experimental	19
VII. Material y métodos	20
7.1. Obtención de extracto acuoso de <i>Malva parviflora</i>	20
7.2. Preparación del ungüento para el tratamiento	20
7.3. Modelo experimental	24
7.3.1. Método de evaluación del efecto cicatrizante	20
7.4. Pruebas para verificar la cicatrización	21
7.4.1. Cuantificación de nitritos	21
7.4.2. Cuantificación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial	22
7.4.3. Cuantificación de peroxidación lipídica	23
VIII. Resultados	24
8.1. Estadísticas de los resultados	24
8.2. Cortes histológicos	26
IX. Análisis de resultados	30
X. Conclusiones	32
XI. Perspectivas	33
XII. Referencias	34
XIII. Anexos	38

I. Introducción

Unas de las afectaciones más comunes a la salud de las personas han sido y serán las heridas expuestas en tejidos, estas heridas que en ocasiones se producen dentro de las actividades cotidianas y prácticamente es normal sufrir varias a lo largo de la vida. Cuando existe una herida es de interés atenderla para recuperar principalmente las capacidades motoras que pudieron haber quedado comprometidas, por tal motivo es que existen ya distintos productos que coadyuvan en la cicatrización de una herida, entre éstos, los remedios naturales son también utilizados popularmente, sin embargo no se puede confiar del todo en su actividad benéfica ya que en algunos casos no existen estudios que evalúen sus propiedades. Es por esto que se genera el interés de evaluar el efecto cicatrizante de *Malva parviflora* en base a su extracto acuoso obtenido, ya que esta planta es utilizada en México para el tratamiento de heridas en la piel de manera empírica, pues se cree que optimiza el proceso de cicatrización en una herida.

La cicatrización de los tejidos es un proceso complejo que involucra varios mecanismos dentro de un organismo y tiene como objetivo restituir tejido destruido por tejido vivo. A través de estudios se han identificado fases de la cicatrización como inflamatoria, proliferativa y de remodelación tisular, las cuales comúnmente son separadas con fines académicos pero en realidad funcionan simultáneamente para la reparación del defecto.

El presente diseño experimental, que tiene objetivo evaluar la actividad cicatrizante de *Malva parviflora*, se basó en un modelo *in vivo* de 4 grupos de seis ratones cada uno. Se comparó la eficiencia de cicatrización entre un grupo blanco negativo, un grupo blanco positivo, otro con concentración al 2% de extracto de malva y otro con 4% del extracto. Además, se practicaron pruebas inmunológicas de cuantificación de nitritos, ceruloplasmina y peroxidación lipídica, y se observaron al microscopio cortes histológicos de las heridas.

De esta manera el presente estudio permitió obtener información necesaria para atribuir o no, el efecto cicatrizante a *Malva parviflora*.

II. Marco teórico

2.1. Utilización de *Malva parviflora*

El tratamiento médico para sanar heridas incluye administración tanto tópica como sistémica de medicamentos dirigidos a coadyuvar la reparación celular. Los antibióticos, antisépticos y promotores de cicatrización son agentes tópicos utilizados comúnmente para la reparación del tejido dañado¹. Es común que se utilicen medicamentos comerciales para este tipo de tratamientos pero también se llegan a administrar productos naturales o hasta remedios populares basados en la utilización de plantas.

Los productos naturales han sido un recurso importante para el mantenimiento de la vida desde hace tiempo, éstos se han convertido en elementos primordiales para la medicina alternativa ya que son usados como tratamientos a base de plantas para enfermedades crónicas o como materia prima de donde son aislados complejos compuesto químicos con particular actividad biológica, por tanto hay una gran creencia en la eficiencia de las plantas medicinales y productos naturales. Sin embargo, existe una necesidad de aseguramiento y evaluación científica para la medicina tradicional antes de que estos puedan ser recomendados para el tratamiento de heridas¹, es por esto que el interés inicial sobre la utilización empírica de las plantas y su efecto, debe ser el de definir si le pertenece o no el presunto efecto a través de la investigación científica².

Las plantas se han convertido en una parte importante para el tratamiento de heridas pues los remedios generados a partir de éstas, por lo general además de ser económicos, son de fácil acceso también; sin embargo se han dado casos atípicos de hipersensibilidad con el uso de estos agentes. Algunos de estos remedios naturales pueden inducir por múltiples mecanismos la recuperación y regeneración de tejido perdido. Los extractos vegetales que se obtienen de plantas medicinales contienen diversos compuestos químicos con peso molecular tanto alto como bajo, dentro de los cuales se encuentran polisacáridos que pueden llegar a ser parcialmente responsables de la actividad cicatrizante en heridas³.

Para el tratamiento de una herida no se debe de pasar por alto que la presencia de un cuerpo extraño puede llegar a retrasar la cicatrización como resultado de sus propiedades irritantes directas o fomentando una infección. El uso constante de soluciones antisépticas irritantes y antibióticos puede causar gran daño y retrasar la cicatrización; así mismo, el cambio frecuente de apósitos sobre una herida, llega a perjudicar más que beneficiar⁴, en ocasiones se desarrolla hipersensibilidad a las sustancias químicas aplicadas y puede conducir a una inflamación extensa. Además, las partes lesionadas deben dejarse en reposo, pues el movimiento retrasa la cicatrización porque rompe los bordes de la herida y daña el delicado tejido de granulación originando una lesión repetida y posteriormente inflamación^{4,5}. Por otra parte, las alteraciones patológicas que afectan los vasos sanguíneos tienen gran influencia en el proceso de cicatrización de una herida. Los pacientes cuyas piernas tienen venas varicosas, obstrucciones arteriales o inflamación crónica muestran una cicatrización lenta; lesiones triviales en estos enfermos pueden originar ulceraciones que tardan muchos meses en cicatrizar⁴.

En México, donde la población tiene un alto índice de diabetes que ocasiona problemas dentro del proceso de cicatrización, se ha utilizado popularmente la *Malva parviflora* para tratar heridas en pie diabético⁶. Se administra tópicamente con una cataplasma acuosa o por administración oral continua de su infusión durante el tiempo de cicatrización.

A pesar de que esta planta es originaria de Europa y gracias a su adaptable crecimiento y multiplicación, ha llegado a convertirse en una hierba cosmopolita terapéutica pues también se han aprovechado sus propiedades en el continente africano y en América⁷. La hoja de esta planta es utilizada como tratamiento en pústulas y heridas infectadas e inflamadas, por el pueblo Xhosa de Sudáfrica; en Lesotho la planta se utiliza con alcohol para el tratamiento de contusiones y fracturas, además el polvo seco o una infusión de hojas y raíces son empleados por herbolarios para limpiar heridas y úlceras. En Etiopía, las raíces de malva son usadas en el tratamiento de asma y heridas⁷, y en México de manera empírica se utiliza para limpiar lesiones y para coadyuvar en la cicatrización.

En el año de 1999 Grierson y Afolayan mostraron que *M. parviflora* poseía un efecto inhibitorio sobre algunos hongos pero fue inefectivo contra algunas especies de bacterias⁸. En contraste, ese mismo año se reportó, por medio del método Kirby-Bauer (difusión de disco en agar), la actividad antibacteriana de los extractos a base de hexano y metanol de las raíces, sin embargo el extracto metanólico de las hojas mostró una actividad deficiente⁹.

Recientemente se han realizado estudios de *M. parviflora* donde se le atribuye actividad hipoglucemiante a su extracto en hexano¹⁰, y actividad antibacteriana al extracto acuoso junto con una pobre actividad antiinflamatoria⁹, pero a la malva silvestre, una especie diferente, se le atribuye una buena actividad antiinflamatoria utilizada principalmente para el aparato respiratorio y digestivo debida a su gran contenido de mucílagos (componentes que suavizan mucosas)¹¹. Sin embargo, en el presente estudio se evaluó principalmente el efecto cicatrizante de *M. parviflora* además de realizar otras pruebas para detectar actividad inflamatoria y oxidante.

2.2. Características de *Malva parviflora*



Imagen 01. *Malva parviflora*¹².

Malva parviflora de la familia: Malvaceae, que es también llamada simplemente malva o malva de los quesitos por los botones de semillas que deja la flor, tal como se observa en la imagen 01, tiende a un crecimiento de aproximadamente 0.5 metros, y no es sensible a climas fríos, las flores son hermafroditas y al igual que como muchas plantas son polinizadas por insectos, y ya que produce un fuerte y profundo sistema de raíz, logra retoñar después de haber sido cortada.

Las hojas y semillas son también aprovechadas culinariamente y pueden ingerirse siendo simplemente cocidas con agua. A pesar de que no parece verse afectado en gran medida su crecimiento y multiplicación por su consumo, sí puede verse afectada por infestación de la roya particular de las malvas (*Puccinia malvacearum*), un hongo que crece en pequeñas formas circulares de alrededor de 1 mm de diámetro por debajo de las hojas de la malva^{13, 14}, se puede observar cómo se presenta la infestación de este hongo en la siguiente imagen.



Imagen 02. *Malva parviflora* infestada por roya¹⁴. Cuando se encuentra afectada por este hongo no se utiliza culinariamente ni con fines terapéuticos.

2.3. Definición de herida y fases de la cicatrización

Una herida se define como una pérdida o rotura de la continuidad celular anatómica o funcional de los tejidos vivos; es un proceso que inicia por un trauma y con frecuencia termina con la formación de cicatrices², las cuales se generan a partir de la reparación del tejido dañado y son el resultado de procesos complejos que implican una serie de reacciones bioquímicas y celulares que a partir de la fase de inflamación, seguida por la reparación y remodelación del tejido lesionado, logran contraerlo y lograr una reducción evidente del tamaño de la cicatriz para concluir este proceso¹⁵. A continuación, en la imagen 03 se presentan las fases de la cicatrización que a pesar de que didácticamente se explican de manera separada, en realidad ocurren de manera simultánea hasta la remodelación.

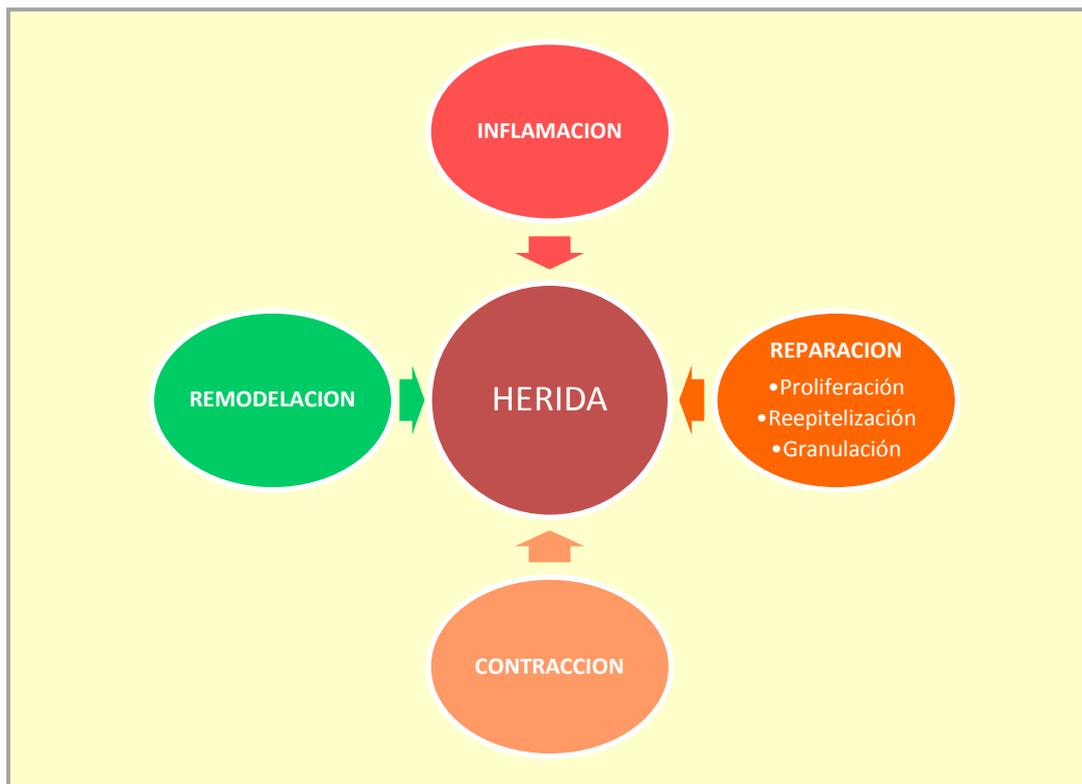


Imagen 03. Proceso general de cicatrización. Aunque es claro que la inflamación es la primera etapa que responde hacia una herida, no tardan en presentarse prácticamente de manera simultánea las fases de reparación, contracción y remodelación para concluir la cicatrización de una lesión.

2.3.1. Inflamación

Esta fase inicia inmediatamente después de la lesión tisular, puede ser dividida en dos eventos, uno vascular y otro avascular o también llamado celular. El vascular incluye el mecanismo de hemostasis y el celular implica la llegada y participación de leucocitos (glóbulos blancos) al área lesionada, sin embargo prácticamente los dos mecanismos dependen entre sí pues la proliferación de los glóbulos blancos requiere de los vasos sanguíneos y a su vez, los vasos sanguíneos requieren de la selectividad que generan los glóbulos blancos dentro de la zona afectada para poder entrar a un ambiente estable de la herida¹⁶. Para el mecanismo de hemostasis los mediadores más importantes son la fibrina, las plaquetas y los vasos sanguíneos, con un correcto funcionamiento de estos mediadores se producirá la formación de un coágulo y se activará la cascada de coagulación, además de la vasoconstricción local que ayuda a la acumulación de plaquetas y que puede perdurar de 10 a 15 minutos después de la lesión¹⁷. En la siguiente imagen se muestran las etapas generales para la formación de un coágulo, recordando que es una parte fundamental del proceso de cicatrización.

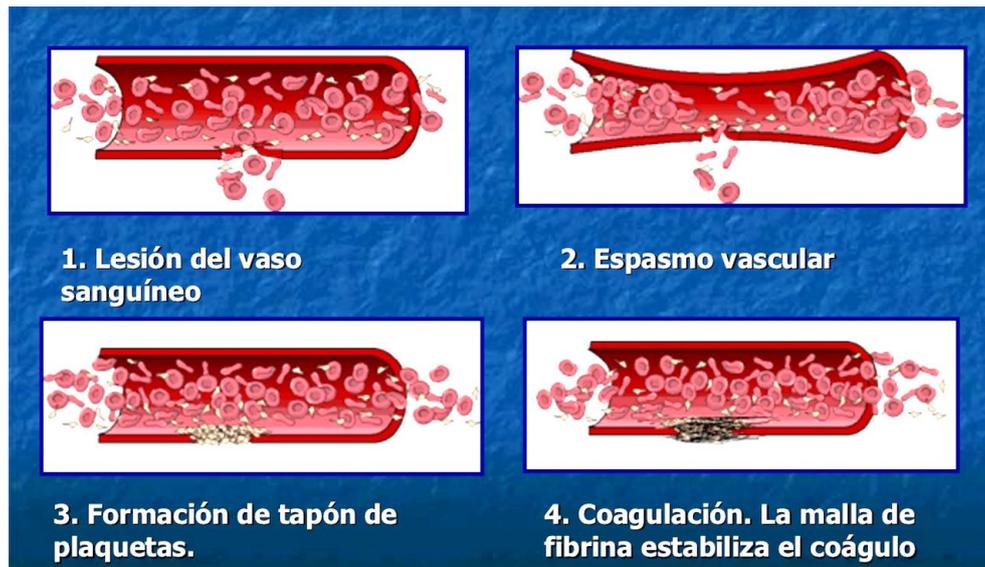


Imagen 04. Formación de coágulo¹⁸.

Una herida en la piel causará pérdida de sangre de los vasos sanguíneos dañados, cuando la lesión alcanza la dermis, las células de tejido muerto liberan sus enzimas autolíticas¹⁹ (lo que produce la lisis de las demás células cercanas a la zona de la herida⁴), la destrucción de estos vasos capilares conlleva a la formación de un coágulo²⁰ que es originado a partir de la acumulación de plaquetas en el sitio lesionado, donde éstas a su vez liberan gran cantidad de mediadores que inician la cascada de coagulación. El coágulo está formado por plaquetas incrustadas en una malla de enlaces entrecruzados de fibrina junto con pequeñas cantidades de fibronectina y vitronectina plasmáticas (glicoproteínas adhesivas^{21,22}). Esta malla rica en fibrina es obtenida a partir de la actividad enzimática de la trombina sobre el fibrinógeno, dividiéndolo para producir hilos de fibrina necesarios para estabilizar el coágulo conformado por esta malla. Es entonces donde el coágulo sirve como una barrera temporal para proteger el tejido desnudo y delicado, y también sirve para proporcionar una matriz provisional a través de la cual las células pueden migrar durante el proceso de cicatrización².

El fibroblasto, una célula indiferenciada del tejido conectivo que se puede observar junto con otras células sanguíneas en la imagen 05, es de gran importancia en el proceso de cicatrización y da lugar a diversas células precursoras que forman los tejidos fibrosos, de soporte y de unión, además se encarga de la síntesis de la matriz extracelular y produce proteoglicanos, glicosaminoglicanos, y principalmente colágeno fibrilar²³, lo que ayuda a la interacción de la matriz extracelular con la membrana celular. Los fibroblastos dérmicos, que normalmente se encuentran en una matriz rica en colágeno, deben disminuir sus receptores de colágeno y aumentar los niveles de integrina que se unen a fibrina, vitronectina y principalmente fibronectina, pues con el fin de introducirse al coágulo, los fibroblastos utilizan un conducto de fibronectina para guiar su migración a esta matriz temporal¹⁹. Es importante destacar que el coágulo también sirve como un reservorio de citocinas y factores de crecimiento que son liberados por la degranulación plaquetaria, lo que ayuda a la comunicación y proliferación celular, pues desde el punto en que se comienza a formar el coágulo, se comienza a generar una temprana señal para convocar a esta proliferación. Esta mezcla temprana de factores de crecimiento imparte señales quimiotáxicas para reclutar

células inflamatorias en circulación al sitio de la herida, y también estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes, es decir que estimula la respuesta angiogénica²⁴. Así es como se inicia en el proceso de cierre de la herida junto con la producción de tejido de reepitelización, y la contracción del tejido conectivo².

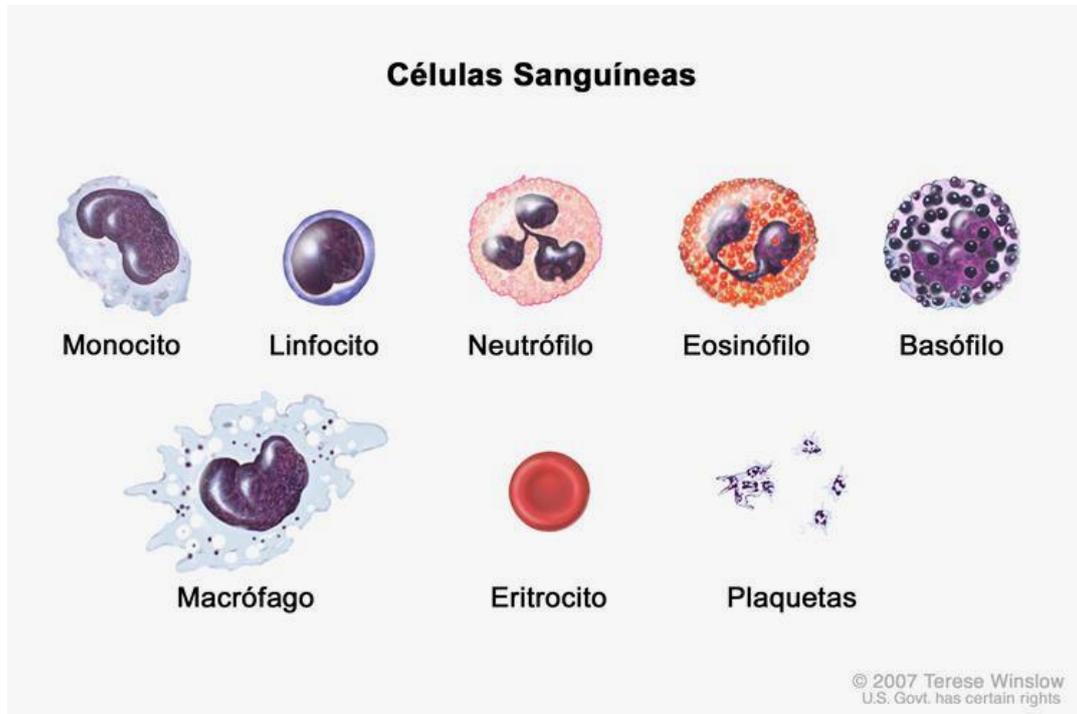


Imagen 05. Células sanguíneas. La sangre contiene muchos tipos de células: glóbulos blancos (monocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), macrófagos, glóbulos rojos (eritrocitos) y plaquetas²⁵. Estas células juegan papeles fundamentales y específicos en la reparación de una herida.

Los neutrófilos se agregan al sitio de la herida para destruir microorganismos invasores por medio de fagocitosis o enzimas hidrolíticas²⁶, después los monocitos llegan reemplazando de alguna manera a los neutrófilos y ya en el sitio de la herida se convierten en macrófagos para continuar con la fagocitosis de partículas extrañas y células muertas^{26, 27}. Los macrófagos además contribuyen para finalizar la inflamación, pues regulan la llegada de más monocitos y fibroblastos al sitio de la herida. Tanto los neutrófilos como los macrófagos liberan una variedad de factores de crecimiento y citocinas importantes para la migración y proliferación celular y ayudan a la formación de la matriz extracelular, lo que amplifica la señal temprana de la lesión que ya ha sido liberada por la degranulación plaquetaria^{16,19}. Es por esto que los monocitos son considerados como las células claves de la transición entre la fase inflamatoria y la fase de proliferación¹⁷ pues si cesa la acumulación de macrófagos al sitio de la herida, el proceso es gravemente afectado¹⁹.

2.3.2. Proliferación

Como una respuesta temprana a la lesión, los fibroblastos locales dérmicos comienzan a proliferarse en los bordes de la zona lesionada, posteriormente los fibroblastos comienzan a migrar hacia la matriz provisional colocada por debajo del coágulo, y es donde los fibroblastos establecen su propia matriz rica en colágeno¹⁹, la cual tiene el objetivo de reemplazar la dermis dañada²⁸. Tal parece que el tiempo

que tarda la fase preemigratoria se debe en gran medida al tiempo requerido para que los fibroblastos adquieran movilidad, porque si la herida se volviera a lesionar y al producirse una nueva matriz provisional, esta fase preemigratoria ya no se presenta por segunda vez y las células proliferan en la herida rápidamente¹⁹. Este proceso de proliferación se presenta dentro de la imagen 06, donde se muestra de manera general un desarrollo normal de una herida hasta la fase de reepitelización.

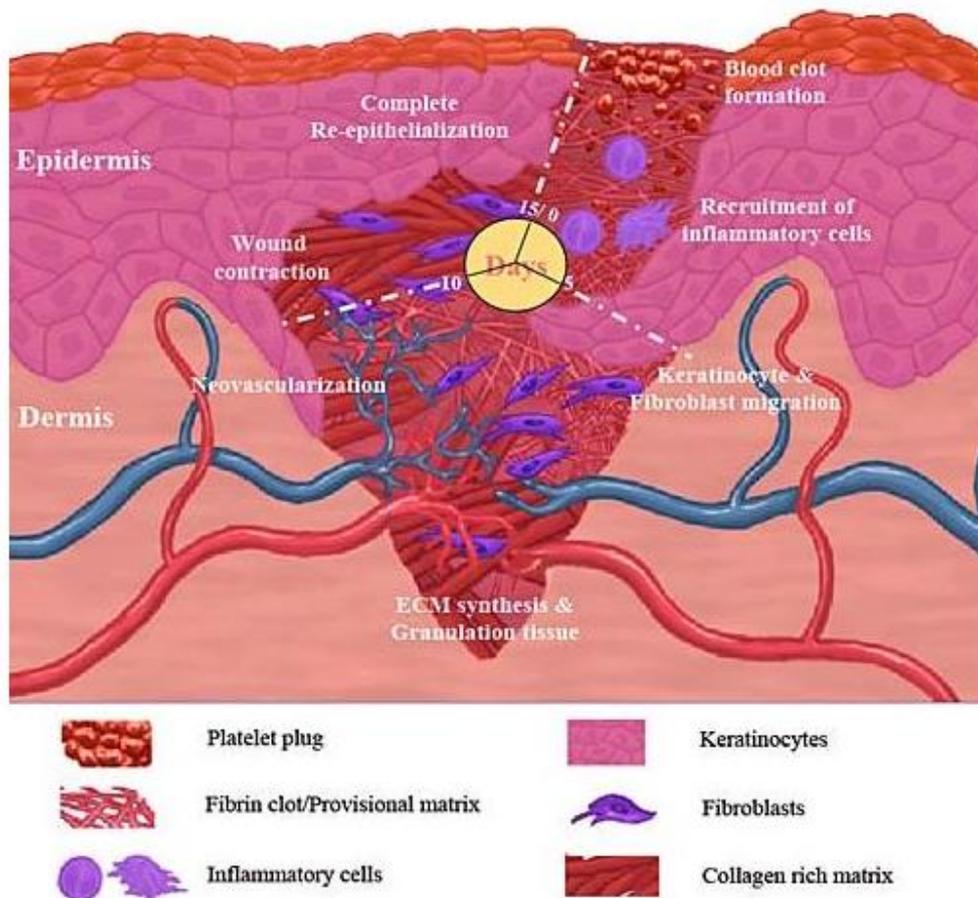


Imagen 06. Proliferación. Después de alrededor de 5 días de haberse producido la herida y de que se ha conformado el coágulo y una matriz provisional, comienza una proliferación celular en los bordes de la herida para posteriormente migrar hacia esa matriz, reemplazarla por otra rica en colágeno, contraer y reepitelizar la pérdida tisular²⁹.

Algunas horas después del inicio de la migración, las células epidérmicas del borde de la herida, se someten a una proliferación exponencial que es estrictamente necesaria para la siguiente fase que es la de reepitelización, y ofrece gran cantidad de células adicionales para reemplazar aquellas pérdidas durante la lesión¹⁹. Histológicamente se observa degradación de la membrana basal, proliferación celular, formación de estructuras vasculares, y reconstrucción de la membrana basal, es decir, el reemplazamiento de tejido dañado por tejido nuevo¹⁷.

Aproximadamente cinco días después de la lesión, la matriz extracelular provisional comenzará a ser reemplazada por tejido de granulación. Este cambio morfológico se le atribuye a la invasión de capilares que sirven de base a la aparición del tejido de granulación y a la llegada de células que permanecerán en la dermis reparada.

Los eventos principales siguientes son la reepitelización, la angiogénesis y la fibroplasia o cicatrización¹⁷.

2.3.3. Formación de tejido de granulación

La formación de tejido de granulación puede considerarse como un proceso de organización que incluye el crecimiento de miofibroblastos y células endoteliales vasculares hacia dentro de la herida. El resultado de esta organización es el remplazo del tejido necrótico, la fibrina y el coágulo de sangre por tejido de granulación vivo⁴.

Durante la fibroplasia (formación de tejido fibroso) hay migración, proliferación y producción de colágeno nuevo y otras proteínas de matriz por acción de los fibroblastos. Los fibroblastos que proliferaron a partir del borde de la herida tienen un papel trascendental pues producen colágenas, proteoglicanos (que actúan como moduladores de señales entre la célula y su entorno), glicosaminoglicanos (GAG, que son el medio de unión entre proteoglicanos) y factores de crecimiento. Después de haber sintetizado estas moléculas, los fibroblastos cambian fenotípicamente a miofibroblastos, cambio que es de vital importancia para la reparación de la herida pues gracias a ello, tienen la nueva capacidad de una alta contractibilidad que a diferencia del fenotipo previo fibroblasto, ayuda posteriormente a la contracción de la herida³⁰. Por otra parte, la fibronectina plasmática (glicoproteína adhesiva²¹) brinda un andamio para las fibras de colágenas sintetizadas por los fibroblastos y además ayuda a regular la contracción de la herida generada por miofibroblastos¹⁷.

Ya que existen dos posibles sitios de migración: los bordes libres de la herida y los remanentes de células madre del folículo piloso en el área afectada¹⁷, y si una herida deja intactos los folículos pilosos, a continuación una gran contribución a la reparación de la epidermis se deriva de estos folículos, pues los folículos pilosos intactos actúan como un borde natural de la herida¹⁹. Por lo tanto si una herida en piel madura es más profunda que el nivel de los folículos pilosos en la dermis a manera de que no permanezcan restos de ellos, naturalmente la reparación epitelial no los regenera, ni a los folículos pilosos ni a las glándulas. Esto no se debe a que la dermis sea incapaz de responder a las señales inductoras de pelo, sino que ya no recibe tales señales de la dermis subyacente herida²⁸, es decir que de alguna manera las lesiones en tejidos llegan a afectar la comunicación celular.

2.3.4. Reepitelización

La reepitelización involucra proliferación y migración de queratinocitos (célula principal de la epidermis) desde los bordes de la herida, restauración de la membrana basal conectada con la dermis subyacente y la formación de nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis. A su vez, los nuevos vasos sanguíneos participan en la formación del tejido de granulación pues proveen nutrición y oxígeno al tejido en crecimiento. Durante la angiogénesis las células endoteliales también producen citocinas que ayudan contribuyendo con la comunicación celular y mediando su proliferación. A medida que los vasos sanguíneos crecen hacia el coágulo, se multiplican los miofibroblastos en el borde la herida que acompañan la invasión vascular, convirtiendo así el coágulo en tejido de granulación vascular^{16, 17}.

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos comienzan a migrar a lo largo de la matriz provisional de manera similar a los fibroblastos, y comienzan a formar capilares nuevos de los vasos sanguíneos, proceso que se muestra en la imagen 07. Ya establecido un tejido de granulación vascular son necesarios ciertos elementos para la migración de los queratinocitos y consumir así la reepitelización, estos elementos son la matriz extracelular temporal, los receptores de integrinas, los factores de crecimiento y las metaloproteínas de matriz (MMP)¹⁷.

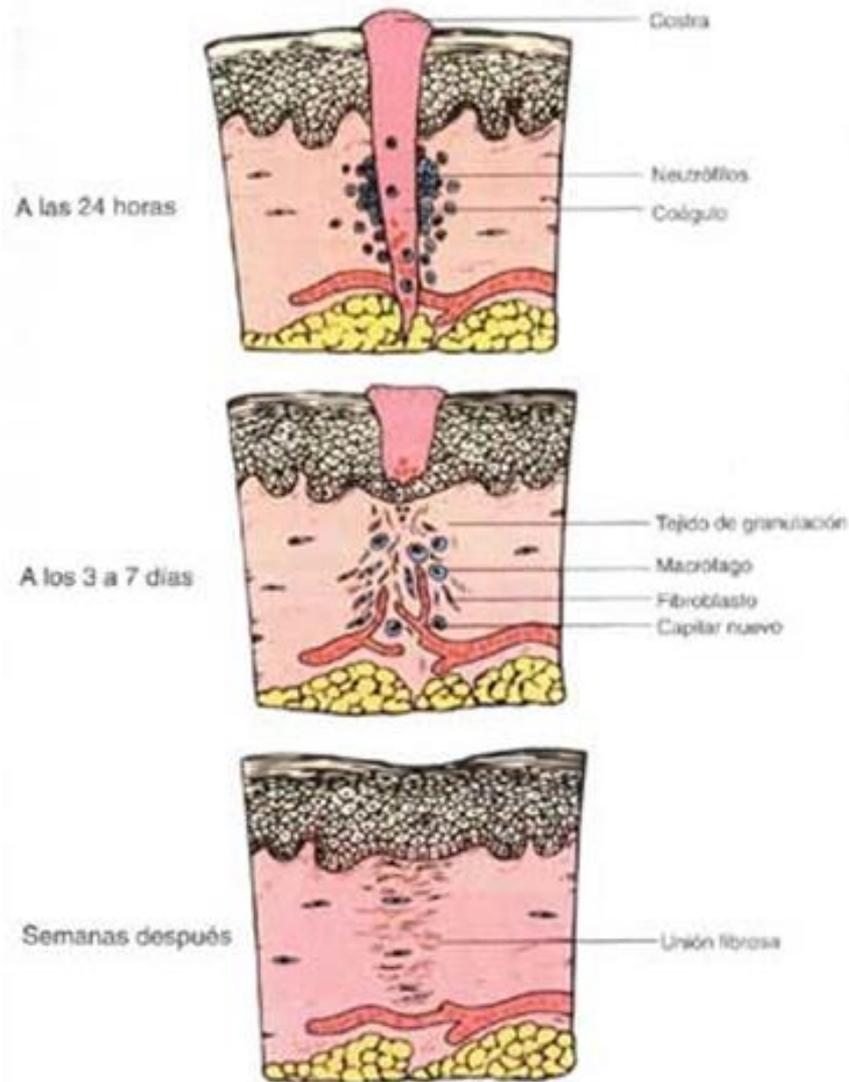


Imagen 07. De manera gráfica se muestra la angiogénesis y la formación de tejido de granulación para convertirse en tejido fibroso, entendiendo que para la reepitelización son fundamentales células sanguíneas, endoteliales, vasos sanguíneos y obviamente la formación previa del coágulo³¹.

Los factores de crecimiento juegan un papel crítico en el proceso de reparación, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es quimiotáctico para monocitos, macrófagos y neutrófilos, además *in vitro* funciona como mitogénico para fibroblastos y células de músculo liso, es decir que estimula la división celular en el ciclo de vida de unacélula¹⁷.

Es así como se llega al punto en que los queratinocitos utilizan las integrinas de superficie para interactuar con la matriz provisional y direccionar la migración, pues estas integrinas que normalmente anclan las células a la membrana basal, ahora funcionan como pseudópodos para migrar y posteriormente sujetarse de la matriz extracelular. Las metaloproteínas de matriz producidas por los queratinocitos juegan un papel importante en la disociación de la matriz provisional, pues en la membrana basal degradan el colágeno y la laminina, que es una glicoproteína que se asocia a éste, permitiendo así la migración hacia la herida, y también rompen las uniones de colágeno fibrilar facilitando la migración continua³².

2.3.4.1 Consumación de la reepitelización

Cuando la migración finaliza, los queratinocitos que cubrieron la superficie de la herida restablecen el substrato fundamental, reconstituyendo la membrana basal subyacente y reasumiendo el proceso de diferenciación terminal para generar una epidermis estratificada que se restablece de los bordes de la herida hacia adentro, por lo que hacia el centro de la lesión se puede encontrar una sola capa de queratinocitos mientras que en los bordes de la herida hay múltiples capas de estos. Es así que el proceso consumado de la fase de reepitelización contribuye también a facilitar la contracción del tejido conectivo subyacente, a manera de que se encoge la herida llevando los bordes unos hacia otros^{19, 17}.

En el proceso de diferenciación se restablece la unión dermoepidérmica, es decir, se restablece la dermis, membrana basal y estrato basal, que se presenta gráficamente en la imagen 08. Para la regeneración de la unión dermoepidérmica se producen tipos específicos de laminina y colágenas, razón por la cual están en mayor cantidad en los márgenes de la herida, entendiendo así que los grupos de colágenas y la laminina son los constituyentes principales para el restablecimiento de la membrana basal entre dermis y epidermis, siendo esta última esencial para la integridad y función de la piel. Esta membrana basal se restablece como estructura de anclaje de los queratinocitos a la dermis gracias a las uniones intercelulares y las fibras de anclaje como lo son las integrinas. La reconstitución de la dermis inicia con la formación de tejido de granulación que incluye nuevos vasos sanguíneos, fibroblastos y una matriz extracelular permanente¹⁷.



Imagen 08. Dermis, membrana basal y estrato basal, son capas de la piel que al consumarse la reepitelización son restauradas³³.

2.3.5. Contracción de la herida

Para la formación de cicatrices así como para la contracción del tamaño de una herida, la fase de proliferación celular junto con la recuperación de la población de fibroblastos, son elementos trascendentales para la contracción de la herida, logrando que en condiciones óptimas el tejido de reparación tenga las mismas características que el tejido antes de haber sido dañado. La razón por la que la recuperación de la población de fibroblastos es trascendental es porque principalmente los fibroblastos junto con otros componentes de la matriz extracelular producen fibras de colágenas, prosiguiendo con la remodelación de estas proteínas por los mismos fibroblastos y formar finalmente tejido cicatrizado maduro¹⁶. Ya que se ha reemplazado la dermis dañada, los queratinocitos migran a través de este nuevo tejido para efectuar el cierre, el cual se realiza mediante la combinación de esta migración, y la contracción de los miofibroblastos (fenotipo de fibroblastos con miofibrillas, las cuales brindan propiedades de contracción) alrededor de la herida que ejercen una fuerza centrípeta moviendo los bordes hacia el centro de la herida más cerca unos de otros y liberando colágenas y proteoglicanos, asegurando así un nuevo tejido en el lugar afectado^{28, 20}. Aunque los miofibroblastos se semejan a los fibroblastos, tienen características especiales que los diferencian de los fibroblastos usuales del tejido conjuntivo. En particular, estas células tienen componentes fibrilares en su citoplasma que asemejan a los de la célula del músculo liso, contienen actina que brinda propiedades de contracción, además desarrollan una membrana basal que aportan una estructura de base para tejidos epidérmicos y también generan desmosomas que funcionan como estructuras de anclaje intercelular que contribuyen a la adhesión entre células vecinas. Todo esto en conjunto, suman características que nunca se observan en los fibroblastos usuales y que al fenotipo miofibroblasto lo hace especial para la contracción de la herida⁴. En la siguiente imagen se presenta el proceso de cicatrización de una herida señalando elementos importantes dentro de la recuperación:



Imagen 09. La reparación del tejido dañado tiene elementos importantes por los cuales después de unos días, recupera las capas fundamentales para el funcionamiento de la piel, lo que deja una costra formada por el coágulo inicial³³.

Por otra parte, la elastina que es un componente normal de la piel, no se sintetiza durante la cicatrización, la ausencia de este constituyente dérmico puede ser responsable de la pérdida de firmeza y flexibilidad observada en el tejido cicatrizado¹⁷, pues en ocasiones a pesar de haberse recuperado una herida en la piel, el tejido formado es poco resistente al estiramiento.

El grado de contracción depende también de la profundidad de la herida, además los miofibroblastos deben de predominar en la zona afectada para disponerse linealmente y contraer la herida. Esta contracción, semejante a la muscular, es mediada por diversas moléculas, angiotensina (efecto vasoconstrictor), vasopresina (efecto vasoconstrictor y antidiurético), bradiquinina (vasodilatador), epinefrina y norepinefrina (con efectos vasoconstrictores). Se requiere de la interacción célula-célula y célula-matriz, además de que los miofibroblastos extiendan pseudópodos para que se ligen a la fibronectina extracelular unida al colágeno fibrilar, y así arrastrar las fibras de colágeno a la célula, lo que producen una contracción gradual de la herida¹⁷. El desarrollo constante de uniones cruzadas entre fibras de colágenas origina el incremento constante de la fuerza tensil de una herida. El estado equilibrado de síntesis y degradación de colágenas lleva a cabo una remodelación de la cicatriz, de tal forma que alcanza un estado óptimo el tejido recuperado⁴.

2.3.6. Remodelación

La fase de remodelación consiste en el depósito de matriz permanente y los subsecuentes cambios con el tiempo. Ocurre durante todo el proceso de reparación, pues como se ha visto, una vez formado el coágulo de fibrina, se reemplaza por tejido de granulación rico en colágenas, componente fundamental para la remodelación de la piel. Una característica de la remodelación tisular es el cambio de la composición de la matriz extracelular, el colágeno tipo III se secreta tempranamente dentro de la reparación y alrededor de los seis días alcanza su máxima concentración, esta proteína abunda en las paredes de los vasos sanguíneos y en la dermis, y tiene como función principal el sostén de los órganos expandibles^{17,34} y la remodelación de cicatrices. Gradualmente la dermis retorna al fenotipo con predominio existente previo a la lesión, es decir el colágeno tipo I, el cual le proporciona mayor rigidez y resistencia al estiramiento, además de que en los huesos brinda resistencia contra carga y tensión. Esto se da a partir de que la herida se cierra, pues inicia la degradación del colágeno tipo III y la síntesis de colágeno tipo I¹⁷.

Otro de los cambios observados ocurre con la vascularización. Una cicatriz reciente se caracteriza por una relativa alta densidad de capilares sanguíneos, sin embargo una cicatriz antigua es menos vascular, lo que quiere decir que ha sufrido una apoptosis de células endoteliales y que tiene entonces un color menos rojizo. A medida que prosigue la maduración, algunos vasos sanguíneos se atrofian y desaparecen, lo que provoca una cicatrización vascular pálida, que a su vez conlleva a una desvascularización que con frecuencia coincide con la cicatrización de tejido, lo cual es acompañado por una ligera deformación de tejido local. También se ha identificado la participación de diversos mediadores antiangiogénicos como lo es la trombospondina^{17, 34}.

La ausencia de apéndices es otra característica asociada a las cicatrices maduras, el tejido cicatrizado carece de glándulas sudoríparas, sebáceas y folículos pilosos, pues las células madre responsables de los apéndices no proliferan en heridas profundas para repoblar las cicatrices con folículos pilosos y glándulas.

2.4. Características de un ungüento

Según la FEUM 11^a edición, un ungüento se caracteriza por ser una preparación de consistencia blanda, con los aditivos incorporados a una base con un máximo de 20 % de agua que le da consistencia para que se adhiera y se aplique sobre piel o mucosas³⁵. Estas características son adecuadas para ocupar esta forma farmacéutica para el tratamiento de heridas, pues en zonas de un cuerpo donde se tengan la herida expuesta, se puede administrar tópicamente un ungüento para que el agente terapéutico actúe en la zona.

2.5. Pruebas para verificar la cicatrización

2.5.1. Cuantificación de nitritos

El óxido nítrico (NO) es un compuesto que es secretado no sólo por células endoteliales sino también por macrófagos y neuronas. Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular, NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), por acción de la enzima sintetasa del óxido nítrico³⁶.

El NO reduce la agregación plaquetaria y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar grupos sulfhidrilo de las proteínas con el consiguiente agotamiento del glutatión citosólico, y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno que es un fuerte oxidante y un radical hidroxilo que es intensamente reactivo. La producción de NO por parte de macrófagos activados de choque séptico puede producir vasodilatación periférica, a su vez, el NO también ha sido implicado en diversas enfermedades y en procesos de estrés^{36,37}.

Es entonces donde en una herida producida en ratones se puede determinar la concentración de nitritos como un marcador de oxidación generada a partir del estrés producido en las células de la herida por medio de su cuantificación en suero interpolando con una curva patrón. Esta técnica junto con otras que miden compuestos obtenidos a partir de la peroxidación de lípidos, son utilizadas frecuentemente para estos fines, ya que a pesar de que existen otros métodos de medición ya sean directos o indirectos, suelen ser muy especializados los equipos necesarios o ser complejas las técnicas empleadas^{38, 39}.

2.5.2. Cuantificación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial

La ceruloplasmina es una proteína con concentración abundante en plasma, fundamentalmente se sintetiza en los hepatocitos, pero también se encuentra en otros tipos celulares como monocitos, astrocitos y células de Sertoli. Es la principal proteína transportadora de cobre en circulación y gracias a esta relación tan estrecha que tiene con el cobre dentro del organismo, su concentración sérica es utilizada en el diagnóstico diferencial para enfermedad de Wilson, la cual genera acumulación de cobre en los tejidos y órganos⁴⁰.

Además se ha encontrado que los niveles de ceruloplasmina sérica aumentan en estados de estrés con daño celular por lo que los niveles de ceruloplasmina en suero se pueden determinar cuando existen daños por factores químicos, biológicos, fisiológicos y físicos⁴⁰ como lo puede ser una herida expuesta. Es por tal motivo que en el presente estudio se determinará la concentración de ceruloplasmina plasmática, pues el nivel de ceruloplasmina disminuirá en organismos con heridas tratadas con un agente que posea un efecto benéfico para la cicatrización de una herida, relacionándose hacia un efecto antiinflamatorio.

2.5.3. Cuantificación de peroxidación lipídica (MDA) por el método de TBA (ácido tiobarbitúrico)

La peroxidación lipídica es un proceso en cadena mediado por radicales libres, éstos causan la degradación de lípidos por lo que su acción es a nivel de la membrana celular pues recordemos que es una membrana bilipídica. Este proceso de peroxidación es causado por diversas alteraciones patológicas como lo puede ser toxicidad hepática, trastornos vasculares, estrés, envejecimiento e inflamación⁴¹.

Ya que la peroxidación lipídica representa un mecanismo importante que siempre está presente dentro de la inflamación causada por una herida, y que el análisis de los productos de la peroxidación en los líquidos corporales ha llegado a ser uno de los criterios más utilizados para su valoración⁴², la aplicación de esta técnica dentro de este estudio tiene como objetivo conocer el nivel de acción de los radicales libres generados a partir de la inflamación de una herida en un organismo.

III. Planteamiento del problema

Las heridas son una de las más comunes afectaciones a la salud, en ocasiones gracias a su profundidad o a alguna patología, la recuperación es lenta y conlleva a que el paciente no pueda desempeñarse óptimamente dentro de sus funciones. Es para mejorar y acelerar la cicatrización en heridas que desde la antigüedad el hombre ha utilizado remedios naturales para la curación de éstas, tales remedios se han descubierto a través de ensayo y error sobre la herida misma ya producida. Uno de estos remedios naturales utilizados popularmente, es la planta *Malva parviflora* de la que se aprovechan sus infusiones acuosas para la cicatrización de heridas, sin embargo hasta este momento no se cuentan con estudios científicos que evalúen esta característica a un extracto acuoso de esta planta, pues es de interés que los profesionales dedicados al área de la salud analicen la actividad de estos remedios naturales.

Es por ello que el presente estudio tiene por objetivo conocer si el extracto acuoso de *Malva parviflora* tiene un efecto cicatrizante, pues lo anterior, nos hemos propuesto la siguiente pregunta de investigación:

¿Tiene en realidad un efecto cicatrizante el extracto acuoso de *Malva parviflora*?

IV. Hipótesis

Con base a la información empírica de su uso terapéutico, el extracto acuoso de *Malva parviflora* administrado en una base de ungüento, generará un efecto cicatrizante en escisiones dorsales de ratones machos CD1 tratados, comparado con un medicamento cicatrizante comercial.

V. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto cicatrizante del extracto acuoso de *Malva parviflora* en ratones.

4.2. Objetivos particulares

- Obtener el extracto acuoso de *Malva parviflora*.
- Realizar dos formulaciones de extracto de *Malva parviflora*, al 2 % y 4 %.
- Preparar el ungüento para el tratamiento.
- Realizar una herida en la zona dorsal de la piel en los ratones.
- Atender a los ratones para la evaluación del efecto cicatrizante.
- Aplicar las técnicas para verificar el efecto cicatrizante, por medio de cuantificación de nitritos, peroxidación lipídica y concentración de ceruloplasmina a los sueros de los organismos tratados.
- Generar y observar cortes histológicos de las cicatrizaciones.
- Realizar un análisis estadístico con los resultados.

VI. Diseño Experimental^{43,44}

- Diseño de Investigación: Longitudinal
- Tipo de Estudio:
 - Prospectivo (se registra la información según van ocurriendo los fenómenos posteriormente a la planeación de la investigación)
 - Comparativo (se comparan poblaciones)
 - Experimental (sólo se miden las variables, no se modifican)
- Población de estudio: Ratones machos CD1 procedentes del bioterio de la FES Zaragoza, capo II, con peso aproximado a 25 g y un mes de edad.
- Criterios de inclusión: Ratones jóvenes CD1, machos, de un mes de edad y dentro de un rango de peso de 23 a 27 g
- Criterios de exclusión: Ratones enfermos, edad
- Criterios de eliminación: Pérdida o muerte de algún ratón
- Variable independiente:
 - Concentración al 2% y 4% de extracto acuoso de *Malva parviflora*.
 - *Madecasso*®
 - Vaselina
- Variable dependiente:
 - Efecto cicatrizante (% cicatrizado)
 - Nitritos ($\mu\text{g/mL}$)
 - Ceruloplasmina (mg/dL)
 - Peroxidación lipídica ($\mu\text{mol/L}$)

VII. Material y métodos

7.1. Obtención de extracto acuoso de *Malva parviflora*

Se obtuvo *Malva parviflora* fresca colectada durante de la mañana en la congregación de Santiaguillo, en el municipio de Acámbaro, Guanajuato. Para la extracción acuosa se utilizaron las hojas frescas junto con sus pedúnculos, ya que ambos son los que se aprovechan popularmente en forma de cataplasmas o para infusiones, y se introdujeron en un matraz balón de 1 L para después llenar hasta tres cuartas partes del volumen con agua destilada y se acopló a un sistema de reflujo para mantenerlo en ebullición durante 2 horas. Se enfrió a temperatura ambiente para filtrar a través de tela de algodón toda la infusión obtenida a un matraz balón de 500 mL^{45,46}.

Posteriormente se acopló el matraz a un sistema de destilación al vacío y manteniendo una temperatura aproximadamente de 70°C, se eliminó toda el agua para obtener un extracto sólido. Se mantuvo en observación continua este sistema durante toda la destilación pues la misma ebullición del líquido era en ocasiones muy vigorosa^{45,46}.

Ya destilada toda el agua del extracto, se obtuvo un sólido café adherido a las paredes del matraz balón, con ayuda de una espátula de acero inoxidable se raspó el interior para desprender y recolectar el contenido en la mejor medida posible. Se guardó en refrigeración en un recipiente de vidrio limpio y cerrado hasta su utilización.

7.2. Preparación del ungüento para el tratamiento

Se pesaron 0.2 g de extracto seco de *Malva parviflora* para disolverlo en su mayoría en dos mililitros de agua con ayuda de un sonicador de lápiz Sonics, modelo Vibracell, para después incorporarlo a 8 g de vaselina mezclando hasta homogeneidad con una varilla de vidrio, haciendo uso también del calentamiento en un microondas Sharp, modelo Carousel, por ciclos de 10 segundos. Esta formulación tiene una concentración de 2% de extracto, se aplicó el mismo método para obtener una preparación al 4%, y posteriormente se evaluaron ambas⁴⁷.

7.3. Modelo experimental

Se utilizaron 24 ratones machos CD1, tomando como variable independiente la concentración y como dependiente, el efecto cicatrizante. Estos ratones se dividieron con números aleatorios en 4 grupos de 6 organismos, para ser tratados de la manera siguiente:

- Grupo 1: concentración al 2% de extracto de *Malva parviflora*
- Grupo 2: concentración al 4% de extracto de *Malva parviflora*
- Grupo 3: testigo positivo (administración de *Madecassol*®)
- Grupo 4: testigo negativo (administración de vaselina)

7.3.1. Método de evaluación del efecto cicatrizante

Por medio de un sacabocados circular de acero inoxidable de aproximadamente 1 cm de diámetro se realizó una escisión circular en la piel de todos los ratones en la

zona dorsal, se midieron los diámetros iniciales y posteriormente cada dos días para corroborar una cicatrización típica en cuanto a una reducción paulatina del tamaño de la herida. Se administró diariamente por vía tópica a cada grupo con su respectivo tratamiento cubriendo la herida y se colocaron en jaulas con separaciones individuales para evitar el daño entre ratones, además se proporcionó comida y agua adecuadamente.

Se monitoreó a los ratones durante 10 días, cuidando de su alimentación, aseo y tratamiento. Se midieron los diámetros finales de las heridas y estadísticamente, por medio de un estudio de ANDEVA, se analizaron los resultados del porcentaje de cicatrización correspondiente a la diferencia de los diámetros finales con respecto a los iniciales de la herida.

Al término del tratamiento, los ratones se anestesiaron en una cámara de éter y por medio de incisión axilar se sangraron para obtener el suero de cada ratón, concluyendo así con la dislocación cerebral para sacrificar a los grupos tratados.

Se utilizaron los sueros para las técnicas de:

- Cuantificación de nitritos.
- Cuantificación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial.
- Cuantificación de peroxidación lipídica.

7.4. Pruebas para verificar la cicatrización

7.4.1. Cuantificación de nitritos⁴⁷

La concentración de nitritos es útil para conocer el impacto oxidativo en las células.

Este análisis reduce el NO_3 a NO_2 mediante cadmio metálico.

Plateado decadmio³⁷:

1. En tubos de ensayo de 13X100 se introdujeron 0.5 g de cadmio metálico para agregar después 2 mL de sulfato de cobre al 5%, y se colocaron por 10 minutos en una plataforma de agitación rocker.
2. Se lavó el cadmio 3 veces con agua destilada llenando tres cuartas partes del tubo para después desechar el líquido eliminando el cobre.
3. En seguida se lavó con solución de HCl 0.1N para remover el hidróxido de cadmio, llenando con este ácido aproximadamente tres cuartas partes del tubo, y desechando de nuevo la fase líquida.
4. Se realizó un último lavado al cadmio con cloruro de amonio (solución acuosa) al 5% con pH 9, que fue ajustado con borato de sodio.

NOTA: El cadmio se guardó en los tubos con solución de NH_4Cl hasta el ensayo, y es posible reutilizarlo aplicando los lavados como se indican desde el paso 1 del procedimiento anterior.

Preparación de la muestra⁴⁷:

1. A 100 μL de suero se le adicionaron 300 μL de agua destilada, 20 μL de solución acuosa de ZnSO_4 al 30%, y se agitó vigorosamente con lo que se

formó un precipitado de proteínas y a su vez un sobrenadante de nitritos, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos.

2. El sobrenadante de los tubos centrifugados se adicionó a los tubos con el cadmio activado (provenientes del paso 4 del procedimiento anterior), del cual previamente se desechó el NH_4Cl .
3. Se taparon los tubos con papel parafilm, y se colocaron en una plataforma de agitación horizontal por 15 minutos.
4. Los tubos se centrifugaron a 3 500 rpm por 5 minutos y se tomaron 200 μL del sobrenadante para el ensayo.
5. Se realizó la curva estándar con el patrón (NaNO_2) como se muestra en el cuadro 1.
6. Para obtener la concentración de nitritos en los sueros se interpolaron los resultados dentro de la curva estándar de nitrito de sodio.

Cuadro 1. Curva patrón, estándar de Nitrito de Sodio.

Tubo	Estándar (NaNO_2 μg)	Agua destilada (μL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Suero problema	200 Sobrenadante	700

Con los siguientes pasos se genera la formación de color.

- Se adicionó 50 μL de sulfanilamida (0.5 g disueltos en 150 mL de ácido acético al 15 %) para dejar reposar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionaron 50 μL del reactivo de NED*, posteriormente se agitó y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se tomaron las lecturas a 540nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific, modelo Spectronic 20+.

*Reactivo de NED: 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiaminadichlorhidrato disueltos en 150 mL de ácido acético al 15 %.

7.4.2. Cuantificación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial⁴⁷

La concentración de ceruloplasmina sérica disminuye en organismos con heridas tratadas con un agente que posee un efecto antiinflamatorio.

Preparación de placas Falcon:

1. Se preparó agarosa al 1%, pesando 0.3 g de agarosa para mezclarlos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de PBS (phosphate buffer saline).
2. El matraz se introdujo en un horno de microondas, y se le aplicaron ciclos de 10 segundos hasta disolver completamente el agar.
3. Se colocaron 6 tubos de ensayo vacíos de 13X100 en un baño María a 45°C.
4. Y se adicionaron 2 mL de agarosa al 1% en cada tubo.
5. Se vertió en cada tubo 150 μL de suero de conejo anti-ceruloplasmina de ratón, y se agitaron con un Vórtex por aproximadamente 10 segundos.
6. Cada uno de los tubos se vació en los 6 pozos de 35 mm de la placa Falcon.

7. Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente.
8. Después se realizaron en cuatro polos, perforaciones circulares de 3 mm de diámetro en cada uno de los 6 pozos de la placa Falcon.
9. Finalmente se colocaron 5 μL de muestra en las perforaciones circulares de los pozos, y se dejaron en refrigeración por 48 horas, para después medir directamente los halos de precipitación.

7.4.3. Cuantificación de peroxidación lipídica (MDA) por el método de TBA (ácido tiobarbitúrico)⁴⁵

Esta técnica tiene como objetivo determinar la peroxidación lipídica para conocer la acción de los radicales libres generados a partir de la inflamación.

Preparación de la muestra:

1. Se colocaron aprox. 300 μL de sangre heparinizada en un tubo Eppendorf, para centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos y después se separó el plasma.
2. Posteriormente se transfirieron 100 μL de plasma a tubos Eppendorf y se agregaron 10 μL de BHT (butiril-hidroxitolueno) 2 mM.
3. Se tomaron 100 μL de ese plasma y se diluyeron en otro tubo Eppendorf con 400 μL de PBS (phosphate buffer saline) y se agitó manualmente.
4. En un tubo de ensayo vacío de 13X100 se colocaron 400 μL del plasma diluido, más 50 μL de BHT 12.6 mM y 400 μL de ácido ortofosfórico 0.2 M.
5. En seguida se mezcló en vórtex por 10 segundos, y después se adicionaron 50 μL de TBA 0.11 M para mezclar de nuevo con vórtex.

Producción de color:

1. La coloración comenzó con el calentamiento de la muestra en un baño de agua a 90 °C por 15 minutos, tapando con papel aluminio los tubos y agitando ligeramente.
2. Se enfrió en hielo, y se agregaron 1000 μL de n-butanol y 100 μL de NaCl solución saturada para agitar vigorosamente por 30 segundos.
3. Después de centrifugar a 500 rpm por 1 minuto, se transfirió la fase butanólica a una celda utilizando una pipeta Pasteur.
4. Se realizaron las lecturas a 535 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific, modelo Spectronic 20+, y finalmente se realizó la curva estándar de malondialdehído (MDA) a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), pues este último es uno de los precursores más utilizados⁴⁹, para obtener concentraciones de MDA directamente representativas a la peroxidación lipídica.

Cuadro 2. Curva patrón, estándar de MDA para peroxidación lipídica.

Tubo	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TMP (μL)	H ₃ PO ₄ (μL)	TBA (μL)	Agua (μL)
Blanco	0	0	600	200	200
1	0.2	5	600	200	195
2	0.4	10	600	200	190
3	0.8	20	600	200	180
4	1.2	30	600	200	170
5	2.2	50	600	200	150
6	2.8	70	600	200	130
7	4.0	100	600	200	100

VIII. Resultados

Los datos de los estándares para cuantificación de las pruebas inmunológicas, cuantificación de nitritos, cuantificación de ceruloplasmina radial y cuantificación de peroxidación lipídica, se ubican en la sección de anexos al final de este documento.

A los resultados de las técnicas inmunológicas que se interpolaron dentro de las concentraciones estándar, y a los datos del porciento cicatrizado, con ayuda del programa SPSS Statistics Processor, se les aplicó un análisis de varianza con pruebas Post-hoc de diferencia de medias y subconjuntos homogéneos HSD de Tukey, ambas con una significancia de 0.05. Se utilizó la prueba de Post-hoc para determinar qué medias de los grupos tratados difieren significativamente con respecto al grupo Blanco; y la prueba de HSD (Diferencia Honestamente Significativa) de Tukey, útil para los análisis de varianza de un factor, nos ayudó a separar en subconjuntos homogéneos los grupos tratados comparándolos entre sí según sus medias⁴⁹.

8.1. Estadísticas de los resultados

Cuadro 3. Medias de las técnicas aplicadas para verificar el efecto cicatrizante.

Prueba	Grupo	N	Media	Error Típico
NITRITOS ($\mu\text{g/mL}$)	Co 2%	6	98.3905	7.097
	Co 4%	6	93.6813	6.275
	Madecassol	6	101.2768	3.733
	Blanco	6	118.8988	13.232
CERULOPLASMINA (mg/dL)	Co 2%	6	31.5000	0.569
	Co 4%	6	32.8500	0.829
	Madecassol	6	31.0500	0.603
	Blanco	6	32.8500	1.083
PEROXIDACION LIPIDICA ($\mu\text{mol/L}$)	Co 2%	6	1.5743	0.099
	Co 4%	6	2.0575	0.112
	Madecassol	6	1.3035	0.080
	Blanco	6	1.7300	0.121

En el anexo se muestran de manera gráfica, en barras, las medias para cada técnica utilizada.

Pruebas Post-hoc

Cuadro 4. Resultados con comparaciones contra el blanco a través de pruebas posthoc para técnicas inmunológicas.

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
NITRITOS	Blanco	Co2%	20.5083(*)	0.001
		Co4%	25.2175(*)	0.001
		Madecassol	17.6220(*)	0.001
CERULOPLASMINA	Blanco	Co2%	1.3500	0.637
		Co4%	0.0000	1.000
		Madecassol	1.8000	0.404
PEROXIDACION LIPIDICA	Blanco	Co2%	0.1557	0.723
		Co4%	-0.3275	0.155
		Madecassol	0.4265(*)	0.043

* La diferencia entre las medias es significativa a $P > 0.05$.

Cuadro 5. Resultados de medias en subconjuntos homogéneos para las pruebas inmunológicas de Nitritos.

	Grupo	N	Subconjunto para $P > 0.05$	
			1	2
HSD de Tukey				
	Co4%	6	93.681	
	Co2%	6	98.390	
	Madecassol	6	101.276	
	Blanco	6		118.898
	Sig.		0.917	1.000

Cuadro 6. Resultados de medias en subconjuntos homogéneos para las pruebas inmunológicas de Peroxidación lipídica.

	Grupo	N	Subconjunto para $P > 0.05$		
			1	2	3
HSD de Tukey	Madecassol	6	1.304		
	Co2%	6	1.574	1.574	
	Blanco	6		1.730	1.730
	Co4%	6			2.058
		Sig.		0.291	0.723

Por otro parte, los datos para cicatrización fueron operados dando lugar al porcentaje cicatrizado, generado a partir de la comparación porcentual de la diferencia del diámetro inicial menos el final, con respecto al 100% que es el mismo diámetro inicial, es decir:

$$\% \text{ Cicatrizado} = (D_i - D_f) * \frac{100\%}{D_i}$$

Donde:

D_i = Diámetro inicial

D_f = Diámetro final

Cuadro 7. Medias porcentuales de cicatrización para la evaluación del efecto cicatrizante.

Grupo	N	Media	Error Típico
Co 2%	6	43.8637	3.31573
Co 4%	6	59.4997	3.40116
Madecassol	6	59.0362	2.08735
Blanco	6	45.0972	1.68958

En el anexo se muestran de manera gráfica las medias para cicatrización.

Pruebas Post-hoc

Cuadro 8. Resultados con comparaciones múltiples a través de pruebas posthoc para evaluación del efecto cicatrizante.

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Blanco	Co 2%	1.23	0.988
	Co 4%	-14.40(*)	0.007
	Madecassol	-13.94(*)	0.009

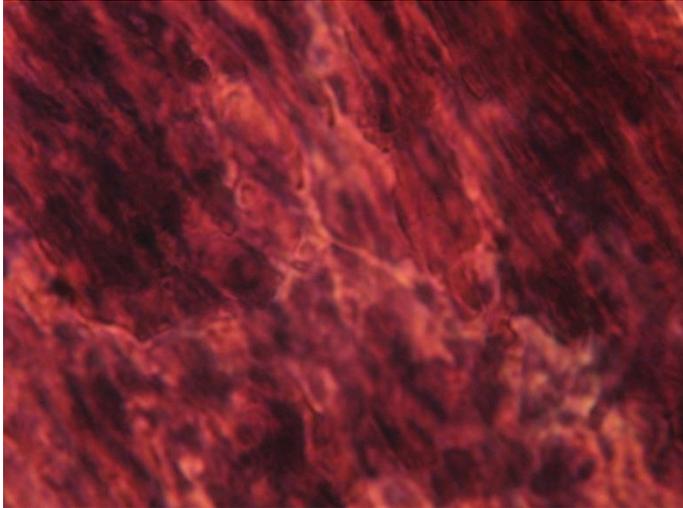
* La diferencia entre las medias es significativa a $P > 0.05$.

Cuadro 9. Resultados de medias en subconjuntos homogéneos para evaluación del efecto cicatrizante.

	Grupo	N	Subconjunto para $P > 0.05$	
			1	2
HSD de Tukey	Co 2%	6	43.863	
	Blanco	6	45.097	
	Madecassol	6		59.036
	Co 4%	6		59.499
	Sig.		0.988	0.998

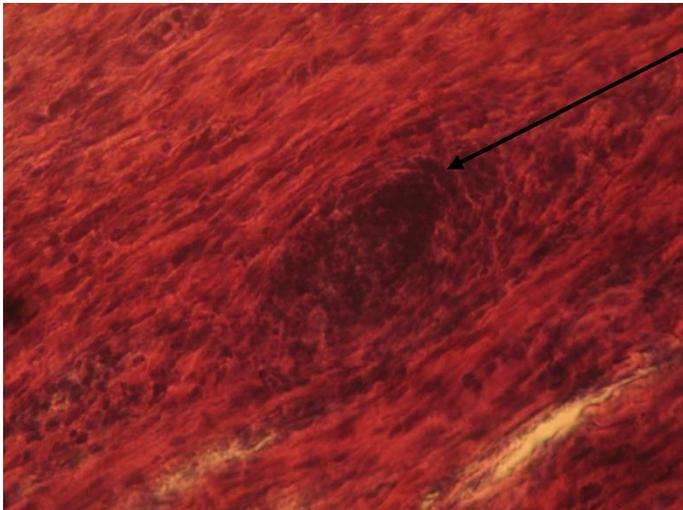
8.2. Cortes histológicos

Las siguientes imágenes fueron observadas por medio de un microscopio Zeiss, modelo Primo Star, y son representativas de los cortes histológicos, éstos no menos importantes que las pruebas inmunológicas, ayudan a la interpretación final de resultados.



Se observa tejido fibroso rico en colágenas en todo el campo a manera de estrías.

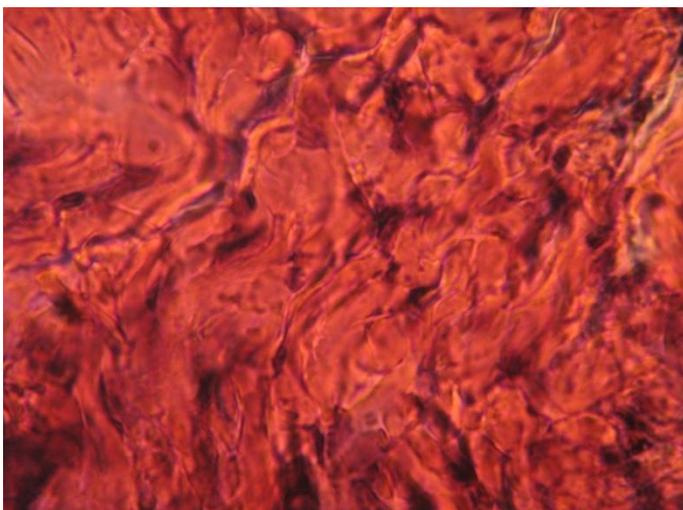
Imagen 10. [100x, 2% Malva]: Presencia de infiltrado característico de una reparación.



Folículo piloso.

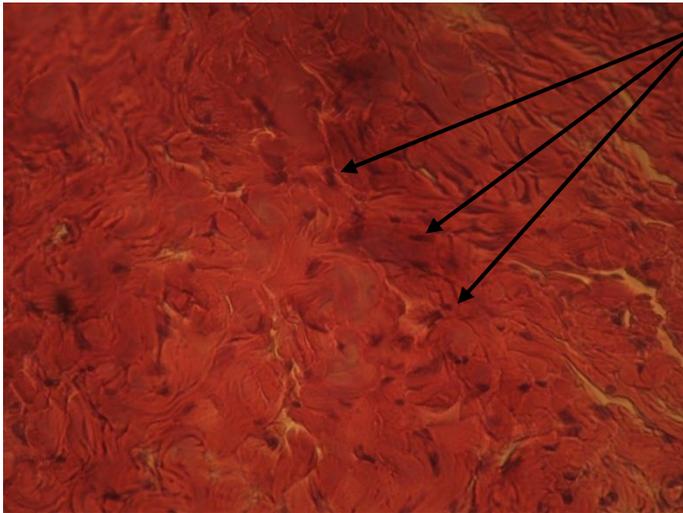
Se muestra en forma ovalada.

Imagen 11. [40x, 2% Malva]: Presencia de infiltrado respetando un folículo piloso en un corte longitudinal.



Con líneas curvas y sin aparente dirección se observan fibras de colágenas desorganizadas.

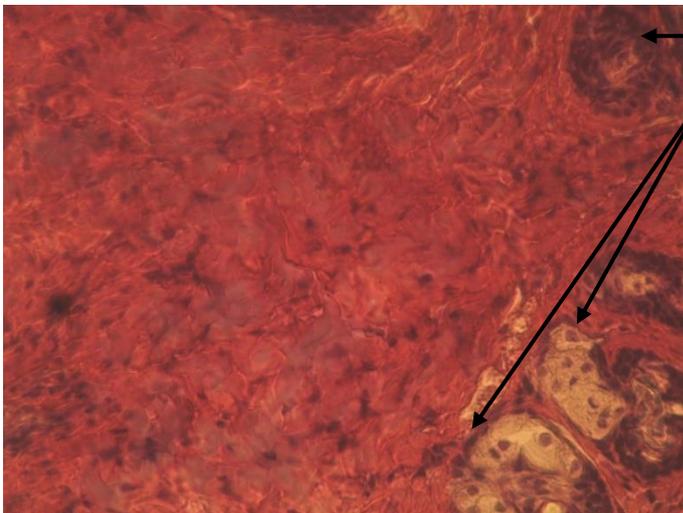
Imagen 12. [100x, 2% Malva]: Tejido de reparación con presencia de fibras de colágeno desorganizadas.



Fibroblastos.

Se observan como pequeños cuerpos oscuros.

Imagen 13. [40x, 4% Malva]: Aumento de fibroblastos y fibras de colágena en el tejido de reparación.



Folículo piloso.

Glándulas sebáceas.

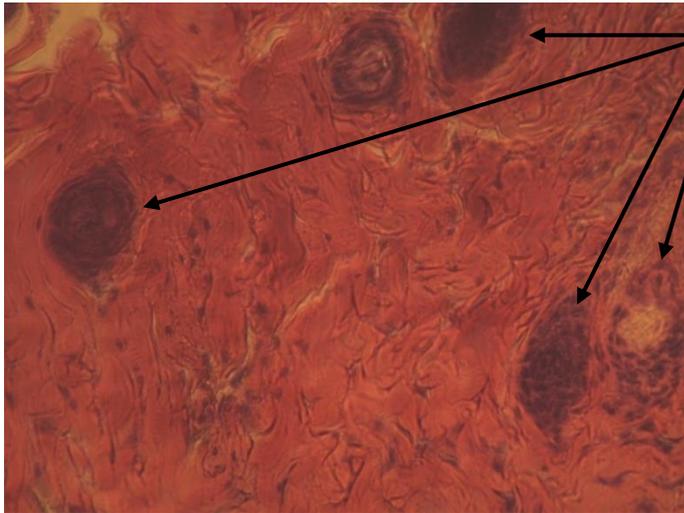
Imagen 14. [40x, 4% Malva]: Tejido de reparación respetando glándulas sebáceas y folículos pilosos.



Folículo piloso

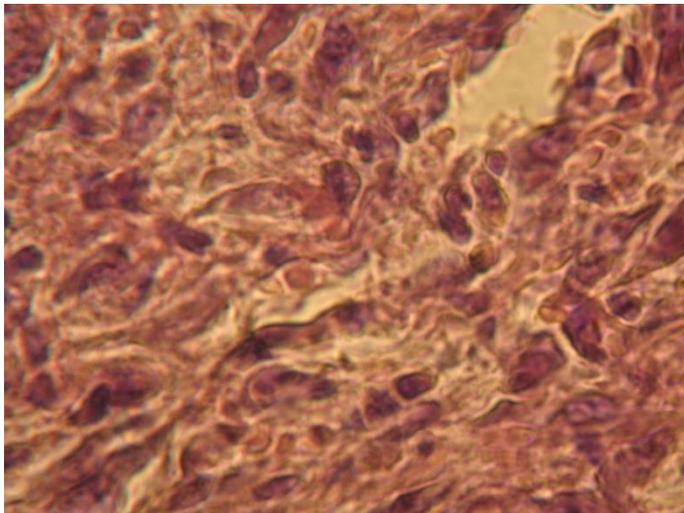
Corte longitudinal de folículo piloso rodeado de un infiltrado importante de fibroblastos.

Imagen 15. [100x, 4% Malva]: Infiltrado importante alrededor de folículo piloso.



Folículos pilosos
Glándula sebácea
Tejido en reparación sin ordenamiento aparente, respetando folículos pilosos que se observa como una zona oscura.

Imagen 16. [40x, Madecassol®]: Tejido en reparación con abundantes fibras de colágenas respetando folículos pilosos con tono oscuro.



Se observa una cantidad de fibroblastos no tan abundante
--

Imagen 17. [100x, Madecassol®]: Presencia de fibroblastos en tejido de reparación.

IX. Análisis de resultados

En el cuadro 3 se muestran las medias obtenidas con las técnicas para verificar la cicatrización, como primer punto se hablará de la prueba realizada para cuantificación de nitritos.

De acuerdo al cuadro 4 donde se plasman las diferencias de medias, resulta que existe una diferencia significativa del grupo Blanco con respecto a los otros grupos tratados, esta diferencia se reafirma con su exclusión como subconjunto en el cuadro 5, lo que permite notar que tanto el *Madecasso*® como la *Malva parviflora* tienen un efecto antioxidante aplicándose en una herida, pues estos tratamientos obtuvieron una cantidad menor de nitritos a nivel plasmático en comparación con el blanco. Esto puede deberse a los antioxidantes naturales que se encuentran en las plantas, pues como lo mencionan Ulm y Jenkins, tienen la propiedad de participar en el control de estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno⁵⁰, por lo que pueden servir como fuente natural para la obtención de compuestos antioxidantes.

Por otra parte, observando las diferencias de medias para cuantificación de ceruloplasmina en el cuadro 4, se detecta que no hay una diferencia significativa entre los grupos tratados, es decir, el tratamiento de una herida ya sea con *Madecasso*® o con *Malva parviflora* no reduce la inflamación pues los niveles de ceruloplasmina están asociados directamente a la actividad inflamatoria. Parece ser que como se ha indicado en otros estudios, la actividad antiinflamatoria es atribuible solamente a *Malva sylvestris*, y dependiendo del tipo de extracto *Malva parviflora* puede llegar a tener una pobre o nula actividad antiinflamatoria^{9, 11, 51}.

En el cuadro 3, entre los resultados de la cuantificación de peroxidación lipídica, se observa que el grupo Co4% es el único grupo que tiene los niveles de MDA por encima del Blanco, atribuyéndose así a esta concentración de malva, una ligera actividad oxidante ya que no es significativamente diferente frente al grupo Blanco, pero sí frente al tratamiento con *Madecasso*®, pues en el cuadro 6 no los homologa dentro un mismo subconjunto y los diferencia significativamente, es decir, el tratamiento con extracto acuoso de malva al 4% presentó actividad oxidante frente al *Madecasso*® pero no frente al blanco.

El análisis de los resultados para la evaluación del efecto cicatrizante de *Malva parviflora* es un poco evidente, pues en el cuadro 7 donde se expresan las medias del porcentaje cicatrizado de los distintos grupos, se observa que tanto el grupo de *Madecasso*® como el de concentración de malva al 4% poseen un mayor porcentaje de cicatrización, lo que representa una diferencia significativa de estos grupos frente al Blanco representada en el cuadro 8. Esta diferencia separa a estos dos grupos del Blanco estableciendo dos subconjuntos en el cuadro 9, lo que quiere decir que sólo los grupos tratados con *Madecasso*® y extracto de malva al 4% muestran una mejora distintamente significativa ante el Blanco.

Ya que de manera macroscópica se observó cicatrización y contracción de la herida en todos los grupos tratados, los cortes histológicos realizados a las zonas de reparación tisular son importantes para concluir sobre la eficiencia entre los

grupos con tratamiento, pues con ayuda de estas imágenes se puede observar la calidad del proceso de cicatrización.

De la imagen 10 a la 12 que son las correspondientes al grupo Co2% se observa de manera general infiltrado de tejido de reparación con fibroblastos no tan abundantes, pero respetando un punto de interés para el proceso de cicatrización, los folículos pilosos.

El tejido reparado con administración de *Madecassol* también se caracteriza por haber respetado folículos, la imagen 16 es prueba de ello, sin embargo en la imagen 17, la presencia de fibroblastos que son piezas clave de la cicatrización, no es tan abundante como lo muestra en las imágenes 13 y 15, el grupo tratado con extracto de malva al 4 %, pues en la imagen 15 los fibroblastos son abundantes y continuos, y se congregan estrechamente al folículo piloso que el extracto de malva al 4% también ha respetado. Otro aspecto importante característico de este grupo es la presencia de glándulas sebáceas presentes en la imagen 14, lo que indica que la reepitelización también define estructuralmente estas glándulas.

A pesar de que no se observa en el tratamiento con malva al 4% una organización epitelial muy clara del tejido, en las imágenes 13 y 14 el aspecto de éste es menos rugoso comparado con las imágenes 16 y 17 del grupo tratado con *Madecasso*®, esto sugiere pensar que después de que haya terminado el proceso de cicatrización, de manera macroscópica el tratamiento con malva al 4% brindará una mejor apariencia. Todo esto en conjunto indica que la cicatrización con el tratamiento con extracto acuoso de *Malva parviflora* al 4% es más rápida frente al de *Madecasso*® en ratones, aclarando también que ambos presentan la capacidad de acelerar y contribuir en el proceso de cicatrización.

X. Conclusiones

El extracto acuoso de *Malva parviflora* aplicado tópicamente sobre heridas ayuda a tener una cicatrización eficiente comparado con *Madecasso*®, un medicamento cicatrizante comercial. Esta característica se observó en una formulación tópica al 4% de extracto sólido en vaselina, pero no al 2%. En el estudio histológico se observa una restauración adecuada del tejido respetando folículos pilosos y glándulas sebáceas pero con una pobre organización celular.

XI. Perspectivas

Se sugiere que para complementar el estudio, se evalúe el efecto cicatrizante del extracto acuoso de *Malva parviflora* en varias formulaciones con concentraciones más altas al 2 % para establecer una relación dosis-respuesta y poder conocer la concentración donde se obtenga un efecto cicatrizante óptimo.

XII. Referencias

1. Raina R, Parwez S, Verma PK, Pankaj NK. Medicinal plants and their role in wound healing. VetScan [Revista en línea] 2008 [Consultado el 07 Octubre del 2012](1):[aprox. 7 p.]. Disponible en: http://www.kashvet.org/medicinal_plants_wound_healing.html
2. Prasad V, Dorle AK. Evaluation of ghee based formulation for wound healing activity. J Ethnopharmacology. 2006;107(1):38-47.
3. Diallo D, Sogn C, Samaké FB, Paulsen BS, Michaelsen T, Keita A. Wound healing plants in Mali, the Bamako region. An ethnobotanical survey and complement fixation of water extracts from selected plants. Pharm Biol. 2002;(2):117-128.
4. Walter J. Patología humana. 1ª ed. México: El Manual Moderno; 1994.
5. García E, Luján V, Jiménez D, Cuesta MD, Villora MJ, Nieto R, et al. Guía para el cuidado de las úlceras [Libro en línea]. España: Complejo Hospitalario de Albacete; 2008 [Consultado el 22 de abril del 2015] Disponible en: <http://www.chospab.es/publicaciones/protocolosEnfermeria/documentos/00889e4f14cd542d584ffc90a0caf75b.pdf>
6. Secretaria de Salud. Prevención, diagnóstico y tratamiento del Pie Diabético en el primer nivel de atención [Monografía en Internet]. México: CENETEC; 2012. (Consultada el 20 de Septiembre del 2012). Disponible en: www.cenetec.salud.gob.mx/...PieDiabetico/SSA_005_08_EyR.pdf.
7. Afolayan AJ, Aboyade OM, Adedapo AA, Sofidiya MO. Anti-inflammatory and analgesic activity of the methanol extract of *Malvaparviflora* Linn (*Malvaceae*) in rats. Afr. J. Biotechnol. 2010;(8):1225-1229.
8. Grierson DS, Afolayan AJ. Antibacterial activity of some indigenous plants used for the treatment of wounds in the Eastern Cape, South Africa. J Ethnopharmacol. 1999;(1):103-106
9. Shale TL, Stirk WA, van Staden J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. J Ethnopharmacol. 1999;(3):347-354.
10. Pérez RM. Evaluation of hypoglycemic activity of the leaves of *Malva parviflora* in streptozotocin-induced diabetic rats. Food Funct. 2012;(4):420-427.
11. Botanical-online. Propiedades de la Malva. [Monografía en línea] 2015. [Consultada el 07 de julio del 2015]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalsmalvacastella.htm>
12. Universitat de les Illes Balears. *Malva parviflora*. [Monografía en línea] España: Herbario virtual del Mediterraneo Occidental. [Consultada el 04 de junio del 2015]. Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/4410.html>
13. Plants for a Future. *Malva parviflora* – L. [Monografía en línea] Inglaterra: Plants For A Future; 2012. [Consultada el 22 de marzo del 2012]. Disponible en: <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Malva+parviflora>
14. Menéndez JL. *Pucciniamalvacearum* Bertero ex Mont. [Monografía en línea] España: Astornatura; 2007. [Consultada el 10 de septiembre del 2015]. Disponible en: <http://www.astornatura.com/especie/puccinia-malvacearum.html>
15. Sadaf F, Saleem R, Ahmed M, Ahmad SI. Healing potential of cream containing extract of *Sphaeranthus indicus* on dermal wounds in Guinea pigs. J Ethnopharmacology. 2006;(107):161-163.
16. Wilgus TA. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. Pharmacol Res. 2008;(2):112-116.

17. Benavides J. Reparación de heridas cutáneas. Rev. Asoc. Col. Dermatol. 2008;(1):29-35.
18. Ornella P. Coagulación de la sangre. [Monografía en línea] Venezuela: 2010. [Consultada el 08 de junio del 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/OrnellaPenelope/coagulacin-de-la-sangre-clase>
19. Martin P. Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. Science. 1997;(5309):75-81.
20. Lopes GC, Sanches AC, Nakamura CV, DiasFilho BP, Hernandes L. de Mello JC. Influence of extracts of *StryphnodendronpolyphyllumMart.* and *StryphnodendronobovatumBenth.* on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. J Ethnopharmacology. 2005;(2): 265-272.
21. Grandi C, Perego M, Briozzo G, Cassini A, Di Marco I. Fibronectina fetal (fFN) en secreción cervical como predictor del parto prematuro. RevHosp Mat Inf. 1996;(3):127–136.
22. López YA, Ruiz MR. Purificación de vitronectina y obtención de suero. Saber.[Revista en línea] 2007 [Consultado el 20 de febrero del 2013](2):159-163. Disponible en: <http://hdl.handle.net/123456789/1316>
23. Enciso J, Amiel J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, AmielD, et al. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro plantas medicinales y estimulación de la proliferación de fibroblastos. Rev Soc Quim. 2010;(1):73-79.
24. Jiménez GY, Espinosa C. Inflamación y angiogénesis: el papel facilitador de las células cebadas en el desarrollo del melanoma. El Residente [Revista en línea] 2011 [Consultada el 29 de septiembre del 2015] (2):111-119. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2011/rr112h.pdf>
25. Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. Macrófago. [Monografía en línea] EUA: 2015. [Consultada el 28 de septiembre del 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=44054>
26. Departamento de Biología Celular y Tisular. Repaso teórico. Biología Celular e Histología Médica. México: UNAM. Facultad de Medicina; 2012.
27. Handin RI, Lux SE, Stossel TP. Blood: Principles and Practice of Hematology [Libroelectrónico]. EUA: Lippincott Williams &Wilkins; 2003. [Consultada el 29 de septiembre del 2015]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=H85dwxYTKLwC&pg=PA472&dq=monocyte+diameter&hl=es#v=onepage&q&f=false>
28. Cowin AJ. Role of the actin cytoskeleton in wound healing and scar formation. Primary Intention. 2006;(1):39-42.
29. van Rijin O. Mathematical models for wound healing: angiogenesis and wound contraction. [Monografía en línea] Países Bajos: 2009. [Consultada el 15 de junio del 2015]. Disponible en: http://ta.twi.tudelft.nl/users/vuik/numanal/rijn_eng.html
30. Ramos C, Becerril C, Cisneros JG, Montañó M. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. RevInstNalEnfRespMex. 2004; (3):215-231.
31. Sampedro A. Curación de las heridas. [Monografía en línea] España. [Consultada el 24 de junio del 2015]. Disponible en: <http://www10.uniovi.es/anatopatodon/inicio/index.htm>
32. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet. 2005;(9498):1736-1743.

33. Andy CZ. Homeostasis: Curación de las heridas cutáneas. [Monografía en línea] Cuba: Tempateism, 2015. [Consultada el 29 de octubre del 2015]. Disponible en: <http://www.anatolandia.com/2015/07/homeostasis-curacion-de-las-heridas-cutaneas.html>
34. De Paz P. Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares [tesis doctoral]. Granada: Editorial de la Universidad de Granada; 2006.
35. Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11ª Ed. México: Secretaría de Salud; 2014.
36. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; (1): 131-138.
37. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *ClinChimActa.* 1998;(274):177-188.
38. Díaz L. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cubana MedMilit.* 2000; (3):192-198.
39. Márquez G. Compuestos de oxidación lipídica mayoritarios en los alimentos: nuevos métodos para su determinación cuantitativa y efectos sobre modelos celulares Caco-2. [Monografía en línea] España: Fundación Triptolemos, 2013. [Consultada el 04 de octubre del 2015]. Disponible en: <http://www.triptolemos.org/catalogo/proyecto/compuestos-de-oxidaci%C3%B3n-lip%C3%ADica-mayoritarios-en-los-alimentos-nuevos-m%C3%A9todos-para-su-deter>
40. Ehrenwald E, Fox PL. Isolation of nonlabile human ceruloplasmin by chromatographic removal of a plasma metalloproteinase. *Arch Biochem and Biophys.* 1994;(2):392-395.
41. Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A, Mostafaluo S, Zamani ML, Larijani b, et al. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. *Arch Med Res.* 2005;(4):376-381.
42. Céspedes E, Castillo J. La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito?. *Rev Cubana Invest Biomed* [Revista en línea] 2008 [Consultada el 07 de octubre del 2015] (2):13 p. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v27n2/ibi03208.pdf>
43. Méndez I, Namihira D, Moreno L, Sosa C. El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. 2ª ed. México: Trillas; 1990.
44. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5ª ed. México: Mc Graw Hill; 2014.
45. González S. Evaluación del efecto inmuno-regulador del extracto acuoso del fruto noni (*Morindacitrifolia L.K*) en ratones CD1 [Tesis]. México: FES Zaragoza; 2012.
46. Rodríguez H. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Verbesinacrocata (Cav.) Less.* (Capitaneja) en ratón CD1 [Tesis]. México: FES Zaragoza; 2011.
47. Vázquez E. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto acuoso de *Impomoeamurucoides*(cazahuate) en un modelo de ratón CD1 [Tesis]. México: FES Zaragoza; 2014.
48. Estepa V, Rodenas S., Martín MC. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad Farm.* 2001;(67):1-17.

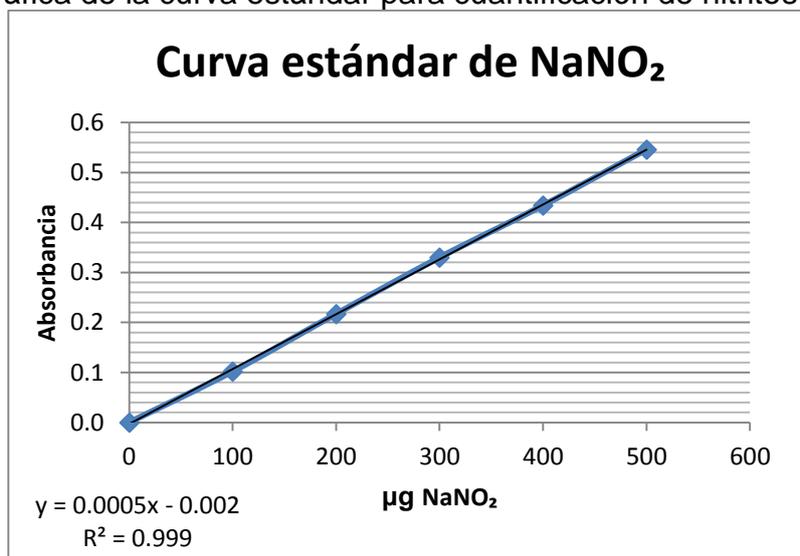
49. Martín Q, Cabero MT, de Paz Y. Tratamiento estadístico de datos con SPSS [Libro electrónico]. España: International Thomson; 2008. [Consultada el 22 de octubre del 2015]. Disponible en:
<https://books.google.com.mx/books?id=p2kswpzT2oEC&pg=PA177&lpg=PA177&dq=prueba+de+subconjuntos+hsd+tukey&source=bl&ots=22D8shsWbm&sig=ekxzI00sW5QbgwcAH85kCkMU8h0&hl=es&sa=X&ved=0CEwQ6AEwCWoVChMI6ebt-9zXyAIVitGACCh2i0Q0C#v=onepage&q&f=false>
50. Ulm R, Jenkins GI. Q&A: How do plants sense and respond to UV-B radiation? BMC Biol. 2015;(1):45.
51. Prudente AS, Loddi AM, Duarte MR, Santos AR, Pochapski MT, Pizzolatti MG, et al. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: Malva sylvestrisL. FoodChemToxicol. 2013;(58):324-331.

XIII. Anexo

Cuadro 10. Datos de la curva estándar para cuantificación de nitritos.

Tubo	NaNO ₂ µg	Abs	Abs corregida
Blanco	0	0.028	0.0
1	100	0.130	0.102
2	200	0.245	0.217
3	300	0.358	0.330
4	400	0.462	0.434
5	500	0.574	0.546
m=	0.0011		
b=	-0.0027		
r ² =	0.9998		

Gráfica 1. Gráfica de la curva estándar para cuantificación de nitritos.



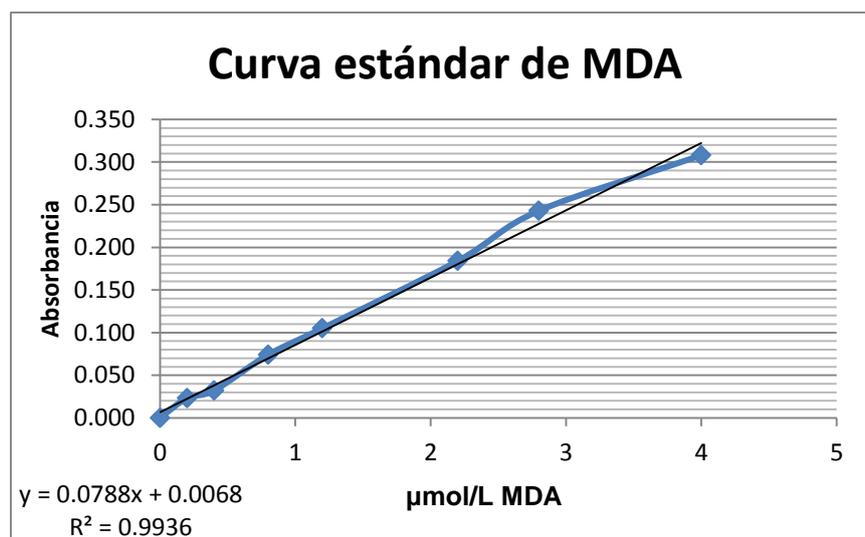
Cuadro 11. Dato estándar para cuantificación de ceruloplasmina radial.

Diámetro del halo de inhibición: mm	Ceruloplasmina, mg/dL
4	21.6

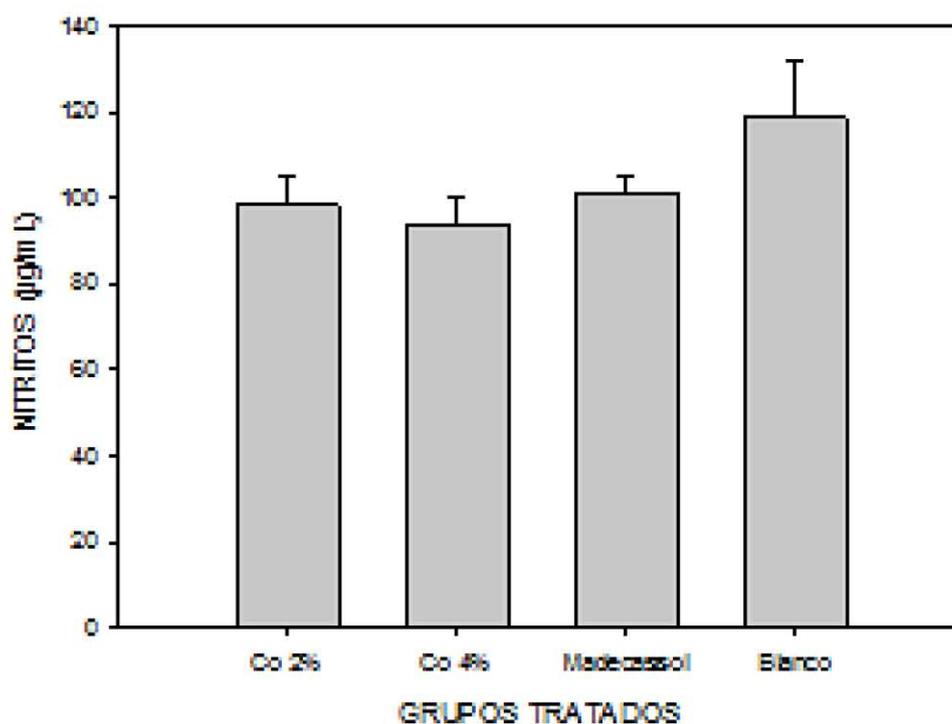
Cuadro 12. Datos de la curva estándar para cuantificación de peroxidación lipídica.

Tubo	MDA $\mu\text{mol/L}$	Abs	Abs corregida
Blanco	0	0.030	0.000
1	0.2	0.053	0.023
2	0.4	0.062	0.032
3	0.8	0.104	0.074
4	1.2	0.135	0.105
5	2.2	0.214	0.184
6	2.8	0.273	0.243
7	4	0.338	0.308
m=	0.079		
b=	0.007		
r ² =	0.994		

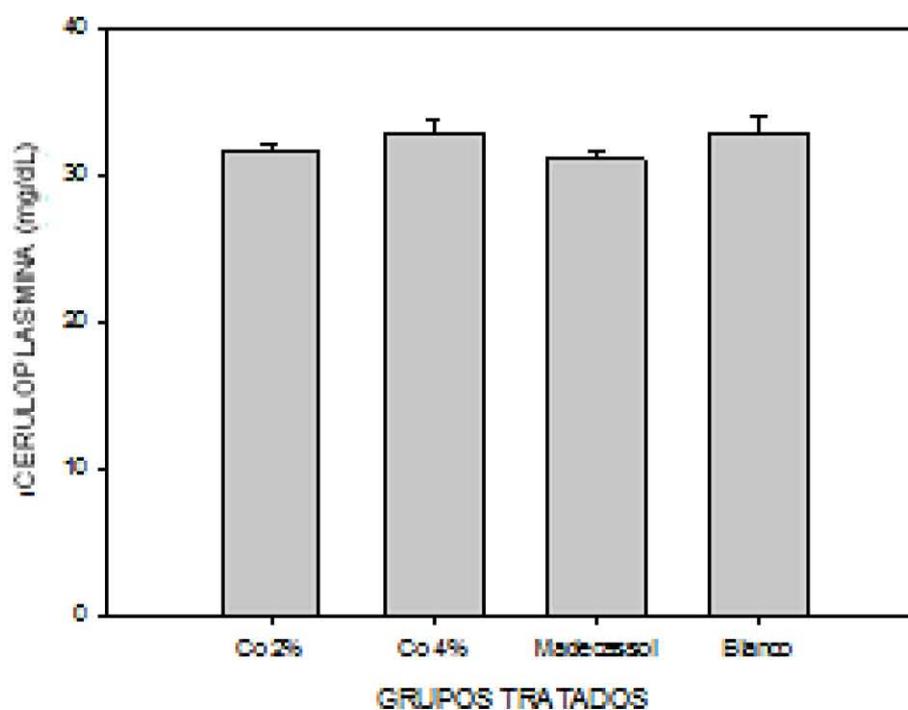
Gráfica 2. Gráfica de la curva estándar para cuantificación de peroxidación lipídica.



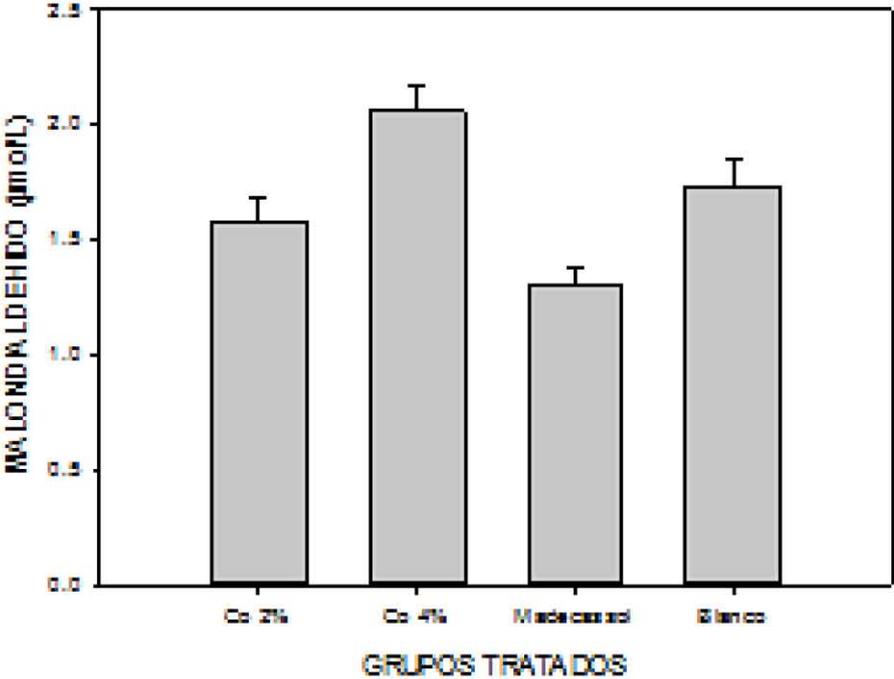
Gráfica 3. Concentraciones medias de los 4 grupos tratados para Nitritos.



Gráfica 4. Concentraciones medias de los 4 grupos tratados para Ceruloplasmina.



Gráfica 5. Concentraciones medias de los 4 grupos tratados para Peroxidación.



Gráfica 6. Medias porcentuales de los 4 grupos tratados para evaluación del efecto cicatrizante.

