



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

ICAUA ACOYANI CHÁVEZ SANDOVAL

DIRECTOR: Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy



Los Reyes Iztacala,  
Tlalnepantla, Estado de México

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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**

A la Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyectos IN213713, IN211614

### **A los Miembros del jurado:**

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dr. Alonso Antonio Vilches Flores

Mtro. Luis Antonio Hernández González

Mtra. Karla Stephanie Martínez Elizalde

Por sus consejos y recomendaciones que ayudaron a mejorar mi trabajo de tesis.

## DEDICATORIAS

*A mis padres Angy y Many les agradezco infinitamente su apoyo, confianza, amor y dedicación durante toda mi formación personal y académica porque sin ustedes culminar esta etapa no hubiera sido posible. ¡Los amo inmensamente! son un ejemplo a seguir, y valoro todo su esfuerzo y trabajo para brindarme siempre lo mejor.*

*A mis hermanos Yael y Sergio por hacer mis días inolvidables, porque a pesar de nuestras diferencias siempre somos un equipo que supera los obstáculos de la vida, gracias por los buenos momentos y su grata compañía, ¡Los amo!*

*A mis abuelitos Chulis y Febito por todo su amor, oraciones y enseñanzas de vida que me han hecho crecer ¡los quiero!*

*A Víctor Alonso por todo su apoyo incondicional, amor y cariño que me ha brindado durante este tiempo. Gracias por las asesorías, consejos, motivación y tiempo de calidad que me has brindado ¡Te amo!*

*A mi Guesho por motivarme, por su amor y desvelos al estudiar para los exámenes. ¡Te amo! y siempre estaremos juntos.*

*De una manera muy especial quiero agradecer al Dr. Marco Aurelio por dirigir este proyecto de investigación, por las asesorías, comentarios, recomendaciones que me ha brindado durante el desarrollo del presente trabajo. Por su calidez, paciencia al aclararme las dudas que se fueron presentando, dedicación y tiempo ¡Gracias!*

*Les agradezco a mis compañeros del laboratorio de Inmunobiología*

*A Nelly, Oscar, Alonso y Judith por compartirme sus conocimientos, paciencia, amabilidad y apoyo a lo largo de este camino.*

*A Gustavo, Mario, Vane, Mike, Pili y Danie por su amabilidad, asesoría, y buen ambiente de trabajo.*

*A la Dra. Margarita Canales y su equipo de trabajo del laboratorio de Farmacognosia por sus comentarios, asesorías y recomendaciones en la realización de este proyecto. Principalmente a Karla y Ana por brindarme sus conocimientos, paciencia y apoyo.*

*A Esli por brindarme su amistad, por las buenas pláticas y excelentes momentos juntas, mil gracias por todo el apoyo ¡Te quiero!*

*A mis compañeros de la carrera principalmente a mis amigas Lore y Sonia por su amistad, motivación y experiencias vividas en las aulas y en campo, porque con ustedes esta aventura fue excelente ¡las quiero!*

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
Herida.....	3
Fases de la cicatrización.....	3
Fase Inflamatoria.....	3
Hemostasis.....	3
Fase proliferativa.....	5
Fase de remodelación.....	8
Propóleo.....	11
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
Planteamiento del problema.....	13
Hipótesis.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Particulares.....	13
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
Características organolépticas.....	14
Obtención del extracto etanólico del propóleo.....	14
Animales de estudio.....	14
Inducción de Diabetes experimental mediante Estreptozotocina.....	15
Grupos Experimentales.....	15
Evaluación de la Eficacia Cicatrizante.....	15
Histología.....	16
Longitud de la herida.....	17
Conteo de fibroblastos.....	17
Capacidad antioxidante.....	17
Fenoles totales.....	17
Flavonoides totales.....	17
Caracterización química.....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
Rendimiento del propóleo de Chihuahua.....	19

Características Organolépticas del propóleo de Chihuahua.....	19
Evaluación de la Eficacia Cicatrizante.....	19
Conteo de Fibroblastos.....	21
Cortes histológicos.....	23
Longitud de la herida.....	24
Cortes histológicos.....	27
Capacidad antioxidante.....	28
Fenoles totales.....	28
Flavonoides totales.....	28
Caracterización química.....	29
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
Apéndice 1.....	36
Apéndice 2.....	36
Apéndice 3.....	40
Apéndice 4.....	42
Apéndice 5.....	43
Apéndice 6.....	45
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de cicatrización.....	10
Figura 2. Eficacia cicatrizante del propóleo al 10% y el recoverón sobre la piel lesionada de ratones sanos y diabéticos.....	20
Figura 3. Número de fibroblastos en la piel lesionada de ratones sanos y diabéticos.....	22
Figura 4. Cortes histológicos de piel en ratones sanos 40 X. Presencia de fibroblastos identificados.....	23
Figura 5. Corte histológico de piel en ratones diabéticos 40 X. Presencia de fibroblastos.....	23
Figura 6. Longitud de la herida expresada en $\mu\text{m}$ de la piel de ratones sanos y diabéticos.....	25
Figura 7. Corte histológico de piel en ratones sanos 10 X. a) Piel sin corte.....	26
Figura 8. Cortes histológicos de piel en ratones sanos 10 X.....	26
Figura 9. Cortes histológicos de piel en ratones diabéticos 10 X.....	27

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Capacidad antioxidante, Fenoles Totales y Flavonoides Totales del propóleo de Chihuahua.....	29
Cuadro 2. Se observan los compuestos que presentó el propóleo de Chihuahua.	29
Cuadro 3. Curva patrón con Ácido gálico.....	44
Cuadro 4. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CA<sub>50</sub></b>	Capacidad Antioxidante Media
<b>CFT</b>	Concentración de fenoles totales
<b>DPPH</b>	2, 2-Difenil-1-Picrilhidracial
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>GC</b>	Gramos en que abre la piel cicatrizada.
<b>GS</b>	Gramos para abrir la piel sana.
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>IL</b>	Interleucina
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de la matriz
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PDG</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento transformante alfa
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo

**μL**      Microlitro

**μm**      Micra

**VEGF**      Factor de crecimiento endotelial vascular

## **Resumen**

La cicatrización es el proceso por el cual se lleva a cabo la reparación de heridas, dando como resultado final la formación de una cicatriz; este proceso consta de tres fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación. Cada fase abarca un periodo de tiempo específico, presentando diversos elementos celulares y agentes extracelulares que las caracterizan. Sin embargo en pacientes diabéticos este proceso se ve alterado. La hiperglucemia es el detonador etiopatogénico de los desórdenes bioquímicos que dan lugar a las complicaciones sistémicas. Contrario a lo que ocurre durante la cicatrización normal, la eliminación apoptótica fisiológica de las células inflamatorias se detiene, lo que provoca un anormal estancamiento de la fase inflamatoria en las heridas de pacientes diabéticos, además existe una sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y la interleucina-1  $\beta$  lo que trae consigo consecuencias deletéreas de impacto local. A pesar de que en la actualidad existe una gran variedad de tratamientos que ayudan a la cicatrización, estos presentan efectos secundarios importantes. Por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden al proceso de cicatrización; una de estas alternativas pueden ser algunos productos naturales. El propóleo es un producto natural obtenido de material vegetal, el cual es procesado por las abejas con enzimas salivales y cera. Sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas lo convierten en un candidato atractivo para el tratamiento de heridas en pacientes diabéticos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto cicatrizante del propóleo de Chihuahua. Se evaluó la eficacia cicatrizante del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua, analizado su efecto por histología, se determinó la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del radical 2, 2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH), la cantidad de fenoles mediante el método modificado de Singleton y flavonoides totales por el método de Dowd. Los resultados mostraron que el propóleo de Chihuahua tiene la mayor eficacia cicatrizante con respecto al recoverón, reduce la longitud en las heridas de pacientes diabéticos y presenta buena capacidad antioxidante 69.53  $\mu\text{g/mL}$  posiblemente debido a la cantidad de fenoles y flavonoides que presenta.

Es probable que los compuestos Naringina, Crisina y Pinocembrina presentes en el propóleo de Chihuahua favorecen el proceso de cicatrización.

**Palabras clave:** cicatrización, diabetes mellitus, propóleo

## **INTRODUCCIÓN**

### **Herida**

Una herida es el área donde queda interrumpida la integridad o continuidad anatómica y celular de la piel producida por algún agente físico o químico (Juárez, 2015). Existe un proceso de alta complejidad orientado a recuperar la integridad del tejido, permitiendo su regeneración y restaurando sus funciones conocido como cicatrización (García, 2015).

### **Fases de la cicatrización**

Para restablecer la integridad del área lesionada se cuenta con diversos procesos de acción simultánea conocidos como fases de la cicatrización. Cada fase abarca un periodo de tiempo específico, tiene elementos celulares y agentes extracelulares que las caracterizan. Las fases identificadas son: inflamatoria, proliferativa y de remodelación (Benavides, 2008).

**Fase Inflamatoria:** La fase inflamatoria se inicia inmediatamente después de que se generó la lesión y tiene una duración entre 24 a 48 h. Puede dividirse en dos eventos uno vascular que incluye los mecanismos de hemostasis y otro celular que implica la llegada y participación de leucocitos al área lesionada (Benavides, 2008).

**Hemostasis:** La hemostasis es fundamental para el inicio de los procesos de reparación ya que la primera acción que toma el cuerpo es detener la pérdida de sangre y para ello necesita la formación del coágulo que taponan los vasos sanguíneos lesionados. El coágulo está constituido principalmente de fibrina y plaquetas (Benavides, 2008).

Esta a su vez se puede estudiar en las siguientes fases:

- **Vasoconstricción:** La vasoconstricción tiene una duración entre 5 y 10 minutos ocurre cuando el vaso sanguíneo es roto, las células liberan factores inflamatorios (tromboxanos y prostaglandinas) logrando que el vaso se contraiga minimizando la pérdida de sangre y ayudando a que se

aglutine en el área las células inflamatorias y los factores inflamatorios. Después de la vasoconstricción ocurre la vasodilatación que tiene una duración de 20 minutos aproximadamente (Dealey, 1999).

- **Vasodilatación:** el principal factor involucrado es la histamina, se encarga de que los vasos sanguíneos se vuelvan porosos, lo cual facilita el ingreso de las células inflamatorias como los leucocitos en la herida a partir del torrente sanguíneo (Dealey, 1999).
- **Agregación Plaquetaria:** cuando el tejido sufre una lesión, la sangre tiene contacto con el colágeno provocando que las plaquetas sanguíneas secreten una serie de factores inflamatorios como el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) que estimula la proliferación celular y juega un papel importante en la cicatrización de heridas, el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), el TGF- $\alpha$  (factor de crecimiento transformante alfa) y el EGF (factor de crecimiento epidérmico) estimulan la epitelización (Ramírez, 2010), las plaquetas también expresan glicoproteínas en sus membranas celulares, lo que les permite adherirse y formar una masa denominada tapón plaquetario, así se sella la lesión y cede temporalmente la hemorragia.
- **Coagulación:** las proteínas plasmáticas o factores de coagulación interaccionan entre sí por la activación en una serie de reacciones en cascada conduciendo a la formación de fibrina. La fibrina forma una malla que reforzará al trombo plaquetario hasta que se deposite el colágeno. De manera simultánea las células inflamatorias llegan casi de inmediato al sitio de la herida, siendo los neutrófilos los primeros que se infiltran en el coágulo de fibrina, los cuales son atraídos por factores quimiotácticos específicos como el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (Ramírez, 2010).

Los neutrófilos permanecen de 24 a 48 horas removiendo detritus celulares, partículas extrañas y bacterias. Son la principal fuente de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6) y TNF- $\alpha$ . La remoción de los neutrófilos ocurre por apoptosis o por fagocitosis de los macrófagos (Benavides, 2008).

Los monocitos reemplazan después a los neutrófilos que son atraídos por TGF- $\beta$ , PDGF y TGF- $\alpha$ . En los tejidos se transforman en macrófagos y se encargan de remover detritus, partículas extrañas y bacterias al igual que los neutrófilos. Participan en la última parte de la fase inflamatoria, regulando la llegada de otros monocitos y fibroblastos, liberando factores angiogénicos (proceso favorecido por la hipoxia local) y de crecimiento PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), TGF- $\alpha$  (factor de crecimiento transformante alfa y TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), los cuales son importantes para la migración, proliferación celular y la formación de la matriz extracelular. Los macrófagos son células claves en la transición entre la fase inflamatoria y la de proliferación (Benavides, 2008).

La fase de inflamación juega un papel importante en el proceso de cicatrización debido a que se encarga de combatir la infección e inducir la fase proliferativa, pero si su duración se prolonga puede llevar a daño tisular. La inflamación dura tanto como haya agentes exógenos en la herida, por lo tanto puede llevar a una herida crónica (Benavides, 2008).

**Fase proliferativa:** Aproximadamente cuatro días después de la lesión la matriz extracelular provisional comienza a ser reemplazada por el tejido de granulación. Este cambio morfológico se 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 son la reepitelización, angiogénesis y la fibroplasia (Li *et al.*, 2007; Baum y Arpey, 2005)

Factores como NGF (factor de crecimiento nervioso) y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) participan en la migración de los queratinocitos a través de la matriz provisional compuesta por colágenos I y V, fibronectina, vitronectina, tenascina y fibrina (Scheid *et al.*, 2000). La fibrina no solo sirve como soporte sino que también estimula la migración de los queratinocitos. Los elementos necesarios para la migración de los queratinocitos son la matriz extracelular temporal, los receptores de integrinas, los factores de crecimiento y las metaloproteinasas de la

matriz (MMP) (Schwartz *et al.*, 2005). Los queratinocitos utilizan las integrinas de superficie para interactuar con la matriz provisional y direccionar la migración. Se forma una estructura en forma de lengüeta de queratinocitos migrantes. La disociación de estas uniones permite continuar la migración. Las MMP producidas por los queratinocitos juegan un papel importante en la disociación. La MMP-9 degrada el colágeno tipo IV y la laminina en la membrana basal, permitiendo así la migración hacia la herida; la MMP-1 rompe las uniones de colágeno fibrilar y facilita la migración continua. Los queratinocitos cercanos a la lengüeta de migración aumentan su proliferación para asegurar una adecuada suplencia de células que migren y cubran la herida. Cuando la migración finaliza, los queratinocitos restablecen el substrato fundamental, reconstituyendo la membrana basal y reasumiendo el proceso de diferenciación terminal para generar una epidermis estratificada (Li *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2005)

La proliferación es favorecida por el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta), hacia el centro de la herida se puede encontrar una sola capa de queratinocitos mientras en los bordes de la herida hay múltiples capas. El índice de proliferación se encuentra incrementado en el centro de la herida (Li *et al.*, 2007).

La reepitelización se restablece y se utiliza la membrana basal como estructura de anclaje de los queratinocitos a la dermis gracias a las uniones intercelulares y las fibras de anclaje. La reconstitución de la dermis inicia del tercer a cuarto día después de la lesión con la formación de tejido de granulación que incluye vasos, fibroblastos y matriz extracelular permanente (Li *et al.*, 2007; Scheid *et al.*, 2000).

La angiogénesis se activa ante la lesión. Aproximadamente al segundo día después de la herida, las células endoteliales comienzan a migrar a lo largo de la matriz provisional (Baum y Arpey, 2005). La migración inicia con la formación de pseudópodos citoplasmáticos y el aumento en la secreción de MMP. Para que las células endoteliales naveguen en la matriz extracelular deben expresar integrinas y MMP. Las MMP degradan la membrana basal y disecan la matriz extracelular para favorecer la migración endotelial, la formación de túbulos y eventualmente la

formación de nuevos capilares. Las MMP más importantes en la angiogénesis parecen ser MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-19 (Li *et al.*, 2003).

La MMP-1 también conocida como colagenasa, se requiere para la migración de las células endoteliales en la matriz de colágeno tipo I. La MMP-2 localizada con la integrina  $\alpha\beta_3$  (en la superficie de la célula endotelial) también favorece la migración de las células endoteliales a través de la matriz extracelular provisional. La MMP-2 y la MMP-9 permiten la formación de túbulos para la migración de células endoteliales (Li *et al.*, 2003).

Los vasos nuevos participan en la formación del tejido de granulación, proveen nutrición y oxígeno al tejido en crecimiento. Las células inflamatorias requieren de la interacción con los vasos sanguíneos para entrar al sitio de la herida. Durante la angiogénesis las células endoteliales también producen citocinas con actividad biológica (Li *et al.*, 2003).

Las citocinas liberadas por los macrófagos estimulan la angiogénesis, al igual que la baja tensión de oxígeno y el ácido láctico. Factores como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos y TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) participan en la angiogénesis. El VEGF producido por los queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales es la clave en la angiogénesis induce la migración de las células endoteliales (Otrock *et al.*, 2007).

Durante la fibroplasia hay migración, proliferación y producción de nuevo colágeno y otras proteínas de matriz por acción de los fibroblastos. La migración comienza hacia el cuarto día; es estimulada por PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) NGF (factor de crecimiento nervioso), TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) y la fibronectina (Baum y Arpey, 2005). La proliferación comienza en el borde de la herida, las condiciones ácidas por el bajo nivel de oxígeno en el centro de la herida pueden estimular este proceso. Los fibroblastos fabrican colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y factores de crecimiento. Una vez que han migrado cambian fenotípicamente a miofibroblastos y participan

en la contracción de la herida, la fibronectina provee un andamio para las fibras de colágeno y media la contracción de la herida (Scheid *et al.*, 2000).

La producción de colágeno inicia de 3 a 5 días después de la lesión tisular y es estimulada por PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, etc. El grado de contracción depende de la profundidad de la herida. Para heridas de espesor total la contracción contribuye con un 40% de disminución en el tamaño (Li *et al.*, 2007). Para las heridas de espesor parcial la contracción es comparativamente menor. Los miofibroblastos son las células predominantes en este proceso por su habilidad para contraerse (Li *et al.*, 2007; Baum y Arpey, 2005). Durante la formación del tejido de granulación los fibroblastos se transforman en miofibroblastos adquiriendo filamentos de actina en su citoplasma como se ha observado en las células del músculo liso. Los miofibroblastos extienden pseudópodos y las bandas de actina se ligan a la fibronectina extracelular unida al colágeno fibrilar, arrastran las fibras de colágeno a la célula y producen entonces la contracción.

**Fase de remodelación:** una vez formado el coagulo de fibrina, se reemplaza por tejido de granulación rico en colágeno tipo III y subsecuentemente por colágeno tipo I. Una de las características de la remodelación tisular es el cambio de la composición de la matriz extracelular. El colágeno tipo III se secreta en estadios tempranos de la reparación, aparece entre las 48 y 72 horas y es máximo entre los cinco a siete días (Benavides, 2008).

Después de un año o más, la dermis retorna gradualmente al fenotipo existente previo a la lesión con predominio de colágeno tipo I. La fuerza de tensión pasa de 40% (observada al mes) a 70% (observada al año). Cuando la herida se cierra inicia la degradación del colágeno tipo III y la síntesis de colágeno tipo I, en la degradación participan las metaloproteinas (MMP), las cuales son un grupo de enzimas de una gran familia de proteínas dependientes del Zinc (Benavides, 2008).

En la actualidad hay 24 diferentes MMP identificadas y se agrupan en seis familias: colagenasas, estromalisinas, metaloelastinas, matrilisinas, metaloproteinasas de matriz y gelatinasas. Tienen un amplio papel en varios

procesos biológicos en los que reconocen y degradan componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento, citocinas y sus receptores. Son inducidas durante el proceso de reparación en respuesta a citocinas, factores de crecimiento y el contacto de células con la matriz extracelular (Benavides, 2008).

Otro cambio observado ocurre con la vascularización, una cicatriz reciente se caracteriza por una relativa alta densidad de capilares mientras una cicatriz antigua es menos vascular (apoptosis de células endoteliales) y tiene entonces un color menos rojo. Los vasos sanguíneos no son los únicos que se disminuyen con el tiempo, también se disminuye el número de fibroblastos. Una cicatriz madura es relativamente acelular (Benavides, 2008).

Por todo lo antes mencionado la cicatrización es un evento muy complejo, sin embargo en pacientes diabéticos este proceso se ve alterado. La hiperglucemia es el detonador etiopatogénico de los desórdenes bioquímicos que dan lugar a las complicaciones sistémicas. Contrario a lo que ocurre durante la cicatrización normal, la eliminación apoptótica fisiológica de las células inflamatorias se detiene, lo que provoca un anormal estancamiento de la fase inflamatoria en las heridas de pacientes diabéticos. Además existe una sobre expresión de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina-1 $\beta$  lo que trae consigo consecuencias deletéreas de impacto local.

En la actualidad existe una gran variedad de tratamientos que ayudan a la cicatrización, los productos más utilizados son la Sulfadiazina de plata (agente tópico y antibacteriano) y los corticoesteroides, los cuales se ha visto que tienen efectos secundarios importantes, entre los que podemos encontrar reacciones alérgicas, hemólisis, ardor intenso, metahemoglobinemias, etc. Otra desventaja es su elevado costo, lo cual impide que muchos pacientes concluyan sus tratamientos, por estas razones se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden al proceso de cicatrización (Han *et al.*, 2005).

Una de estas alternativas pueden ser algunos productos naturales, ya que gran parte de la población mexicana utiliza vegetales como agente cicatrizante en las

heridas. Estos productos de origen natural son de fácil acceso, aplicación y bajo costo (Méndez *et al.*, 2008). Un ejemplo de productos naturales es el propóleo.

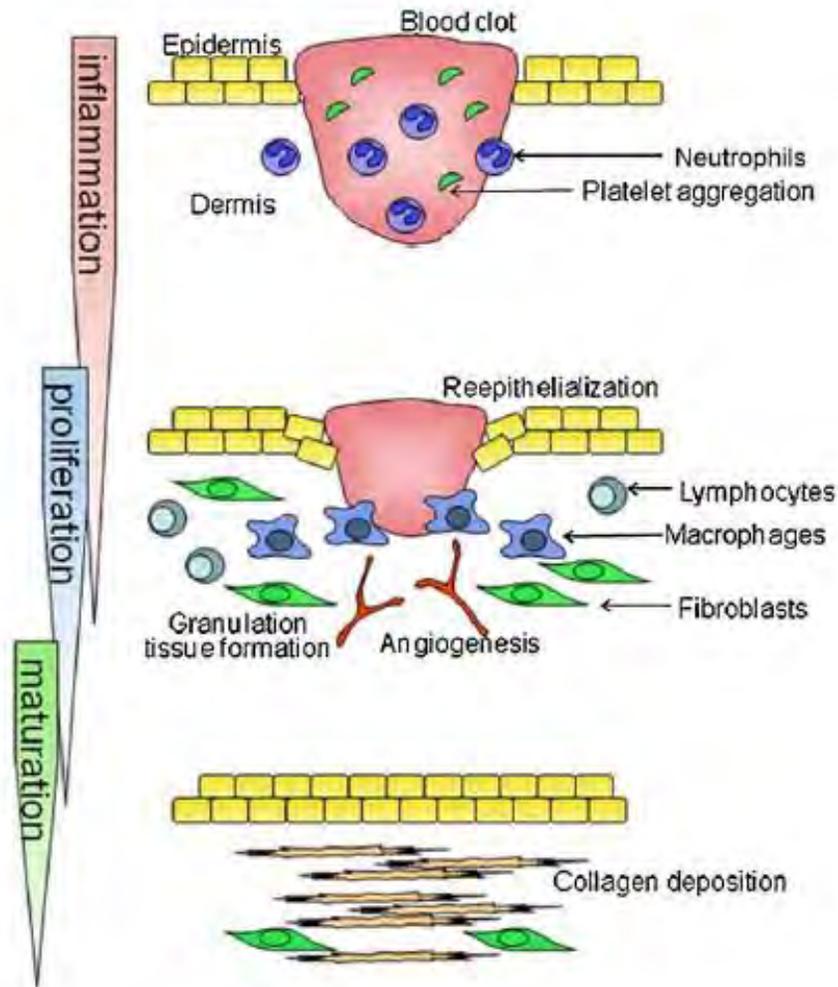


Figura 1. Esquema del proceso de cicatrización (Kondo y Ishida, 2010).

## **Propóleo**

El propóleo es un producto natural producido por abejas, las cuales recolectan resinas balsámicas secretadas por distintos árboles y plantas para después mezclarlas con ceras y secreciones salivales (Wagh, 2013). La palabra propóleo proviene del griego propolis (pro-defensa, polis-ciudad) que significa “defensa de la ciudad”. Es una sustancia resinosa que varía en su color, de amarillo claro a marrón, dependiendo de la cantidad de compuestos florales y de resinas arbóreas (Saravana y Mahitosh, 2009).

El propóleo es un material lipofílico, a bajas temperaturas es duro y quebradizo, pero cuando se calienta es suave y pegajoso presentando un olor característico (Wagh, 2013). Las abejas lo utilizan para sellar los agujeros en sus panales, suavizar las paredes internas, así como para recubrir y aislar los cadáveres de los intrusos dentro de la colmena para evitar su descomposición. El propóleo también protege la colonia de enfermedades debido a su eficacia antiséptica y propiedades antimicrobianas (Salatino *et al.*, 2005).

Su composición química es muy compleja y depende en gran medida de la flora correspondiente a las zonas donde es recolectado (Salatino *et al.*, 2005). En general, el propóleo se compone de alrededor de 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de diversos compuestos orgánicos. Más de 300 compuestos químicos fueron identificados en diferentes muestras (Marcucci, 1995) y los nuevos aún están siendo reconocidos durante la caracterización química de los nuevos tipos de propóleo (Alencar *et al.*, 2007; Bankova *et al.*, 2000; Banskota *et al.*, 1998). Como se mencionó anteriormente, las proporciones de diversas sustancias presentes en los propóleos dependen del lugar y el tiempo de recolección.

Debido a que contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, en específico flavonoides, el propóleo es considerado como un material multifactorial, esto quiere decir que posee diversas propiedades medicinales entre las que se destacan antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, antiinflamatoria, antibacterianas, anticancerígenas, antitumorales, antiulcéricas, antioxidante,

cicatrizante, propiedades fitoinhedoras, entre otras (Lotti *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Ataç-Uzel *et al.*, 2005)

Sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas lo hacen un atractivo candidato para el tratamiento de heridas en pacientes diabéticos, sin embargo los mecanismos del propóleo para inducir la cicatrización son todavía desconocidos.

## **ANTECEDENTES**

El propóleo tiene un efecto antiinflamatorio y mejora la cicatrización de heridas en roedores diabéticos por vía tópica, lo cual aporta evidencias para el estudio de la aplicación tópica del propóleo en un entorno clínico (McLennan *et al.*, 2008).

El propóleo ha demostrado tener un efecto positivo en la curación de heridas en roedores, Valença *et al.* (2012) probaron el efecto de un propóleo verde y uno rojo en heridas de ratones sanos, donde tuvo mayor efecto curativo el propóleo verde; sin embargo, no se encontró correlación entre la cantidad de flavonoides del propóleo y la acción curativa; los autores recomiendan seguir estudiando el efecto cicatrizante del propóleo.

Rivera, (2013) evaluó la capacidad antioxidante y la concentración de fenoles totales de cinco propóleos de diferentes localidades, siendo el propóleo del Estado de México el que mostró la mayor capacidad antioxidante. El compuesto con mayor proporción en los diferentes propóleos fue la pinocembrina, la cual se ha reportado presenta actividad antiinflamatoria.

Henshaw *et al.* (2014) describen como la actividad del propóleo mejora la cicatrización de las úlceras del pie diabético. Ellos aplicaron de manera tópica el propóleo en roedores diabéticos, los resultados mostraron que disminuyeron el 41% de las úlceras de los ratones con diabetes en la semana uno, posteriormente en la semana tres disminuyeron las úlceras un 63%.

En el equipo de trabajo se realizó un estudio de las diferentes propiedades biológicas del propóleo de distintos estados de la República Mexicana, en el cual se demostró que el propóleo de Chihuahua obtuvo la mejor actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, también presentó una buena actividad antiinflamatoria en un modelo de edema plantar inducido con carragenina y una buena capacidad antioxidante (Datos no publicados).

### **Planteamiento del problema**

¿El propóleo de Chihuahua tendrá actividad cicatrizante?

### **Hipótesis**

Dado a que el propóleo tiene varias propiedades biológicas (antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas) es probable que tenga un efecto positivo en el proceso de cicatrización.

### **Objetivo General:**

- Evaluar la actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua.

### **Objetivos Particulares:**

- Evaluar la actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua por el método tensiométrico en ratones sanos y diabéticos.
- Analizar la actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua en ratones sanos y diabéticos por histología.
- Determinar la capacidad antioxidante del propóleo de Chihuahua mediante el método de reducción de radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH).
- Determinar la cantidad de fenoles y flavonoides totales del propóleo de Chihuahua.

- Realizar la caracterización química del propóleo de Chihuahua mediante el análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El propóleo se obtuvo en greña de un apiario ubicado en el Ejido Concordia en el estado de Chihuahua.

Las características organolépticas del propóleo de Chihuahua se determinaron con base a la siguiente información.

### **Características organolépticas**

- Color: amarillo, pardo, marrón, rojizo, variado
- Aroma: resinoso, balsámico
- Sabor: variable, suave, balsámico, picante
- Consistencia: maleable, rígido

### **Obtención del extracto etanólico del propóleo**

Se determinó el peso del propóleo en seco y se colocó en un matraz con etanol para obtener el extracto por el método de maceración (Dominguez, 1973), se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. El extracto resultante, se colocó en charolas de vidrio con la finalidad de complementar la evaporación del solvente (Apéndice 1). El rendimiento del extracto se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco del propóleo.

### **Animales de estudio**

Se utilizaron 12 ratones machos de 7 semanas de edad de la cepa CD1, fueron mantenidos en condiciones de Bioterio con libre acceso de agua y alimento. La atención de los animales y el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

## **Inducción de Diabetes experimental mediante Estreptozotocina**

La inducción de Diabetes experimental en los ratones se realizó mediante la administración de una sola dosis de 130mg/ Kg de peso de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal (IP), disuelta en buffer de citratos (0.05 M) con pH de 4.5 recién preparado. Una semana después se tomaron muestras sanguíneas de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión para medir los niveles de glucosa por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (Accu-Check active, Roche diagnostics) (Vázquez, 2013). Los ratones que presentaron niveles de glucosa sanguínea mayores a 300 mg/dL en estado de ayuno fueron considerados diabéticos y se incluyeron en los ensayos (Wu y Huan, 2008).

## **Grupos Experimentales**

### **Ratones sanos y diabéticos**

Se utilizaron ratones sanos (n= 6)

Grupo 1: Testigo (sin tratamiento)

Grupo 2: Experimental (extracto etanólico de propóleo al 10%)

Grupo 3: Control positivo (recovery presentación en crema)

Y ratones diabéticos (n= 6)

Grupo 4: Testigo (sin tratamiento)

Grupo 5: Experimental (extracto etanólico de propóleo al 10%)

Grupo 6: Control positivo (recovery presentación en crema)

### **Evaluación de la Eficacia Cicatrizante**

La eficacia del propóleo como cicatrizante se midió en los 3 grupos de ratones sanos y diabéticos, mediante el método tensiométrico (Vaisberg et al., 1989)

Se les depiló la región dorsal con un depilatorio comercial (crema Veet para piel sensible) 24 horas antes del experimento. El día del ensayo los ratones se

anestesiaron con isoflurano al 5%. Posteriormente se realizó una incisión de 1 cm aproximadamente de longitud a todos los ratones con ayuda de un bisturí estéril, la incisión se efectuó considerando las 3 capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis).

El extracto de propóleo fue disuelto en gel quirúrgico a una concentración del 10%, se colocó con ayuda de una jeringa de insulina hasta cubrir la herida en su totalidad, en el caso del recoverón se colocó con ayuda de una espátula. Los tratamientos fueron aplicados cada 12 horas durante 10 días. Posteriormente los ratones se sacrificaron utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>, y se midió la fuerza con la que se abre la herida utilizando un dinamómetro con escala, para evaluar la firmeza del proceso de cicatrización.

La fuerza o tensión en gramos con la que abre la herida en el proceso de cicatrización se midió utilizando un dinamómetro con escala de 100 g, 250 g y 500 g. Para lograr la medición se utilizaron ganchos de metal los cuales fueron insertados en la periferia de la herida, de donde fue sujetado el dinamómetro que se tensó hasta observar la apertura de la herida. Los resultados se reportaron en porcentaje de cicatrización, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia de cicatrización (\%)} = [(GC)/GS] \times 100$$

Donde: GC = gramos en que abre la piel cicatrizada.

GS = gramos para abrir la piel sana.

### **Histología**

Se obtuvieron las muestras de piel del área de la herida, las cuales fueron preparadas de acuerdo a la técnica histológica (Apéndice 2), posteriormente fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (Apéndice 3), donde se observó el proceso de regeneración de la piel, se midió la longitud de la herida y se realizó el conteo de fibroblastos. Las observaciones y capturas de imágenes se realizaron con ayuda del microscopio Motic BA310E en 10 X y 40 X. La longitud de la herida se midió con el programa Motic Images Plus 2.0 ML.

### **Longitud de la herida**

Se utilizaron las capturas del área de la herida en 10 X, en el campo seleccionado fue donde se detectó la interrupción de la continuidad anatómica y celular de la piel, se tomaron 3 mediciones y se sacaron promedios.

### **Conteo de fibroblastos**

Se utilizaron las capturas del área de la herida en 40 X, el campo seleccionado fue la parte media de la lesión de borde a borde, los fibroblastos fueron identificados basándonos en su morfología y la presencia del núcleo.

### **Capacidad antioxidante**

La evaluación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) método modificado de Murillo, 2006 (Apéndice 4) para determinar la Capacidad Antioxidante Media (CA<sub>50</sub>) del propóleo de Chihuahua.

### **Fenoles totales**

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido reducción, por medio del reactivo de Follin-Ciocalteu como agente oxidante. El estándar de referencia fue ácido gálico por su estabilidad y estructura fenólica. Las muestras se prepararon a una solución estándar (0.2 mg/mL). El ensayo fue realizado por triplicado. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (Apéndice 5).

### **Flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método de Dowd utilizando Cloruro de Aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 2%. Se realizó una curva patrón de quercetina los resultados fueron expresados en mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (Apéndice 6).

### **Caracterización química**

Se realizó la caracterización química del propóleo de Chihuahua para compararlo con los estándares de la biblioteca del equipo, mediante cromatografía líquida de

alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Se inyectaron al equipo 30  $\mu$ L del extracto de propóleo a una concentración de 3 mg/mL, utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), acidulada al 1% con ácido fórmico, con un flujo de 1 mL/min y con un detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm.

## **RESULTADOS**

### **Rendimiento del propóleo de Chihuahua**

El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua se obtuvo a partir de 300 g de propóleo seco, el cual fue macerado con 1 L de etanol obteniéndose un rendimiento de 67.5% (202.45 g).

### **Características Organolépticas del propóleo de Chihuahua**

De acuerdo a las características organolépticas se determinó lo siguiente:

- Color: marrón
- Aroma: resinoso
- Sabor: balsámico
- Consistencia: rígido

### **Evaluación de la Eficacia Cicatrizante**

Es importante medir la eficacia cicatrizante del propóleo, la cual representa la fuerza o tensión en gramos que se necesita para abrir la herida durante el proceso de cicatrización.

El extracto etanólico de propóleo al 10% (experimental) y recoverón (control positivo) tanto en ratones sanos como en ratones diabéticos mostraron una eficacia cicatrizante mayor a la que presentaron los grupos sin tratamiento en ratones sanos y diabéticos.

El grupo de ratones sanos a los que se les aplicó el extracto etanólico de propóleo al 10 % (experimental) obtuvo el 100% de eficacia cicatrizante, le sigue el recoverón (control positivo) con un  $(87.12 \pm 3.12)\%$  y finalmente el grupo sin tratamiento (testigo) con un  $(68.85 \pm 3.59)\%$ .

En el caso de los ratones diabéticos el punto máximo de cicatrización se obtuvo con el extracto etanólico de propóleo al 10% (experimental) con un  $(54.64 \pm 6.15)\%$  en comparación con el recoverón (control positivo), el cual mostró una eficacia de cicatrización del  $30.59\% \pm 4.39$  (Figura 2).

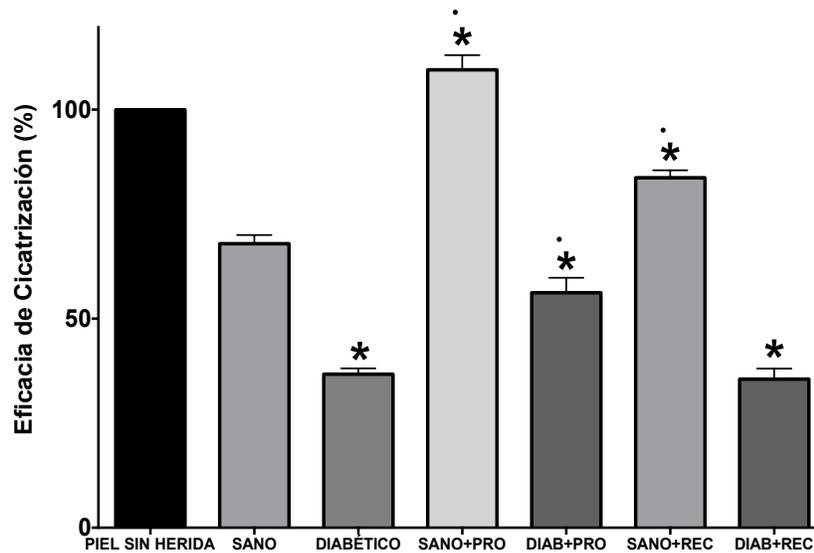


Figura 2. Eficacia cicatrizante del propóleo al 10% y el recoverón sobre la piel lesionada de ratones sanos y diabéticos. SANO+PRO: sano con propóleo; DIAB+PRO: diabético con propóleo; SANO+REC: sano con recoverón; DIAB+REC: diabético con recoverón n=6 en cada grupo experimental. Simbología de la gráfica: \* grupo que presenta diferencia significativa con respecto al grupo de ratones sanos sin tratamiento; • tratamientos que presentan diferencias significativas con respecto al grupo de ratones diabéticos sin tratamiento (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

### **Conteo de Fibroblastos**

La producción de colágeno por los fibroblastos inicia después de 3-5 días de la lesión tisular. Esta producción es estimulada por el factor de crecimiento estimulante de fibroblastos (FEGF).

Los fibroblastos son un elemento celular muy activo e importante, pues pueden migrar, adherirse, proliferar y diferenciarse a miofibroblastos durante la cicatrización.

Los resultados obtenidos demostraron que el mayor número de fibroblastos ( $35 \pm 2$ ) se obtuvieron en el grupo de ratones sanos sin tratamiento lo cual se observa en la (Figura 4a). Sin embargo, es importante destacar que el extracto etanólico de propóleo al 10% (experimental) (Figura 4b) y el recoverón (control positivo) no mostraron diferencias significativas con el mismo ( $27.33 \pm 1.53$  Y  $30 \pm 3.61$  respectivamente) (figura 4c) (Figura 3).

Con respecto al grupo de ratones diabéticos al que se le aplicó recoverón (control positivo) presentó un total de  $36 \pm 3.05$  fibroblastos, lo cual se observa en la (Figura 4c), el cual fue mayor que el valor obtenido por el grupo de ratones diabéticos tratados con extracto etanólico de propóleo al 10% al presentar  $33 \pm 3.61$  fibroblastos (Figura 5b). Sin embargo, es importante señalar que ambos grupos fueron significativamente diferentes al grupo de ratones diabéticos sin tratamiento, el cual presentó tan sólo  $19 \pm 1$  fibroblastos (Figura 5a) (Figura 3).

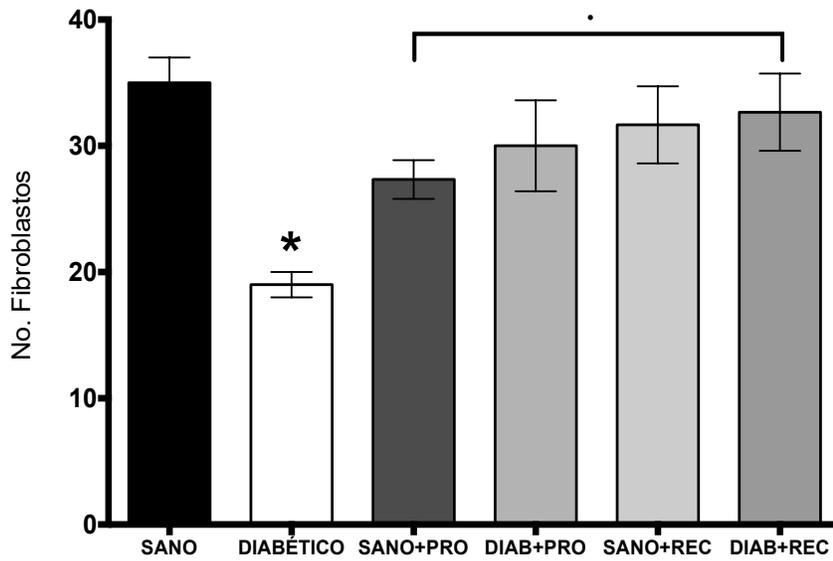


Figura 3. Número de fibroblastos en la piel lesionada de ratones sanos y diabéticos, después de 10 días de tratamiento (extracto etanólico de propóleo al 10% y recoverón) n= 5 en cada grupo experimental. Simbología de la gráfica: \* grupo que presenta diferencia significativa con respecto al grupo de ratones sanos sin tratamiento; ● tratamientos que presentan diferencias significativas con respecto al grupo de ratones diabéticos sin tratamiento (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

## Cortes histológicos



Figura 4. Cortes histológicos de piel en ratones sanos 40 X. Presencia de fibroblastos identificados a) Piel sin tratamiento, b) Piel con extracto etanólico de propóleo al 10% y c) Piel con recoverón.

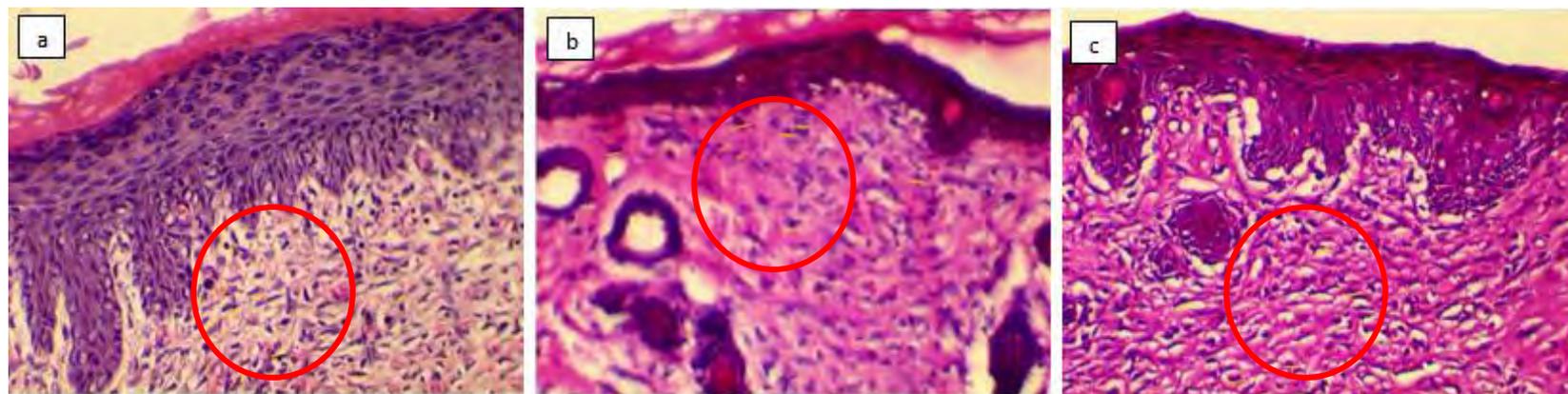


Figura 5. Cortes histológicos de piel en ratones diabéticos 40 X. Presencia de fibroblastos identificados a) Piel sin tratamiento, b) Piel con extracto etanólico de propóleo al 10% y c) Piel con recoverón.

### **Longitud de la herida**

La medición de la longitud de la herida tuvo como propósito comparar el efecto de los tratamientos y el grupo control durante el proceso de cicatrización, determinando si existe o no reducción en el tamaño de la herida, lo cual favorece la cicatrización.

En las secciones de piel que se dejaron 10 días para observar la evolución de la cicatrización, se encontró que en el grupo de ratones sanos sin tratamiento la herida es de mayor longitud ( $61.85 \pm 10.78$ )  $\mu\text{m}$  en comparación con el extracto etanólico de propóleo al 10% (experimental) y el recoverón (control positivo) ( $40.65 \pm 4.41$  Y  $50.47 \pm 4.32$  respectivamente)  $\mu\text{m}$  (Figura 6). Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre estos grupos a pesar de que el tratamiento de propóleo aplicado en ratones sanos mostró una considerable reducción de la herida con respecto al grupo de ratones diabéticos sin tratamiento.

En los grupos de ratones diabéticos con el extracto etanólico de propóleo al 10% y el recoverón mostraron una reducción considerable de la longitud de la lesión, y fue el grupo de propóleo el que registró la longitud más pequeña ( $59.65 \pm 10.39$ )  $\mu\text{m}$  con respecto al grupo diabético sin tratamiento ( $123.1 \pm 11.53$ )  $\mu\text{m}$  y diabético con recoverón ( $91.48 \pm 7.88$ )  $\mu\text{m}$  (Figura 6). Cabe señalar que el grupo diabético tratado con propóleo no es significativamente diferente a lo reportado en los grupos sanos con o sin tratamiento, lo que de alguna manera refleja la eficiencia en el proceso de cicatrización.

En el corte histológico de la piel intacta se pueden observar las 3 capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis) (Figura 7). En el grupo de ratones sanos con el extracto etanólico de propóleo al 10% se observó engrosamiento de la epidermis y la mayor contracción en la herida al compararse con el grupo al que se le aplicó recoverón (Figura 8).

En los grupos de ratones diabéticos tratados con el extracto etanólico y el recoverón se observó la epidermis engrosada y la remodelación de la dermis (Figura 9).

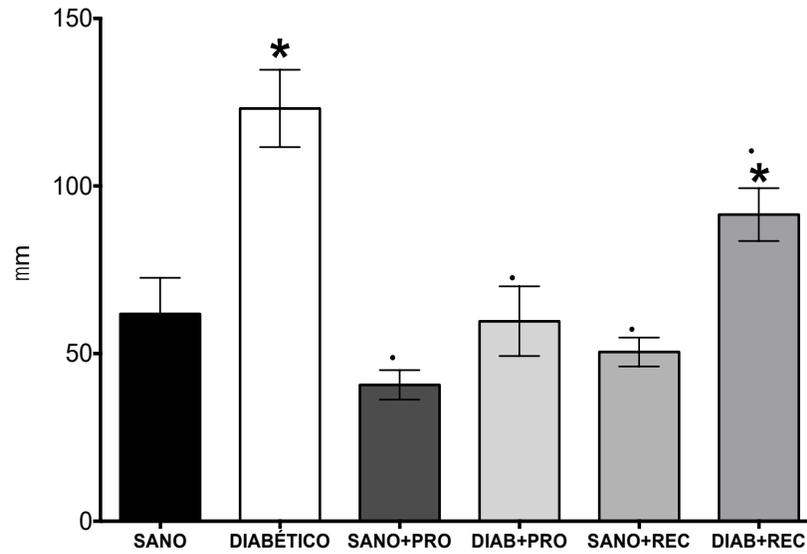


Figura 6. Longitud de la herida expresada en  $\mu\text{m}$  de la piel de ratones sanos y diabéticos, después de 10 días de tratamiento (extracto etanólico de propóleo al 10% y recoverón).  $n = 5$  en cada grupo experimental. Simbología de las gráficas: \* grupo que presenta diferencia significativa con respecto al grupo de ratones sanos sin tratamiento; ● tratamientos que presentan diferencias significativas con respecto al grupo de ratones diabéticos sin tratamiento (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

## Cortes histológicos

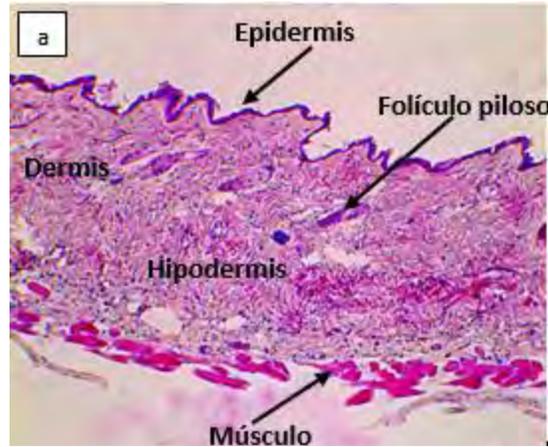


Figura 7. Corte histológico de piel en ratones sanos 10 X. a) Piel sin corte.

## Comparación de la herida

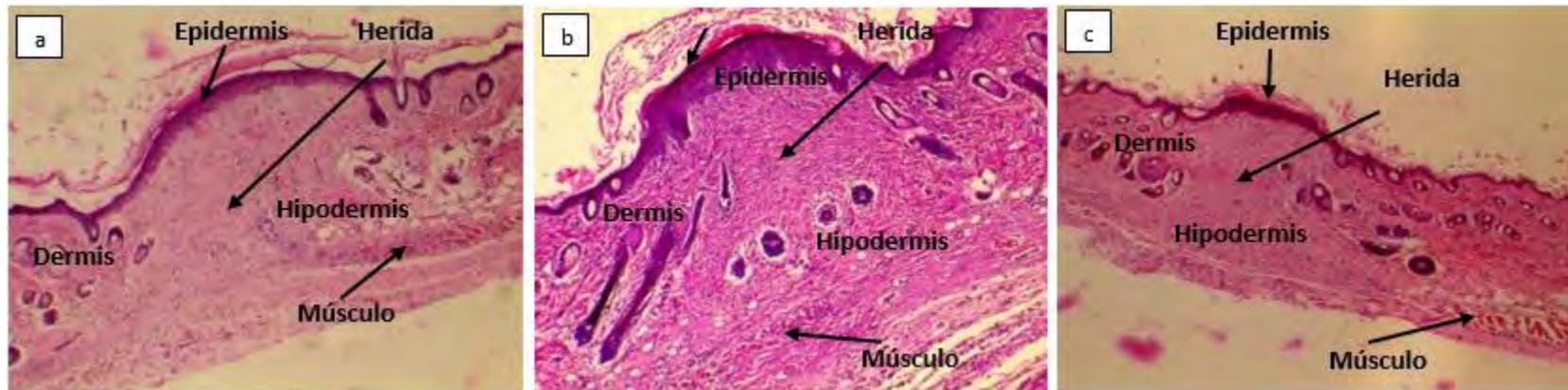


Figura 8. Cortes histológicos de piel en ratones sanos 10 X. a) Piel sin tratamiento, b) Piel con extracto etanólico de propóleo al 10% y c) Piel con recuperación. Muestras tomadas después de 10 días de la lesión

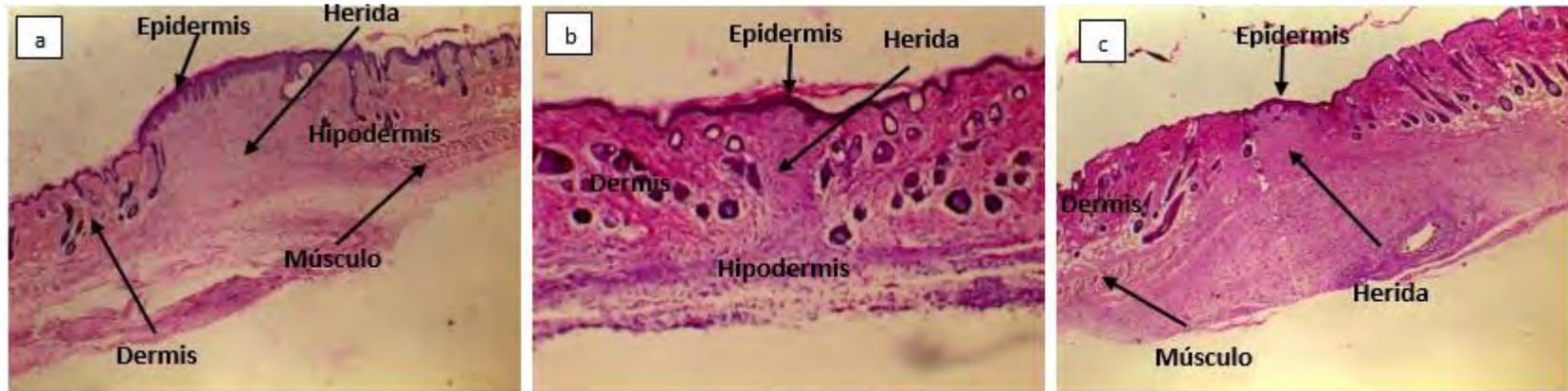


Figura 9. Cortes histológicos de piel en ratones diabéticos 10 X. a) Piel sin tratamiento, b) Piel con extracto etanólico de propóleo al 10% y c) Piel con recoverón. Muestras tomadas después de 10 días de la lesión.

### **Capacidad antioxidante**

El medio por el cual el organismo contrarresta la acción potencialmente nociva de las especies oxidantes son los sistemas antioxidantes y su eficiencia depende de su capacidad de actuación tanto intra como extracelularmente. Así un antioxidante es definido como cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable reduce o previene significativamente la oxidación de este sustrato.

En la evaluación de la actividad cicatrizante el propóleo mostró la capacidad de reducir al radical DPPH, con una  $CA_{50}$  de 69.53  $\mu\text{g/mL}$ . Al-Fatimi et al (2007), refieren que concentraciones menores a 96.6  $\mu\text{g/mL}$  para extractos se consideran con capacidad antioxidante adecuada.

### **Fenoles totales**

Los compuestos fenólicos o polifenoles son las sustancias que poseen un anillo aromático unidos a uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos han sido reconocidos por su amplio espectro de actividades biológicas, tales como son antioxidantes, antiinflamatorias, etc.

El extracto etanólico de propóleo tiene una concentración de 314 mg de equivalentes de ácido gálico/ g extracto (31.4 %).

### **Flavonoides totales**

Los flavonoides son compuestos fenólicos que presenta gran capacidad para neutralizar los radicales libres.

El extracto etanólico de propóleo tiene una concentración de 62.58 mg equivalentes de quercetina/ g de extracto (6.2%).

Cuadro 1. Capacidad antioxidante, Fenoles Totales y Flavonoides Totales del propóleo de Chihuahua.

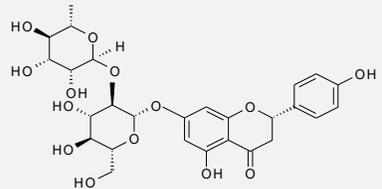
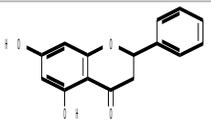
	<b>CTF</b>	<b>CTFL</b>	<b>CA<sub>50</sub></b>
<b>Propóleo</b>	314 mg de equivalentes de ácido gálico/ g extracto (31.4%).	62.58 mg equivalentes de quercetina/ g de extracto (6.2%).	69.53 µg/mL
<b>Quercetina</b>	_____	_____	4.0 µg/mL

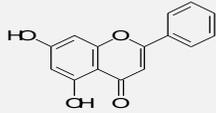
### Caracterización química

Este método permite separar, identificar y cuantificar los componentes de productos naturales. Es un tipo de cromatografía en columna, se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Con respecto a los resultados obtenidos mediante el análisis HPLC se identificaron los siguientes compuestos fenólicos.

Cuadro 2. Se observan los compuestos que presentó el propóleo de Chihuahua

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	Estructura química
<b>1</b>	6.51	222, 270, 288	Naringina	
<b>2</b>	14.46	210, 290	Pinocembrina	

3	38.78	208, 268, 356	Crisina	
---	-------	------------------	---------	---

## DISCUSIÓN

Los estudios sobre las heridas agudas en modelos animales muestran que el proceso de cicatrización se puede clasificar en líneas generales en tres fases: fase inflamatoria que comprende el establecimiento de la hemostasis y la inflamación, fase proliferativa que consiste en la granulación, la contracción y la epitelización, y finalmente la fase de remodelación que en última instancia determina la fuerza y la aparición de tejido cicatrizado (Iyyam Pillai *et al.*, 2010; Peacock, 1984).

La cascada de curación normal comienza con un proceso ordenado de la hemostasis, lo que conduce a una cascada de células inflamatorias (Broughton *et al.*, 2006). La hemostasis se produce a pocos minutos de la lesión inicial a menos que existan trastornos de coagulación subyacentes. Las plaquetas sellan los vasos sanguíneos dañados mediante la secreción de sustancias vasoconstrictoras. También secretan factores que interactúan con y estimulan la cascada de coagulación intrínseca a través de la producción de trombina, que a su vez inicia la formación de fibrina a partir de fibrinógeno. La malla de fibrina refuerza el agregado de plaquetas en un tapón hemostático estable. Por último, las plaquetas también secretan citocinas tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que se reconoce como uno de los primeros factores secretados en el inicio de las etapas subsiguientes.

Las células inflamatorias invaden el sitio de la herida dentro de unas pocas horas después de la lesión. Los neutrófilos llegan en primer lugar, seguidas de monocitos, macrófagos, fibroblastos y linfocitos (Li *et al.*, 2007). Esta etapa suele durar hasta 4 días después de la lesión. La respuesta inflamatoria hace que los

vasos sanguíneos permitan la liberación de plasma y células polimorfonucleares en el tejido circundante. Los neutrófilos, con la ayuda de los mastocitos, fagocitan los desechos del tejido dañado y microorganismos proporcionando la primera línea de defensa contra la infección. Los macrófagos también son capaces de fagocitar bacterias y proporcionar una segunda línea de defensa. Además, segregan una variedad de factores quimiotácticos y de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y las interleucinas-1 (IL-1), con lo que se inicia la formación del tejido de granulación (Broughton *et al.*, 2006).

La fase de granulación se caracteriza por la presencia de un tejido rojizo en forma de guijarros (costra) en la base de la herida e implica la sustitución de tejidos dérmicos y en ocasiones, tejidos subcutáneos en las heridas más profundas, así como la contracción de la herida. A medida que avanza la fase de granulación, las células predominantes en el sitio de la herida son células reparadoras tales como fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, que son responsables de la formación de nueva matriz necesaria para la estructura y la reparación de la función del tejido lesionado (Diegelmann y Evans, 2004; Whitney, 2005). En la fase de remodelación o la maduración, los fibroblastos promueven la resistencia a la tracción que puede tomar a veces hasta dos años después de la herida. Es importante mencionar, que los datos obtenidos en el presente estudio están más relacionados con la fase de granulación e inicio de la de remodelación.

La actividad del propóleo en el proceso de cicatrización fue muy notoria en todos los parámetros estudiados, observándose diferencias significativas con respecto de los demás grupos. El presente estudio demostró que la aplicación tópica del propóleo de Chihuahua en heridas de ratones diabéticos tiene una mayor eficacia cicatrizante a diferencia de la aplicación de recoverón en las heridas de ratones diabéticos. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Wael *et al.*, (2015) quien reportó que la aplicación de propóleo en las heridas de ratones diabéticos mostraron mayor mejoría que las heridas de ratones diabéticos no tratadas. Los

resultados demuestran que el propóleo aceleró el cierre de heridas desde la etapa inicial y contracción de la herida. Con respecto a la eficacia cicatrizante, ésta está íntimamente relacionada con la contracción de la herida y básicamente con la síntesis de colágeno. El tiempo de contracción depende del grado de laxitud del tejido y forma de la herida. Si bien es cierto que no se midió la cantidad de colágeno la fuerza de cierre de la herida observada tanto en ratones sanos como diabéticos tratados con propóleo hacen suponer que los flavonoides (principales componentes de los propóleos) están involucrados en este proceso. Estos metabolitos secundarios son conocidos por reducir la peroxidación de lípidos no sólo por prevenir o retrasar la aparición de la necrosis celular, sino también mediante la mejora de la vascularización. De ahí que cualquier compuesto que inhiba la peroxidación de lípidos se considera que puede aumentar la viabilidad y la fuerza de las fibras de colágeno, además de aumentar la circulación y la prevención del daño celular (Getie *et al.*, 2002). Los flavonoides y algunos triterpenos se han reportado como promotores del proceso de cicatrización de heridas debido principalmente a sus propiedades astringentes y antimicrobianas que parecen ser responsables de la contracción de la herida y el aumento de la tasa de epitelización (Tsuchiya *et al.*, 1996; Scortichini y Pia Rossi, 1991). Con respecto al conteo de fibroblastos, tanto el grupo con tratamiento con propóleo así como el grupo con recoverón, no mostraron diferencias significativas entre ellos, mientras que el grupo diabético presentó una disminución considerable con respecto a los demás grupos. Estos resultados pueden estar relacionados con las diferentes propiedades que se le confieren al propóleo como antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes (Khalil, 2006). La propiedad antimicrobiana del propóleo protege la herida de organismos no deseados, reduciendo en consecuencia, la inflamación y la cantidad de radicales libres producidos (Iyyam Pillai *et al.*, 2010). En un estudio donde se probó el efecto del propóleo en la curación de anastomosis de colon en ratas se observó que en el grupo tratado con propóleo, la proliferación de fibroblastos comenzó poco después que el número de células de neutrófilos disminuye. También encontraron que los linfocitos

aparecieron a principios de ese grupo en comparación con el grupo control. Esto sugiere que el propóleo acelera el proceso de cicatrización de la herida mediante la reducción de la inflamación aguda y la estimulación de macrófagos y la actividad de los linfocitos T (Kilicoglu *et al.*, 2008). Estos resultados se pueden confirmar por histología, donde la longitud de la herida del grupo diabéticos tratados con propóleo tuvo una menor longitud con respecto al grupo diabético y al diabético tratado con recoverón.

La disminución de la longitud de la herida al aplicar propóleo se puede atribuir a la actividad antiinflamatoria, lo cual coincide con Rivera (2013) quien reportó una importante actividad antiinflamatoria en un modelo de edema plantar con carragenina de los propóleos de Guanajuato y Edo. de México. Además varios estudios han demostrado que el propóleo tiene propiedades antiinflamatorias, acelera la regeneración de tejidos (epitelización) y la división celular en la curación de heridas, previene y detiene el desarrollo de procesos inflamatorios, exhibe una acción antimicrobiana y acorta el tiempo de cicatrización (Ramos y Miranda, 2007; Salmón, 2014).

Tomando en cuenta que dentro del análisis por HPLC se lograron identificar principalmente Crisina, Pinocebrina y Naringina, podemos proponer un posible mecanismo de acción del propóleo en el proceso de cicatrización. Tomando en cuenta que se ha reportado actividad antiinflamatoria de la Crisina (Rauf, 2015; Catchpole, 2015), de la Naringina (Ribeiro, 2007) y de la Pinocebrina (Lan, 2016; Lima, 2015; Rasul, 2013), además de una actividad antioxidante de la Crisina (Fabris, 2013; Paulino 2010; Lima, 2009) y de la Naringina (Seon-Min Jeon, 2001), consideramos que a pesar de que en este trabajo no se registraron eventos de la primer fase del proceso de cicatrización (fase inflamatoria), este tipo de actividad biológica de los compuestos pueden por un lado disminuir la respuesta inflamatoria de la zona de la herida lo que trae consigo una disminución en la formación de radicales libres que pudiese estar afectando la viabilidad de las primeras fibras de colágeno, una vez resuelta la inflamación se da la proliferación

de fibroblastos que contribuyen a la generación de un cierre más eficiente de las heridas y más rápido.

Si bien es cierto que este trabajo es apenas una aproximación al papel que pueda estar jugando el propóleo en el proceso de cicatrización, quedan algunos aspectos que se deben considerar y que tienen que ver con el resultado final del proceso, es decir si el tratamiento con propóleo conlleva a una cicatrización normal y cosmética o pudiese ser que este aceleramiento de los procesos al favorecer la proliferación de fibroblastos pudiera conducir a cicatrices hipertróficas o queloides.

## **CONCLUSIONES**

- El propóleo de Chihuahua tiene mayor eficacia cicatrizante en las heridas de ratones diabéticos con respecto al recoverón.
- El propóleo reduce la longitud de las heridas en un modelo de diabetes experimental.
- La buena capacidad antioxidante del propóleo es debida al su contenido de fenoles y flavonoides.
- Es probable que los compuestos Naringina, Crisina y Pinocembrina presentes en el propóleo de Chihuahua favorecen el proceso de cicatrización.

## **Apéndice 1**

Técnica de maceración (Domínguez, 1973)

El propóleo en greña se pesó e introdujo en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se le agregó una cantidad de solvente necesaria, donde el propóleo permaneció cubierto (300g de muestra de propóleo en 1L de solvente), el recipiente fue cubierto para evitar la evaporación del solvente.

El propóleo se dejó reposar como mínimo 1 día y máximo 2 semanas, teniendo en cuenta que la extracción de los compuestos se vio reflejada en la coloración del líquido, entre más oscuro mayor rendimiento tuvo el propóleo.

Por último se realizó una destilación a presión reducida en un rotavapor para obtener el extracto libre del solvente.

## **Apéndice 2**

Técnica Histológica

La técnica histológica es el conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios.

**Toma de la muestra:** se obtienen las muestras de piel del área donde se les realiza la herida a los ratones.

**Fijación:** es un procedimiento cuya finalidad al aplicarlo es detener la vida de las células impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir la célula, manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos.

Posteriormente las muestras fueron sumergidas en el fijador de Zinc durante 48 horas a bajas temperaturas y en un frasco ámbar, lo cual es importante, ya que se disminuye de manera notable la autólisis de los tejidos.

### **Fijador de zinc**

Preparar casi al momento de usar.

Tris base 0.1 M 1.21 gm (2.42 gm p/200 mL

Acetato de calcio 0.05 gm (o.1 gm p/200 mL

Agua destilada 80 mL (160 mL p/200 mL

Mezclar y ajustar a pH 7.2-7.4

Aforar a 100 mL (200 mL)

**Deshidratación:** Significa extraer o remover el agua de los tejidos fijados. La deshidratación debe ser completa porque, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida.

Alcohol etílico al 70%.....2 horas

Alcohol etílico al 80%.....2 horas

Alcohol etílico al 90%.....2 horas

Alcohol etílico al 100%.....2 horas

**Aclaración:** Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto, pero la parafina no es soluble en alcohol por lo que es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina.

Butanol I.....2 horas

Butanol II.....2 horas

Finalmente, las muestras fueron incluidas en parafina obteniendo los bloques histológicos.

Parafina I.....1 día

Parafina II.....1 día

### **Parafina de inclusión**

La inclusión en parafina se lleva a cabo calentándola por encima de su punto de fusión para que esté en estado líquido y pueda infiltrarse en el interior de la muestra.

Las parafinas se clasifican en:

Blandas: tienen un punto de fusión de 45–52 °C. Son recomendables para incluir tejidos en los que se detectarán antígenos mediante inmunohistoquímica.

Semiduras: sus puntos de fusión son de 54-58 °C. Esta parafina se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza la técnica histológica.

Duras: tienen un punto de fusión de 60-65 °C. Son parafinas que deben usarse en ambientes con climas de temperaturas altas.

La penetración de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando ésta se encuentra en estado líquido.

Una vez infiltradas las muestras con parafina, se confeccionan bloques con moldes adecuados. Al enfriarse, la parafina solidifica y el bloque adquiere una dureza adecuada para ser cortado en el microtomo.

Obtención de los cortes: en esta etapa, los tejidos y la parafina se integran en un solo bloque que posee la dureza y la consistencia suficiente, para poder obtener secciones delgadas.

Las secciones delgadas, se obtienen utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que en forma más o menos automática seccionen el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. Los instrumentos se denominan microtomos.

El sistema de funcionamiento de los microtomos consta de cuatro mecanismos principales:

- Sujeción del bloque de parafina
- Sujeción de la navaja
- El que permite que el filo de la navaja seccione al bloque en cortes delgados y de grosor uniforme.
- El de avance del bloque en un número determinado de micrómetros después que se ha obtenido un corte.

Los microtomos se clasifican de acuerdo a la manera como se desplaza el bloque que contiene el tejido incluido.

Microtomo de rotación tipo Minot: Mediante una manivela circular denominada volante, el mecanismo que sujeta al bloque de parafina se desplaza frente al filo de la navaja, de arriba hacia abajo y viceversa en un movimiento vertical.

Microtomo de deslizamiento: El movimiento que se realiza para obtener los cortes es horizontal, es decir de atrás hacia adelante y viceversa. Generalmente el mecanismo que sujeta al bloque de parafina es el que se desplaza y la navaja permanece estática.

Los cortes obtenidos, aislados o en forma de cintas, generalmente se presentan arrugados y muestran un área menor que la que poseen en la inclusión, por lo que es necesario extenderlos y luego adherirlos a las láminas portaobjetos (esto facilita su manipulación posterior).

Los cortes se extienden al depositarlos sobre la superficie del líquido extendedor contenido en un recipiente denominado baño de flotación, éste mantiene la temperatura entre 40 a 45 °C. Las secciones se depositan en el líquido procurando que la superficie brillante se ponga en contacto con el líquido caliente. En caso de que ciertas arrugas persistan, se emplean unas pinzas finas o un pincel de pelo de camello, para ejercer una ligera tracción entre los extremos de los cortes y así desarrugarlos totalmente.

Al líquido de flotación se le añaden sustancias adherentes. Uno de los procedimientos más sencillos es el que consiste en disolver, en el agua ya caliente del baño de flotación (dos litros) 0.5 g de gelatina. En otros casos se emplea una solución que posee los ingredientes siguientes: agua destilada, bicromato de potasio y gelatina.

El agua destilada se calienta a 60 °C para disolver en ella la gelatina y el bicromato de potasio, sucesivamente se filtra y está lista para su uso. Este líquido previamente filtrado se puede utilizar varias veces si permanece en refrigeración.

### **Apéndice 3**

#### Tinción de Hematoxilina-Eosina

El proporcionar color a las estructuras que constituyen un tejido se hace con la finalidad de distinguirlas entre sí y facilitar su observación.

#### **Consiste en la tinción de:**

- Los núcleos mediante una hematoxilina, previamente oxidada y transformada en hemateína a la que se añade una sustancia mordiente para formar una laca (para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o hierro). Los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron.

- El citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado.

### **Desparafinar los cortes**

Xilol I.....	5 min
Xilol II.....	10 lavados
Alcohol absoluto.....	10 lavados
Alcohol al 90%.....	10 lavados
Alcohol al 80%.....	10 lavados
Alcohol al 70%.....	10 lavados
Colorear con Hematoxilina de Harris.....	5 min
Agua corriente.....	10 lavados
Alcohol ácido.....	solo 1 lavado rápido
Agua corriente.....	10 lavados
Agua amoniacal o Carbonato de Litio.....	1 lavado hasta que vire
Agua corriente.....	10 lavados
Colorear con una solución alcohólica o acuosa de eosina.....	7 min

### **Deshidratar en baños crecientes de alcohol etílico**

Alcohol al 70%.....	10 lavados
Alcohol al 80%.....	10 lavados
Alcohol al 90%.....	10 lavados
Alcohol absoluto.....	10 lavados

### **Diafanizar o aclarar empleando xilol**

Xilol I.....10 lavados

Xilol II.....aquí se dejan hasta que se monte

**Montaje:** Este procedimiento consiste en colocar encima del corte coloreado una gota de una sustancia adherente, que se diluye generalmente en xilol (resina natural) y encima de ellos se coloca una laminilla (cubreobjetos) cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina.

### **Apéndice 4**

Capacidad Antioxidante (Murillo, 2006).

La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS. En una placa de ELISA se adicionaron 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-100ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100g/mL; inmediatamente se protegió de la luz y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 540nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el control negativo se realizó aplicando 200µL de metanol en los pozos y como control positivo se utilizó quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

### **Interpretación de Resultados**

Los resultados fueron reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo (DPPH con metanol)

E= Absorbancia del experimental

(Mezcla DPPH + compuesto problema).

## Apéndice 5

Contenido de Fenoles Totales (Método modificado de Singleton *et al.*, 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utilizó fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6<sup>+</sup>. La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5<sup>+</sup> y 6<sup>+</sup>, formando una solución azul.

Se preparó una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo-OH. Se utilizó para evaluar la cuantificación de fenoles totales.

Se utilizó una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agregó el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL. Tabla

1

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se preparó una solución estándar (0.2 mg/mL), se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L de esta y se agregaron 750  $\mu$ L de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se tomó 1mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfirió a un tubo de ensayo con 6mL de agua destilada a continuación se adicionaron 500  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añadieron 1.5 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 760nm. Cada concentración fue determinada por triplicado.

Finalmente se graficó la concentración contra la absorbancia y se obtuvo la curva patrón de ácido gálico, se realizó un análisis de regresión lineal y se interpoló la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

Cuadro 3. Curva patrón con Ácido gálico.

<b>Tubo B (blanco)</b>	<b>[Ácido gálico] mg/MI</b>	<b><math>\mu</math>L patrón</b>	<b><math>\mu</math>L agua destilada</b>	<b>mL Agua destilada</b>
1	0.00625	31.25 (31)	968.75 (968.5)	7
2	0.0125	62.5	937.5	7
3	0.025	125	875	7
4	0.05	250	750	7
5	0.1	500	500	7
6	0.2	1000	0	7
P (problema)	-	250	750	7

**Apéndice 6**

## Contenido de Flavonoides Totales (Método de Down)

El contenido de flavonoides totales se determinó usando una curva patrón con quercetina (0-100 mg/L).

## PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK:

1 mg de quercetina- 1 mL de MeOH

Considerando que el volumen total de solución STOCK es 1785  $\mu$ L, se emplearán 2 mg de quercetina en 2 mL de MeOH.

Cuadro 4. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides.

[ ] ppm	$\mu$ L STOCK	$\mu$ L MeOH	(AlCl <sub>3</sub> ) al 2% mL
1	3	2997	3
2	6	2994	3
3	9	2991	3
4	12	2988	3
5	15	2985	3
6	18	2982	3
7	21	2979	3
8	24	2976	3
9	27	2973	3
10	30	2970	3
20	60	2940	3
30	90	2910	3

40	120	2880	3
50	150	2850	3
60	180	2820	3
70	210	2790	3
80	240	2760	3
90	270	2730	3
100	300	2700	3
problema	3 MI	0	3

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO EN SOLUCIÓN:

0.2 mg –1 mL de MeOH

X - 3mL de MeOH

X= 0.6 mg de extracto a probar en 3 mL de MeOH

- Para el análisis de flavonoides totales del extracto se prepararon 3 mL de cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) al 2% en metanol, los cuales fueron mezclados con 3 mL del extracto en solución a probar (0.2mg/mL).
- La prueba se realizó por triplicado.

PREPARACIÓN DEL BLANCO:

- 3 mL del extracto en solución con 3 mL de metanol sin ( $AlCl_3$ ).

LECTURA:

- Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 415 nm.
- Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina/g de extracto.

## REFERENCIAS

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L. et al., (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113 (2): 278–283
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schroder, G. y Lindequist, U. (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*. 111: 657-666
- Ataç-Uzel, Kadriye Sorkun, Özant-Önçağ, Dilşah Çoğulu, Ömür Gençay, Berkir Salih. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*. 160: 189-195
- Bankova, V.S., De Castro, S.L. y Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31 (1): 3-15
- Banskota, A.H.Y., Tezuka, J.K., Prasain, K., Matsushige, I., Saiki. y Kadota, S. (1998). Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities.
- Baum, C. y Arpey, C. (2005). Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. *Dermatology surgery*. 31: 674.86
- Benavides, J. (2008). Reparación de heridas cutáneas. *Rev Asoc Col Dermatol*. 16 (1): 29-35
- Broughton, G., Janis, J.E. y Attinger, C.E. (2006): The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117: 12S-34S
- Catchpole, O., K. Mitchell, S. Bloor , P. Davis y A. Suddes. 2015. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia*. 106:167-174

- Chen, J., Long, Y., Han, M., Wang, T., Chen, Q. y Wang, R. (2008). Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 90 (3):441-6
- Diegelmann, R.F. y Evans, M.C. (2004) Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 9: 283–289
- Domínguez, X.A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. México. 3-17 pp.
- Fabris, S., M. Bertelle, O. Astafyeva, E. Gregoris, R. Zangrando, A. Gambaro, G. Pace, P. Lima y R. Stevanato. (2013). Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. *Pharmacology & Pharmacy.* 4(1): 46-51
- García, F.E. (2015). Evaluación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de *Malva peruviflora*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 41pp
- Getie, M., Gebre-Mariam, T., Rietz, R. y 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: 320-322
- Han, M.C., Durmus, A.S., Karabult, E. y Yaman, I. (2005) Effects of Turkish Propolis and Silver Sulfodiazine on Burn Wound Healing in rats. *Revue Méd. Vét.* 156 (12): 624-627
- Henshaw, F.R., Bolton, T., Nube, V., Hood, A., Veldhoen, D., Pfrunder, L., McKew, G.L., Macleod, C., McLennan, S.V. y Twigg, S.M. (2014). Topical application of the bee hive protectant propolis is well tolerated and improves human diabetic foot ulcerhealing in a prospective feasibility study. *Journal Diabetes Complications,* 28(6): 850-857
- Iyyam Pillai, S., Palsamy, P., Subramanian, S. y Kandaswamy, M. (2010) Wound healing properties of Indian propolis studied on excision wound-induced rats. *Pharm Biol* 48: 1198-1206

- Jiang, L., Fang, G., Zhang, Y., Cao, G., y Wang, S. (2008). Analysis of Flavonoids in propolis and Ginkgo biloba by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 56 (24): 11571-11577
- Khalil, M.L. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev.* 7(1): 22-31
- Kilicoglu, S.S., Kilicoglu, B. y Erdemli, E. (2008). Ultrastructural view of colon anastomosis under propolis effect by transmission electron microscopy. *World J Gastroenterol.* 14(30): 4763-70
- Kondo, I. y Ishida, Y. (2010). Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International.* 203: 93-8
- Lan, X., Wang, Q. Li y J. Wang. ( 2016). The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Molecular neurobiology.* 53:1794-1801
- Li, J., Chen, J. y Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 25: 9-18
- Li, J., Zhang, Y. y Kirsner, R. (2003). Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc. Res. Tech.* 60: 107-14
- Lima, B., A. Tapia, L. Luna, M.P. Fabani, G. Schmeda-Hirschmann, N.S. Podio, D. Wunderlin y G.E. Feresin. (2015). Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of agricultural and food chemistry.* 57(7): 2691-2698
- Lima, C.C., Pereira, A.P.C., Silva, J.R., Oliveira, L.S., Resck, M.C., Grenchi, C.O., Bernardes, M.T., Olimpio, F.M., Santos, A.M. y Incerpi, E.K. (2009). Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rats. *Braz J Biol.* 69: 1195-1201
- Lotti, C., Campo, Fernandez, M., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Marquez Hernandez, I. y Rastrelli, L. (2010). Chemical Constituents of Red

Mexican Propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58 (4): 2209-2213

- Marcucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 6 (2): 83-99
- McLennan, S.V., Bonner, J., Milne, S., Lo, L., Charlton, A., Kurup, S., Jia, J., Yue, D.K. y Twigg, S.M. (2008). The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Repair Regen*, 16(5):706-713
- Méndez, M.M.G., Montalvo-Javé, E.E., Wintergerst, T.E., Téllez, S.M., Castell, R.A., Gómez, C.A., Laguna, H.G., Osuna, F.R. y Brechú, F.A.E. (2008). Efecto cicatrizante de la pomade preparada con *Dorstenia drakena* L. (Moraceae) en heridas cutáneas. *Medigraphic Artemisa*. 30 (4): 204-210
- Murillo, F. (2006). Actividad antioxidante in Vitro de las bebidas de frutas. *Revista Tecnológica Alfa editores técnicos*. 1-27
- Otrock, Z., Mahfouz, R., Makarem, J et al. (2007). Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood cell, Molecules and Diseases*. 39: 212-220
- Peacock, E.E. (1984) Contraction. In Peacock EE, ed. *Wound Repair*. Philadelphia, WB Saunders, 39-55
- Ramírez, H.G.A. (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea: Revisión. *Revista facultad de salud*. 2 (2): 69-78
- Ramos, A.F.N., J.D. Miranda. (2007). Propolis: a review of its antiinflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 13 (4): 697-710
- Rasul, A., F.M. Millimouno, W. Ali Eltayb, M. Ali, J. Li y X. Li. (2013). Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed research international*. 2013
- Rauf, A., R. Khan, M. Raza, H. Khan, S. Pervez, V. De Feo, F. Maione y N. Mascolo. (2015). Suppression of inflammatory response by chrysin, a

- flavone isolated from *Potentilla evestita* Th. Wolf. In silico predictive study on its mechanistic effect. *Fitoterapia*. 103: 129-135
- Ribeiro, I. A., J. Rocha, B. Sepodes, H. Mota-Filipe y M.H. Ribeiro. (2007). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 52: 13-18
  - Rivera, Y.N. (2013). Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes estados de la república. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Medicina, IPN. 156pp
  - Salatino, A., Weinstein Teixeira, E., Negri, G. y Message, D. (2005). Origin and Chemical Variations of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2: 33-38
  - Salmon, N.V. (2014). El propóleo, otro recurso terapeutico en la práctica clínica. Departamento de Enfermería E.U.E. Casa salud Valdecilla. Universidad de Cantabria.
  - Saravana, K.J. y Mahitosh, M. (2009). Antiproliferative Effects of Honey and of its Polyphenols. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009: 1-13
  - Scheid, A., Meuli, M., Gassmann M. et al. (2000). Genetically modified mouse models in studies on cutaneous wound healing. *Exp Physiol*. 85: 687-704
  - Schwartz, J.R., Marsh, R.G., Draelos, Z.D. (2005). Zinc and Skin Health: Overview of Physiology and Pharmacology. *Dermatol Surg*. 31:837-47
  - Scortichini, M. y Pia Rossi, M. (1991). Preliminary in vitro evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill). *J Appl Bacteriol*. 71: 109-112
  - Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela, R .R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299: 152-178

- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T. y Inuma, M. (1996). Comparative study on the anti-bacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 50: 27-34
- Vaisberg, A.J., Milla, M., Planas, M. C., Cordova, J. L., Agusti, E. R., Ferreira, R., Nustiga, M. C., Carlin, L. y Hammon, G. B. (1989). Taspine is cicatrizant principle in sangre de grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Medica.* 55(2):140-143
- Valença, B.L.L., Aparecida, C.E., Bastos, A.M.L., Fernandes, B.A.P., Meireles, G.L.A. y Braga, D.C. (2012). Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões,* 39(6): 515-520
- Vázquez, C. (2013). Evaluación del efecto hipoglucemiante de un sesquiterpeno (Eudesmano) aislado de *Verbesina persicifolia*. Tesis. México, D.F. 77 pp
- Wael, N.H., Gamal, B., Ahmad, A. A.G., Ayat, S., Noori, S. A., Oliver, G. (2015). Topical Application of Propolis Enhances Cutaneous Wound Healing by Promoting TGF-Beta/Smad-Mediated Collagen Production in a Streptozotocin-Induced type I Diabetic Mouse Model. *Cellular Physiology and Biochemistry,* 37: 940-954
- Wagh, D.V. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. 2013: 308249
- Whitney, J.D. (2005). Overview: Acute and chronic wounds. *Nurs Clin North Am* 40: 191-205
- Wu, K.K., y Huan, Y. (2008). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology.* 40: 5.47.1-5.47.14