



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del efecto cicatrizante y angiogénico de los ácidos 3α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos aislados de corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*).

Tesis

Que para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Jesús Alvarado Flores

Tutor: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Ciudad Universitaria, CDMX a Junio de 2018





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.

Jurado Asignado

Presidente: M. en C. José Luis Trejo Miranda

Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro

Secretario: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Suplente: M. en F. Leticia Huerta Flores

Suplente: Dr. Rodrigo González Olvera

Sitio de elaboración de la Tesis:

Laboratorio 126 “Farmacología de Productos Naturales”. Conjunto E,
Departamento de Farmacia. Facultad de Química de la Universidad
Nacional Autónoma de México.

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Sustentante: Jesús Alvarado Flores



Agradecimientos oficiales

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos Del Personal Académico de la Facultad de Química a través del proyecto DGAPA-UNAM IN213418, al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrados a través del proyecto PAIP 5000-9143 y a la Coordinación de Superación Académica de la Facultad de Química por el apoyo otorgado mediante el subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”.

Agradecimientos

Dedicatorias

Tabla de contenido

1. Resumen	13
2. Introducción	14
3. Marco Teórico	15
3.1 El Cuachalalate	15
3.1.1 Usos descritos en la medicina tradicional.....	16
3.1.2 Constituyentes químicos	16
3.1.2.1 Los triterpenos	17
3.1.2.2 Compuestos aromáticos simples	18
3.2 Generalidades de piel.....	18
3.2.1 Histología.....	19
3.2.2 Herida.....	21
3.3 Fisiología de la cicatrización	21
3.3.1. Fase I – Inflamatoria	21
3.3.2 Fase II – Proliferativa o de granulación.....	22
3.3.3 Fase III – Epitelización o remodelado	22
3.4 Tipos de cicatrización.....	23
3.4.1 Cicatrización por primera intención.....	23
3.4.2 Cicatrización por segunda intención	23
3.5 Generalidades de Angiogénesis	23
3.5.1 Angiogénesis en la cicatrización	25
3.5.2 Modelos para la evaluación de angiogénesis	27
3.5.3 Sustancias con propiedades angiogénicas.....	28
4. Planteamiento del problema.....	29
5. Hipótesis.....	30
6. Objetivos	30

6.1 Objetivo general.....	30
6.2 Objetivos particulares	30
7. Material y método.....	31
7.1 Material.....	31
7.2 Metodología	32
7.2.1 Extracción, aislamiento y purificación de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de Cuachalalate (<i>Amphipterygium adstringens</i>).....	32
7.2.3 Caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de Cuachalalate (<i>Amphipterygium adstringens</i>).....	33
7.2.4 Método para la evaluación de la cicatrización en ratas Wistar	33
7.2.4.1 Formación de las lesiones.....	33
7.2.4.2 Evaluación de la actividad cicatrizante de los ácidos purificados obtenidos de corteza de Cuachalalate (<i>Amphipterygium adstringens</i>).....	34
7.3 Método para evaluación de la angiogénesis (Modelo CAM)	35
8. Resultados	37
8.1 Extracción y aislamiento de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos	37
8.2 Caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos.....	37
8.3 Evaluación del efecto cicatrizante de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos	41
8.4 Evaluación del efecto angiogénico de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos	51
9. Discusión de resultados	56
10. Conclusiones.....	59
11. Perspectivas	60
10. Referencias	61
11. Anexos	68

Índice de figuras

Figura 1. Corteza de Cuachalalate rojo (<i>Amphipterygium adstringens</i>).....	12
Figura 2. Estructuras químicas de los triterpenos aislados y caracterizados de corteza de Cuachalalate.....	14
Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos aromáticos simples caracterizados de corteza de Cuachalalate.....	15
Figura 4. Esquema tridimensional de la piel.....	16
Figura 5. Fases involucradas en el proceso de la cicatrización.....	19
Figura 6. Etapas Principales de la angiogénesis.....	21
Figura 7. Angiogénesis en la cicatrización.....	22
Figura 8. Esquema de la parte dorsal de rata Wistar para aplicación de sustancias.....	30
Figura 9. Método de cuantificación de la respuesta angiogénica en el modelo CAM.....	34
Figura 10. Estructuras del (a) ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (b) del ácido masticadienónico.....	32
Figura 11. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido 3 α -hidroximasticadienónico que muestra su conformación molecular.....	34
Figura 12. Perspectiva del empaqueo de moléculas del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en la celda unitaria.....	34
Figura 13. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido masticadienónico que muestra su conformación molecular.....	35
Figura 14. Perspectiva del empaqueo de moléculas del ácido masticadienónico en la celda unitaria.....	35
Figura 15. Fórmula para la determinación del porcentaje de cicatrización de la herida por escisión de rata Wistar.....	41

Figura 16. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de la cicatrización tratadas con vehículo y el grupo NAIVE.....	42
Figura 17. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de la cicatrización tratadas con pirfenidona (fármaco de referencia) y el control.....	43
Figura 18. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar tratadas con extracto hidroalcohólico y el control.....	44
Figura 19. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar tratadas con ácido 3 α -hidroximasticadienónico y el control.....	45
Figura 20. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de cicatrización tratadas con ácido masticadienónico y el control.....	46
Figura 21. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de cicatrización tratadas con los ácidos anacárdicos y el control.....	47
Figura 22. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de cicatrización tratadas con la mezcla de ácidos y el control.....	48
Figura 23. Fotografías de la evolución del cierre de las heridas durante el transcurso del tratamiento para los grupo; A) NAIVE, B) Control, C) Pirfenidona, D) Extracto hidroalcohólico de <i>Amphipterygium adstringens</i>	49
Figura 24. Fotografías de la evolución del cierre de las heridas durante el transcurso del tratamiento para los grupos; E) Acido 3 α -hidroximasticadienónico, F) Acido Masticadienónico, G) Ácidos anacárdicos, H) Mezcla de ácidos.....	50
Figuras 25. Fotografías representativas de la CAM para los distintos tratamientos.....	52
Figura 26. Número de vasos sanguíneos en el modelo CAM de embrión de pollo para el grupo NAIVE y el control.....	53
Figura 27. Número de ramificaciones de vasos sanguíneos en el modelo CAM para los distintos tratamientos.....	54

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Usos empíricos medicinales de la corteza de Cuachalalate (Amphipterygium adstringens) en México.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 2. Capas de la piel.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 3. Factores involucrados en el proceso de angiogénesis.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 4. Métodos de evaluación de la angiogénesis.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 5. Sustancias con actividad angiogénica.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 6. Grupos para la evaluación de los ácidos purificados obtenidos de corteza de Cuachalalate (Amphipterygium adstringens).....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 7. Asignación de señales de RMN ¹H y ¹³C para los ácidos 3α-hidroximasticadienónico y masticadienónico.....</i>	<i>39</i>

Lista de abreviaturas y notaciones utilizadas

RMN	Resonancia magnética nuclear
CAM	Membrana corioalantoidea
MEC	Matriz extracelular
DAP	Diámetro a la altura del pecho
MMP'S	Matriz de metaloproteinasas
NO	Óxido nítrico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de factor de crecimiento endotelial vascular
NRP-1	Neuropilina
Ang 1	Angiopoyetina 1
Ang 2	Angiopoyetina 2
TGF- β	Factor de crecimiento beta-transformante
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
CCL2	Proteína quimiotáctica de monocitos 2
CD31	Molécula de adhesión y agregación plaquetaria 31
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
COX-2	Ciclooxigenasas-2
AC133	Prominina
CCF	Cromatografía en capa fina
HPLC	Cromatografía de alta eficacia
i.p	Vía intraperitoneal
p.e	Por ejemplo
ORTEP	Oak Ridge Thermal-Ellipsoid Plot Program
NAIVE	Grupos con transcurso normal de la cicatrización (ratas) y grupos solo con disco sin tratamiento alguno ni disolvente (Modelo CAM en embrión de pollo)
DMSO	Dimetilsulfóxido
UV	Ultravioleta
EEM	Error Estándar de la Media
Flk-1	Receptor 1 para Factor de crecimiento endotelial vascular
CE	Células endoteliales



“Contra cada
padecimiento crece una planta”
Paracelso

1. Resumen

La corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana, contiene como principales componentes bioactivos a los ácidos triterpénicos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico, así como compuestos aromáticos simples como la mezcla de ácidos anacárdicos. Hasta el momento carece de sustento científico y pruebas experimentales que avalen su uso terapéutico como coadyuvante en el tratamiento de la cicatrización cutánea, tanto de los extractos de esta planta como de sus metabolitos secundarios. Por lo que nuestro objetivo fue evaluar la efectividad de dichos metabolitos individuales y una mezcla de estos, en el proceso de cicatrización en rata y la determinación de sus propiedades angiogénicas *in ovo*.

En el presente trabajo se aislaron los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos a partir del extracto diclorometánico obtenido de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) mediante reflujo. La caracterización de los compuestos se llevó a cabo mediante RMN de ^1H y ^{13}C , IR y difracción de rayos X de monocristal. Posteriormente se realizó la evaluación del efecto cicatrizante de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos en el modelo de herida por escisión en rata Wistar, aplicando 300 μg de las sustancias de prueba en el área de lesión. También se evaluó la actividad angiogénica de estos compuestos *in ovo* utilizando el modelo CAM de embrión de pollo, aplicando 30 μg para cada compuesto. Se encontró efecto cicatrizante en rata Wistar con el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácidos anacárdicos y la mezcla de ácidos en la fase II de la proliferación de la cicatrización. En el modelo CAM de embrión de pollo, los compuestos demostraron actividad proangiogénica, aumentando el número de ramificaciones en los vasos sanguíneos. Con ello podemos concluir que los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos contribuyen en el proceso de la cicatrización mediante la estimulación de la angiogénesis, por lo que se aporta la evidencia científica de su uso como coadyuvante en el tratamiento de la cicatrización cutánea y ofrece la posibilidad de su aplicación terapéutica como agente cicatrizante.

2. Introducción

En México, el consumo y uso de plantas medicinales se ha incrementado notablemente en los últimos años, rebasando por mucho, el uso frecuente de la población que recurre habitualmente a las prácticas médicas populares o tradicionales. Las especies vegetales se expenden, bajo la forma de drogas crudas, como preparados procesados industrialmente o de manera casera; en ambos casos con los más diversos niveles de calidad y sin sustento científico.¹

En dermatología las plantas medicinales tienen gran importancia por sus efectos benéficos sobre algunas enfermedades de la piel, prácticamente todas las culturas del mundo han utilizado las plantas medicinales hasta el día de hoy y siguen dependiendo de estas para la atención primaria de la salud. Aproximadamente un tercio de los medicamentos tradicionales son para el tratamiento de heridas o enfermedades de la piel, en comparación con solo el 3% de los medicamentos modernos.²

La corteza de *Amphipterygium adstringens*, conocida popularmente como Cuachalalate es ampliamente utilizada en México en forma de decocción para el tratamiento de la úlcera péptica, así como en emplastos preparados a partir del polvo o su resina como auxiliar en la cicatrización de heridas. Desde el año de 1791, durante la expedición de Malaspina, Pineda describió el uso que se daba a la “cascara” del Cuachalalate para el tratamiento de úlceras y llagas en personas así como en animales.¹ Se han identificado a los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos como los principales componentes activos en la planta.³

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la efectividad de los ácidos aislados de la corteza de Cuachalalate (ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y ácidos anacárdicos) en el proceso de cicatrización y la determinación de sus propiedades angiogénicas, para así proporcionar el sustento científico del uso tradicional como cicatrizante de esta planta.

3. Marco Teórico

3.1 El Cuachalalate

Nombre científico: *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltdl

Familia botánica: *Anacardiaceae*

Sinónimos: *Juliana adstringens* Schelechter, *Hypopterygium adstringens* Schltdl

Definición de la droga cruda:

La droga consiste en la parte externa y protectora del tronco (corteza) y de las ramas de *Amphipterygium adstringens* schiede ex Schltdl.

Nombres comunes: Volador (Puebla), Cuauchalalá, Coachalalate, Cuauchalalate, Cuachalolote, Cuachinalá (Oaxaca), Muaxalaxlitli, Yuaxalaxlitli (Morelos), Cuachachalat, Maceran (Guerrero), Matixerán (Michoacan), Mapi cerán (Jalisco).⁴

Descripción macroscópica: Es un árbol que mide hasta 8 m de altura, su diámetro a la altura del pecho (DAP) es de hasta 40 cm, de tronco generalmente torcido, con ramas escasas, gruesas, ascendentes y torcidas. La parte lisa de la corteza es de color morena grisácea a gris plomiza. La corteza interna es de color crema rosado a rojo, fibrosa, con un exudado blanco cremoso, extremadamente astringente y olor picante, con un grosor total entre 10 y 20 mm, sin incluir escamas (Figura 1).

Distribución:


El árbol es común en México, especialmente en los estados de Guerrero, Michoacán, Morelos, Edo. de México, Puebla y Oaxaca.¹



Figura 1. Corteza de Cuachalalate rojo (*Amphipterygium adstringens*). Fotografía cortesía del Dr. Andrés Navarrete.

3.1.1 Usos descritos en la medicina tradicional

Los usos empíricos medicinales actuales del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), en su mayoría están relacionados directa o indirectamente con su efecto astringente, se pueden agrupar en la siguiente tabla.¹

 Tabla 1: Usos empíricos medicinales de la corteza de Cuachalalate (<i>Amphipterygium adstringens</i>) en México						
	Lesiones gástricas	Lesiones cutáneas	Lesiones de la boca	Afecciones renales y vías urinarias	Afecciones ginecológicas	Afecciones respiratorias
	Acidez	Heridas	Aftas	Dolor de riñones	Infecciones en vagina y/o útero	Tos
	Gastritis	Cortaduras	Fuegos	Inflamación de riñones	Fiebre puerperal	Inflamación de anginas
	Úlceras gástricas	Llagas	Encías inflamadas	Cistitis	“Caída de matriz”	Resfriados
	Cáncer de estomago	Picaduras de animales ponzoñosos	Dolores de muela		Inflamaciones Caxan	Tuberculosis
Modo de uso	Infusión, Decocción	Emplasto	Emplasto	Decocción, infusión	Emplasto, Infusión, Decocción	Decocción

3.1.2 Constituyentes químicos

Dentro de los principales metabolitos de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), se encuentran dos tipos de compuestos, que pertenecen a las categorías de los triterpenos compuestos por 30 átomos de carbono (escualeno como estructura base) y compuestos aromáticos simples con cadenas alifáticas de 12 a 22 átomos de carbono.^{1, 3}

3.1.2.1 Los triterpenos

Los triterpenos son estructuras que cuentan con 6 unidades de isopreno, que equivalen a 30 átomos de carbono. Los triterpenos son metabolitos de oligómeros de pirofosfato de isopentenilo y se distribuyen de forma ubicua en todo el reino vegetal en forma de triterpenos libres, glucósidos triterpénicos (saponinas), fitoesteros y/o sus precursores.⁵ Las principales actividades biológicas de los triterpenos incluyen efectos: antiparasitarios, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, antimicóticos, virostáticos e inmunomoduladores.⁶ Son empleados de manera particular en el tratamiento de úlceras pépticas y gastritis por su efecto gastroprotector.⁷

Los triterpenos principales aislados y caracterizados de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) son los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico (1), masticadienónico (2) y algunos esteroides como el β -sitoesterol (3).⁸ (Figura 2)

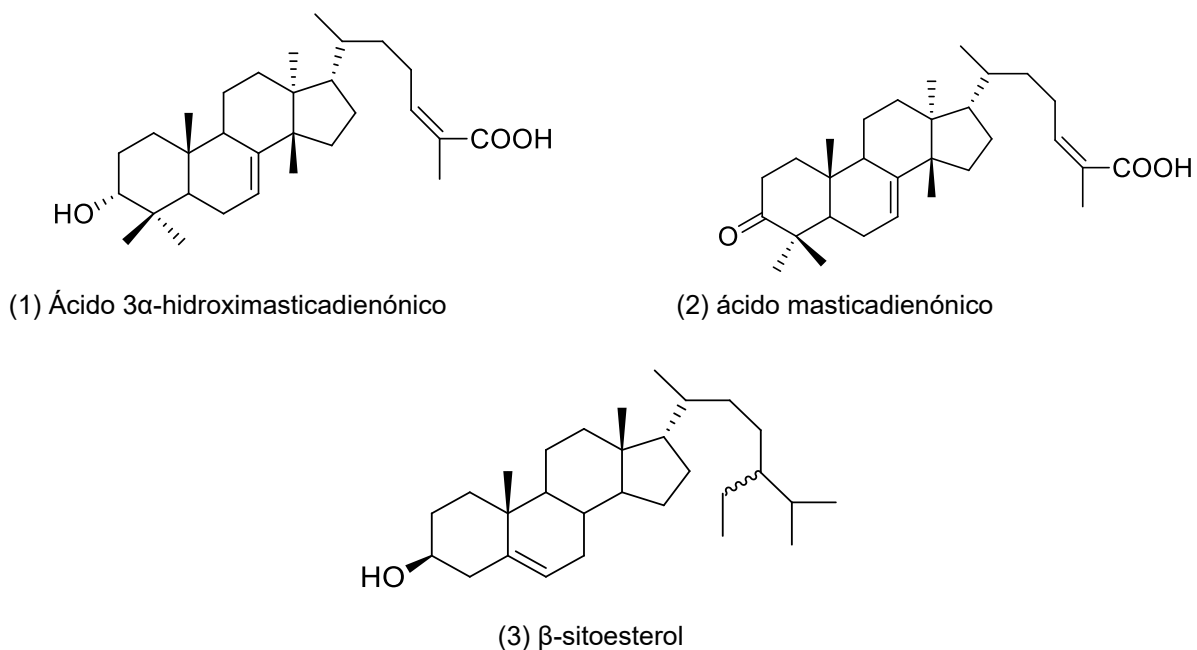


Figura 2. Estructuras químicas de los triterpenos aislados y caracterizados de corteza de Cuachalalate.

3.1.2.2 Compuestos aromáticos simples

Se han aislado del Cuachalalate compuestos con estructuras bencénicas, como ácidos anacárdicos (6) y aldehídos anacárdicos (7), así como el ácido 3-dodecil-1,8-dihidroxi-naftoico (8) y recientemente catecol (9), catequina (10) y pinocembrina (11) (Figura 3), algunos de ellos con actividad antimicrobiana y antiparasitaria.^{9, 10, 11,12}

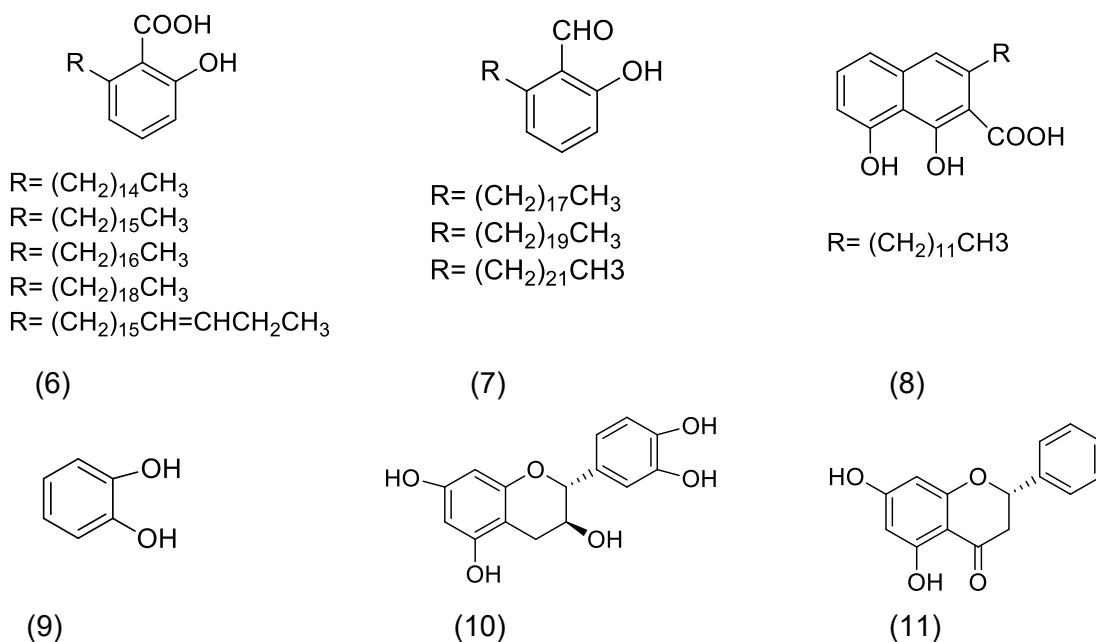


Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos aromáticos simples caracterizados de corteza de Cuachalalate.

3.2 Generalidades de piel

En términos generales, la piel es el órgano más grande del cuerpo, combinado con sus estructuras accesorias como pelos, glándulas, uñas, etc., forman el sistema tegumentario y ocupa el 20% del peso del cuerpo. Su principal función es protegerlo del medio ambiente ya que constituye una barrera protectora contra microorganismos, rayos UV, pérdida de fluidos y estrés de fuerzas mecánicas. La piel regula la temperatura corporal, participa en la vigilancia inmunológica, la síntesis de vitamina D, y al mismo tiempo sirve como principal órgano sensorial o de comunicación hacia el exterior, ya que recoge información a través de una extensa red de neuronas y terminales nerviosas que aportan información sobre presión,

vibración, dolor y temperatura; con ello los peligros externos se detectan y pueden emprenderse acciones para evitarlos y minimizarlos.¹³

Un individuo de peso y estatura promedio está cubierto de 1.85 m² de superficie de piel, la cual pesa alrededor de 4 kg, tiene un volumen de 4000 cm³, y mide 2.2 mm de espesor; contiene 1,800 mL de sangre lo que equivale al 30% de la sangre total del organismo. La piel presenta en su superficie más de 2.5 millones de orificios pilosebáceos y faneras o anexos como pelo corporal, terminaciones nerviosas, etc. Se compone principalmente de agua (60-70%); minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro; carbohidratos como glucosa; lípidos, en especial colesterol, y proteínas como colágeno y queratina, existen también algunas enzimas y vitaminas como la citocromo oxidasa (queratinización), la deshidrogenasa succínica, la anhidrasa carbónica, la monoaminooxidasa, fosforilasa, aminopeptidasa, fosfatasa ácida y otras.¹⁴

3.2.1 Histología

La piel está compuesta por tres capas: una capa superficial o externa llamada epidermis que se encuentra en constante regeneración (cada 28 días); una capa intermedia llamada dermis o piel verdadera y por último se encuentra la capa más profunda denominada hipodermis en ella se encuentran macrófagos, fibroblastos, adipocitos, nervios, músculos finos, vasos sanguíneos y linfáticos y raíces de folículos pilosos (Figura 4).¹³ En la tabla 2 se muestra las capas de la piel y sus respectivas células.

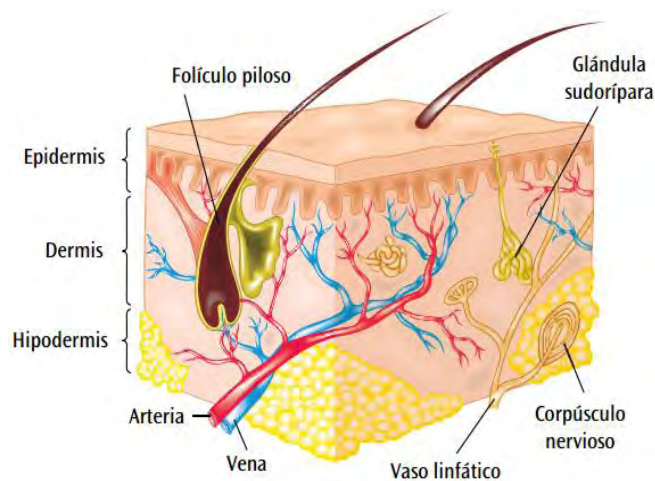


Figura 4: Esquema tridimensional de la piel. Tomado de Arenas et al.¹⁴

Tabla 2. Capas de la piel. Tomada de Huether S, et al.¹³

Estructura	Tipos de Células	Características
Epidermis		Es la primer capa de la piel; normalmente muy delgada (0.12 mm), pero puede hacerse más gruesa y formar callos o durezas con presión y fricción constantes; incluye ductos que se extienden dentro de la capa papilar de la dermis
	Células de Langerhans	Células con dendritas y funciones inmunológicas
	Queratinocitos	Células predominantes en esta capa encargadas de sintetizar queratina
Estrato córneo		Capa superficial dura que cubre al cuerpo, rica en queratina y tonofibrillas
	Queratinocitos	
Estrato lucido		Capas claras de células que contienen eleidina, que se convierte en queratina a medida que las células se desplazan hacia el estrato córneo
	Queratinocitos	
Estrato granuloso		La queratohialina da aspecto granular a esta capa de la piel
	Queratinocitos	
	Melanocitos	Los melanocitos son células que sintetizan pigmento melanina y que dan color a la piel de cada individuo
Estrato espinoso		Forma poligonal con procesos de apófisis espinosas entre queratinocitos adyacentes
	Queratinocitos	
Estrato basal		Capa basal donde los queratinocitos se dividen y se mueven hacia arriba para reemplazar las células expulsadas de la superficie
	Queratinocitos	
	Melanocitos	
	Células de Merkel	La función de las células de Merkel no se conoce claramente; se asocian con terminaciones nerviosas sensoriales
Dermis		Capa irregular de tejido conjuntivo con abundante suministro sanguíneo, linfático y nervioso; contiene receptores sensoriales y glándulas sudoríparas (apocrino, ecrino, sebáceo), macrófagos (fagocíticos e importantes para la curación de heridas) y mastocitos
	Macrófagos	Células con capacidad recolectora de restos de células o productos
	Mastocito	Liberan histamina y tienen funciones inmunológicas
	Histiocito	Los histiocitos son macrófagos errantes que recolectan pigmentos y restos inflamatorios
Hipodermis		El tejido subcutáneo o la fascia superficial son, entre otros, los que conectan la dermis suprayacente con el músculo subyacente; contiene macrófagos, fibroblastos, células grasas, nervios, vasos sanguíneos, linfáticos y raíces del folículo piloso
	Adipocitos	Células encargadas de recolectar lípidos y grasas como reserva energética

3.2.2 Herida

Una herida es definida como la región anatómica donde queda interrumpida la continuidad normal de las estructuras sea celular o tisular,¹⁵ entendiéndose por continuidad celular las cubiertas externas que protegen a la piel, como es el caso de los tegumentos, las capas de revestimiento mucoso o de la superficie (epitelio). Dicha lesión tisular es el común denominador de todo trauma y afecta al organismo en diversas formas, incluyendo pérdida local de fluidos, dolor por estímulos neurales y liberación de productos celulares a la circulación.¹⁶

En la actualidad, las heridas ocupan un lugar importante en cuanto a las demandas de atención en un servicio de urgencias. Si bien la mayoría de las heridas cicatrizan por si solas, su reparación y tratamiento oportuno reduce infecciones, diversas molestias y secuelas. Las principales complicaciones de una herida son: infección, pérdida de sensibilidad, o pérdida de extremidades (en caso de heridas no tratadas en pacientes con diabetes u otras patologías), además algunos problemas estéticos y funcionales de una herida no cicatrizada correctamente como cicatrices queloides, hipertróficas y atróficas.¹⁴

3.3 Fisiología de la cicatrización

De manera fisiológica, toda lesión en la piel que altere la continuidad de la superficie cutánea desencadena mecanismos de reparación; con la finalidad de restablecer la integridad del área lesionada. Existen diversos procesos de acción simultánea conocidos como fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación tisular (Figura 5). Cada una cuenta con límites estrictos en el tiempo y ciertas características que generan como resultado un tejido con características similares, pero no idénticas a la piel ilesa.¹⁷

3.3.1. Fase I – Inflamatoria

Inicia inmediatamente después de la lesión tisular y tiene una duración promedio entre 24 a 48 horas. Puede ser dividida en dos eventos, uno vascular y otro celular. El vascular incluye los mecanismos de hemostasia; el celular implica la llegada y

participación de leucocitos al área lesionada. Los mediadores más importantes para la hemostasia son la fibrina y las plaquetas.

3.3.2 Fase II – Proliferativa o de granulación

Aproximadamente cuatro días después de la lesión hasta el día 8, la matriz extracelular provisional comienza a ser reemplazada por 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, la angiogénesis y la fibroplasia.

3.3.3 Fase III – Epitelización o remodelado

La remodelación consiste en el depósito de matriz permanente y los subsecuentes cambios con el tiempo aproximadamente desde el día 9 y puede durar varias semanas e incluso años. Ocurre durante todo el proceso de reparación. Una vez formado el coágulo 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.^{18,19}

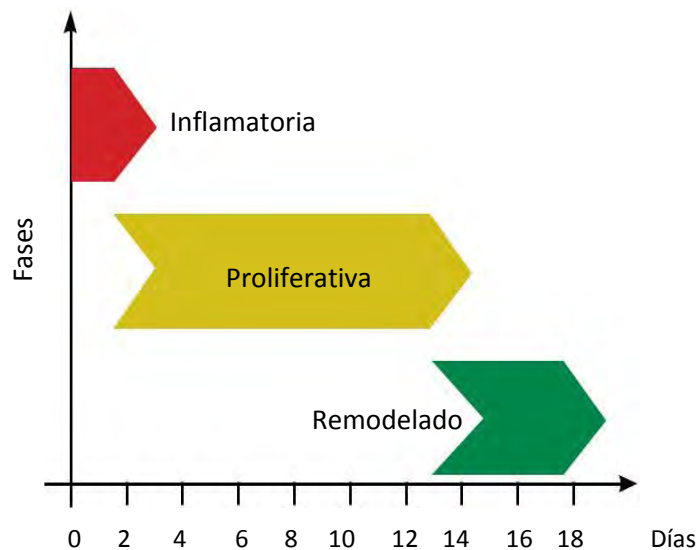


Figura 5. Fases involucradas en el proceso de la cicatrización. Tomada y modificada de Gonzalez AC et al.¹⁹

3.4 Tipos de cicatrización

La cicatrización de las heridas cutáneas es un proceso que exige la regeneración epitelial y la formación de una cicatriz de tejido conjuntivo y por eso ilustra los principios generales que se aplican a la cicatrización en todos los tejidos. Según la naturaleza y el tamaño de la herida, se dice que la cicatrización de las heridas cutáneas ocurre por primera o segunda intención.

3.4.1 Cicatrización por primera intención

Cuando la lesión afecta solo a la capa epitelial, el principal mecanismo de reparación es la regeneración epitelial, también llamada unión primaria o cicatrización por primera intención. Uno de los ejemplos más simples de este tipo de reparación es la cicatrización de una incisión quirúrgica limpia no infectada aproximada mediante suturas quirúrgicas. La incisión causa solamente una solución de continuidad de la membrana basal epitelial y muerte de relativamente pocas células. En este tipo de cicatrización consta de tres fases interconectadas: inflamatoria, proliferativa y de remodelación.

3.4.2 Cicatrización por segunda intención

Cuando la pérdida de células o tejidos es más extensa, como en heridas grandes, abscesos, úlceras o necrosis isquémica (p.e. infarto) en órganos parenquimatosos, el proceso de reparación combina regeneración y cicatrización. En la cicatrización de heridas por segunda intención también llamada unión secundaria, la reacción inflamatoria es más intensa, se desarrolla abundante tejido de granulación y se registran acumulación de matriz extracelular (MEC), formación de una cicatriz grande y contracción de la herida por acción de miofibroblastos.²⁰

3.5 Generalidades de Angiogénesis

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente.²¹ El proceso de la angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables.

La angiogénesis es un proceso normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo, también es un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral, por lo que es estrictamente regulado por diversos factores.²²

A este proceso también se denomina neovascularización. En el desarrollo de un vaso capilar nuevo ocurren cinco etapas generales (Figura 6) : primera, en ella ocurre vasodilatación en respuesta al óxido nítrico (NO), y el aumento de la permeabilidad inducido por el factor de crecimiento vascular (VEGF, por sus siglas en inglés); segunda, la descomposición proteolítica de la membrana basal de los vasos progenitores, lo que permite la formación de retoño capilar aumentando la permeabilidad; tercera, la migración de las células endoteliales debido al estímulo angiogénico; cuarta, la proliferación de células endoteliales después de las células migrantes; y finalmente una quinta, en donde existe la maduración de células endoteliales organizadas en tubos capilares estables.²³

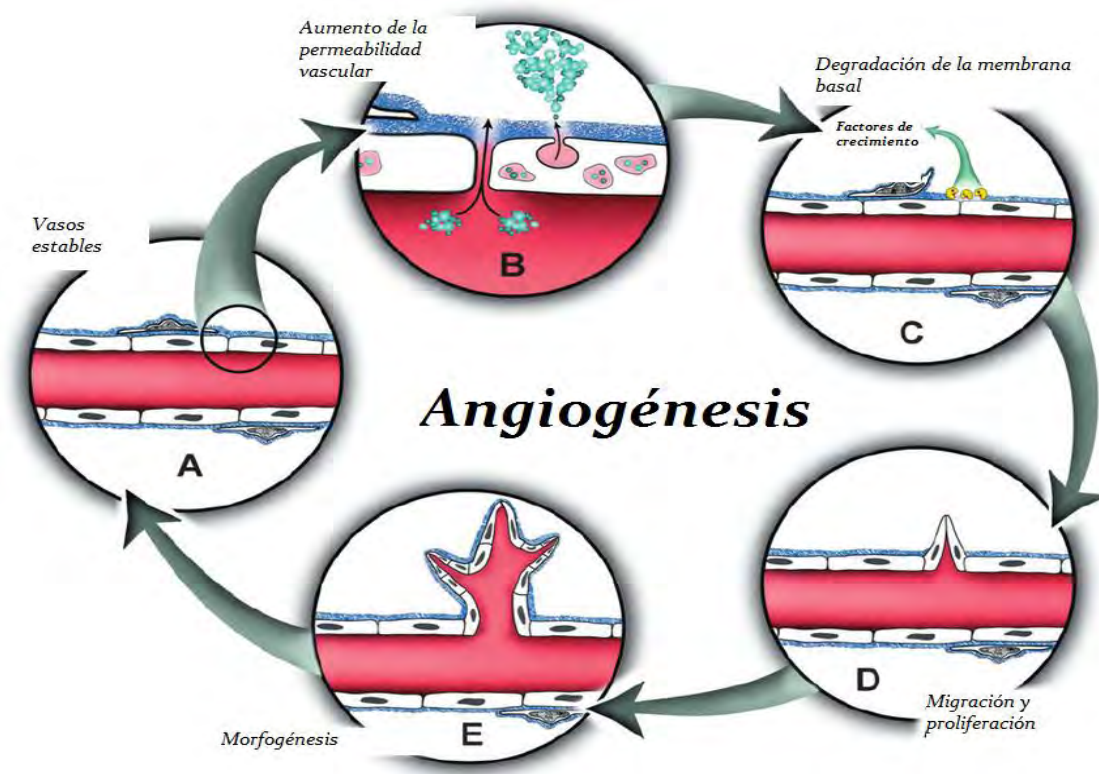


Figura 6: Etapas Principales de la angiogénesis. Tomada y modificada de Bryan AB et al.²³

3.5.1 Angiogénesis en la cicatrización

La angiogénesis es un paso fundamental en el proceso de cicatrización ya que gracias a la generación de los nuevos vasos sanguíneos, puede ocurrir la formación de tejido de granulación, debido a que estos vasos suministran al tejido en crecimiento oxígeno y nutrientes (Figura 7), además ayudan al drenado eficiente de sustancias de desecho de estas nuevas células.

En general, la vasculatura adulta permanece inactiva, pero tiene la capacidad de iniciar la angiogénesis, especialmente durante la cicatrización. En condiciones fisiológicas, la angiogénesis está finamente regulada; siendo activada por períodos cortos (días) y luego completamente inhibida. La inducción de la angiogénesis se atribuyó inicialmente al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés). Posteriormente otras moléculas se han identificado como angiogénicas, incluyendo VEGF, Factor de crecimiento β -transformante (TGF- β por sus siglas en inglés), angiogenina, angiotropina y angiopoyetina-1. Se ha reportado que la baja tensión de oxígeno y los niveles elevados de lactato y aminos bioactivas también pueden estimular la angiogénesis. Muchas de estas moléculas son proteínas que inducen la angiogénesis indirectamente al estimular la producción de FGF y VEGF ácidos o básicos por macrófagos y células endoteliales, inductores directos de la angiogénesis (Tabla 3).²⁴

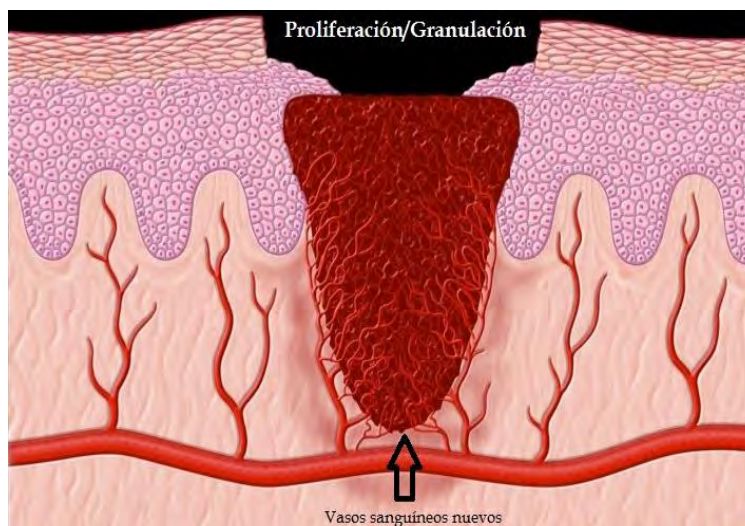


Figura 7. Angiogénesis en la cicatrización. La angiogénesis forma nuevos vasos sanguíneos para el aporte de nutrientes y oxígeno al tejido de granulación.²⁵ Tomada y modificada de <http://www.scienceofwoundhealing.org/therapeutic.php>

Tabla 3. Factores involucrados en el proceso de angiogénesis²⁶

Estimulador	Mecanismo
FGF	Promueve la proliferación y diferenciación de células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos, promueve la morfogénesis y activa rutas de señalización para la formación de nuevos capilares, induce la proteólisis de los componentes de la matriz y la producción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos
VEGF	Participa en la migración de células endoteliales, la mitogénesis, el brote y la formación de nuevos vasos sanguíneos aumentando la permeabilidad vascular
VEGFR y NRP-1	Influyen en la señalización de la angiogénesis promoviendo la supervivencia de algunas células endoteliales
Ang 1 y Ang 2	Promueve la supervivencia de las células endoteliales, además de que estabiliza a los nuevos vasos sanguíneos formados
TGF-β	Promueve la deposición de MEC y la regulación positiva del receptor de integrinas, modula la proliferación de CE, la migración y la formación de tubos capilares, además de que recluta células inflamatorias
TNF-α	Estimula del factor mitogénico de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y la interleucina-1 (IL-1) y se ha sugerido que actúa sobre las CE induciendo la diferenciación celular
CCL2	Recluta linfocitos a sitios de inflamación
Histamina	Aumenta la permeabilidad vascular mediante vasoconstricción e inhibe a la trombospondina
Integrinas $\alpha V\beta_3$, $\alpha V\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$	Enlazan macromoléculas y proteinasas de la matriz extracelular
VE-cadherina y CD31	Aumentan la producción de moléculas con capacidad de unión endotelial
Activadores de plasminógeno	Remodela la matriz extracelular, libera y activa factores de crecimiento
eNOS y COX-2	Participa en la señalización extravascular permitiendo así el aumento de la permeabilidad vascular y la degradación de la pared vascular
AC133	Regula la diferenciación de angioblastos
1D1/1D3	Regula la transdiferenciación endotelial
Semaforinas clase 3	Modula la adhesión, migración, proliferación y apoptosis de las células endoteliales, además altera la permeabilidad vascular

3.5.2 Modelos para la evaluación de angiogénesis

Existen diferentes ensayos para la evaluación de la angiogénesis, cada uno con distintas ventajas y con algunas limitaciones (Tabla 4). La mayoría de los estudios sobre inductores e inhibidores angiogénicos se basan en modelos, tanto *in vitro*, *in vivo* e *in ovo*, ya que estos modelos suelen ser eficaces. Los ensayos de angiogénesis son herramientas útiles para evaluar la eficacia de los agentes pro y antiangiogénicos, porque proporcionan un control sobre el microambiente. El desarrollo de procedimientos no invasivos para la cuantificación de la angiogénesis facilita este proceso de manera significativa.

Tabla 4: Métodos de evaluación de la angiogénesis.

Métodos <i>In vivo</i>	Métodos de evaluación <i>In vitro</i>		Método de evaluación <i>In ovo</i>
	Ensayos de cultivo celular	Ensayos de cultivo de órganos	
Ensayo de implantación de esponja en ratón	Ensayo de formación de cordones o bucles	Ensayo en anillo aórtico	Ensayo en Membrana Corioalantoidea de pollo (CAM)
Ensayo de tapón de Matrigel en ratón	Formación de túbulos	Ensayo en arco aórtico de pollo	
Ensayo de angiogénesis en córnea de rata	Ensayo de migración de células		
Modelo de saco de aire dorsal en ratón	Ensayo de proliferación de células		
Ensayo de fluorescencia en zebrafish	Zimografía en gelatina		
Tomada y modificada de Almaki et al. ²⁷			

Los métodos de evaluación *in vitro* de la angiogénesis son de gran importancia y pueden practicarse en un corto período de tiempo y proporcionan un resultado preciso y confiable de la angiogénesis si se cuantifican minuciosamente y adecuadamente.

Las pruebas *in vivo* para la angiogénesis no son fáciles de realizar y toman más tiempo que las pruebas *in vitro*, por lo que se realizan muy pocas pruebas a la vez.

El proceso de cuantificación también es más complicado. Sin embargo, estos ensayos son comparativamente mejores que el modelo *in vitro* debido a la naturaleza compleja de las respuestas vasculares a las sustancias de prueba.

La gran ventaja del ensayo *in ovo* es que al igual que los ensayos *in vivo* se emplea un organismo completo con todas sus respuestas fisiológicas pero con la gran ventaja de que no se utiliza métodos invasivos, la cuantificación suele ser rápida y precisa, además que el método es rápido y sencillo de realizar.²⁷

3.5.3 Sustancias con propiedades angiogénicas

La angiogénesis ha tomado gran importancia en los últimos años en la medicina, pues su aplicación terapéutica implica la búsqueda de sustancias químicas que disminuya o aumente este proceso para el tratamiento de diferentes patologías. Existen moléculas sintetizadas o aisladas de productos naturales que poseen propiedades pro y antiangiogénicas donde sus mecanismos de acción están estudiados. (Tabla 5)

Tabla 5. Sustancias con actividad angiogénica

Sustancia	Actividad	Mecanismo
Ácido acetilsalicílico	Anti-angiogénica	Inhibe la COX-2, con ello la síntesis de prostaglandinas H2 y Tromboxano A (2), disminuyendo la producción de VEGF. ²⁸
Histamina	Pro-angiogénica	Activa receptores H1, aumentando así la permeabilidad vascular y la producción de VEGF y TGF-β, disminuye la síntesis de trombospondina ^{29,30}
Resveratrol (Aislado de <i>Vitis spp</i>)	Pro-angiogénica	Aumenta la producción de VEGF y Flk-1
Pirfenidona	Anti-angiogénica	Inhibe la producción de VEGF-α
Ginsenósido <i>Rb1</i> (Aislado de <i>Panax ginseng</i>)	Anti-angiogénica	Inhibe la producción de VEGF ³¹
β-sitosterol (aislado de <i>Aloe vera</i>)	Pro-angiogénica	Estimula la angiogénesis mediante la producción de VEGF y aumento de sus receptores, además de laminina ³²

4. Planteamiento del problema

La cicatrización es un evento fisiológico importante del cual depende la integridad de la piel y mucosas que proporcionan protección al organismo. De manera fisiológica, la cicatrización incluye diversas etapas que son controladas de forma estricta, donde el proceso de angiogénesis juega un papel central. Los efectos de una cicatrización no apropiada incluyen desde cicatrices poco estéticas, hasta la pérdida de alguna extremidad por falta de sensibilidad y riego sanguíneo. Dentro de la medicina tradicional mexicana, la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) ha sido utilizada como agente cicatrizante de heridas desde 1791, sin embargo, no existe evidencia científica documentada en la que se haya demostrado la efectividad de esta planta y de sus metabolitos como agentes cicatrizantes.

Por lo que se consideró importante aislar a los ácidos masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico y anacárdicos de la corteza de Cuachalalate para evaluar la actividad cicatrizante de los mismos en un modelo *in vivo* de herida por escisión en rata Wistar, así como la actividad angiogénica en el modelo CAM en embrión de pollo y, de esta manera sustentar científicamente el uso tradicional que se le ha dado a la corteza de Cuachalalate.

5. Hipótesis

Los ácidos masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico y anacárdicos aislados de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) actuarán como agentes cicatrizantes a través de la estimulación de la angiogénesis en la fase proliferativa en ratas.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto cicatrizante y angiogénico de los ácidos masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico y anacárdicos aislados de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en un modelo murino de cicatrización y en el modelo de membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo.

6.2 Objetivos particulares

- Aislar y purificar los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos a partir de la corteza de Cuachalalate (*A. adstringens*).
- Caracterizar los compuestos obtenidos a partir de la corteza de Cuachalalate (*A. adstringens*) por medio de métodos espectroscópicos y de rayos x.
- Estandarizar el método para evaluar la cicatrización en el modelo de herida por escisión en rata Wistar.
- Estandarizar el método para evaluar la angiogénesis en el modelo de membrana corioalantoidea en embrión de pollo (CAM).
- Evaluar la cicatrización de los compuestos en estudio en el modelo de herida por escisión en rata Wistar.
- Evaluar la angiogénesis de los compuestos en estudio en el modelo de membrana corioalantoidea en embrión de pollo (CAM).

7. Material y método

7.1 Material

Material vegetal

La corteza seca y molida de Cuachalalate utilizada para el estudio, fue donada por Laboratorios Mixim S.A de C.V el 29 de julio de 2016, y se almacenó a temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$) hasta su procesamiento.

Fármacos y reactivos

Los ácidos 3α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos se aislaron de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) de acuerdo con metodologías previamente descritas.^{8,9,10} La pirfenidona fue donada por el laboratorio farmacéutico CellPharma S.A. de C.V. El propilenglicol, cloruro de sodio, ácido acetilsalicílico, cloruro de benzalconio, histamina y los discos estériles de acetato de metilcelulosa fueron adquiridos en Sigma-Aldrich®. Los disolventes utilizados para las maceraciones y reflujos durante la experimentación como el etanol, diclorometano, acetato de etilo y metanol fueron adquiridos en JT Baker®. Se utilizó una solución de Pentobarbital sódico para uso veterinario de la marca Pisabental®.

Equipos y aparatos

Incubadora Riossa® E-33; campana de flujo laminar Telstar Mini-V/PCR®; esmeril rotatorio de 2 velocidades Dremel® provisto de fresas cortadoras y de discos de esmeril; microscopio digital de mano Celestron 44302A; biopsiador-sacabocado de 5 mm de diámetro Miltex®; navajas rasuradoras y aparato de Fischer-Jones.

Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar de 170 a 200 g de peso provenientes de ENVIGO México S.A de C.V., las cuales se mantuvieron a temperatura constante de $22 \pm 1^{\circ} \text{C}$ con libre acceso a agua y alimento, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Todos los animales fueron tratados cumpliendo con las normas Internacionales y acorde a la Norma Oficial Mexicana (NOM- 062- ZOO-1999) para la producción, cuidado y

uso de animales de laboratorio; además de haberse aprobado el protocolo por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM el cual está asentado en el documento OFICIO/FQ/CICUAL/200/17 (anexo 1).

Se utilizaron embriones de pollo de Bovans white de tres días de desarrollo adquiridos en el CEIEPAV (Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, estos se encontraban aptos para su manejo y experimentación de acuerdo al documento FMVZ001 (anexo 2).

7.2 Metodología

7.2.1 Extracción, aislamiento y purificación de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*)

Se colocaron en un sistema de reflujo setecientos gramos de corteza seca y molida de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) utilizando 2.5 L de diclorometano durante 4 horas, operación realizada por triplicado, obteniéndose después de eliminar el disolvente 59.4 g de extracto crudo que corresponde a un 8.49% de rendimiento con respecto a la corteza seca. Cuarenta gramos de este extracto se adsorbió en 40 g de gel sílice y se preparó una columna con 600 g de gel de sílice en una relación 1:10, el volumen de cambio fue de 750 mL y cada fracción recolectada fue de 125 mL. Se recolectaron 120 fracciones, eluidas sucesivamente con hexano, mezcla de hexano-acetato de etilo (9:1; 8:2 y 7:3) y metanol. Cada fracción se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. Se reunieron las fracciones con perfiles cromatógrafos similares. La presencia de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico fue monitoreada con una referencia por CCF, a las fracciones donde se encontraban estos compuestos se cristalizaron disolviendo la mínima cantidad de metanol caliente y posterior goteo de hexano frío. Los cristales de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico se analizaron por punto de fusión y comparación física con una referencia. La pureza

de estos compuestos se realizó mediante HPLC siguiendo metodologías anteriormente descritas.^{33, 34} Los ácidos anacárdicos se obtuvieron de las fracciones eluidas con hexano: acetato de etilo en proporción 8:2 y se comprobó su identidad por RMN de ¹H.

7.2.3 Caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*)

Una muestra de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos aislados y previamente purificados, se diluyeron en cloroformo deuterado y se determinaron sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (400 MHz) y ¹³C (100 MHz) [**Anexo 3**], en las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM, en un espectrómetro de RMN de 9.4 T marca Varian modelo VNMRS. Sonda Broad Band Switchable de dos canales de radiofrecuencia (¹H) (³¹P/¹⁵N).

Para la cristalografía de rayos X se analizaron 2 cristales de tamaño homogéneo, de forma regular y libre de disolvente con una pureza relativa mayor de 98%. Se utilizó un difractómetro de rayos X de monocristal Oxford Gemini ($\lambda_{\text{MOKA}} = 0.71073$ ó $\lambda_{\text{MOKA}} = 1.5418$ Å) con un detector de área de 135 mm Atlas, equipado con un sistema criogénico Cryojet. La prueba se realizó a una temperatura de 130 °K. Las estructuras de los ácidos triterpénicos se confirmaron mediante la comparación con las estructuras teóricas descritas en literatura.¹

7.2.4 Método para la evaluación de la cicatrización en ratas Wistar

7.2.4.1 Formación de las lesiones

Se utilizaron ratas Wistar macho previamente anestesiadas con pentobarbital sódico (45 mg/Kg, i.p.) a las cuales se le humedeció el dorso con solución de cloruro de benzalconio al 10% y se les rasuro totalmente la región dorsal de la espalda, asegurándose de que no quedara residuos de pelo en la zona.

Posteriormente se realizaron dos escisiones de 0.5 cm² en ambos lados de la región dorsal de la espalda al mismo nivel a través del panículo carnoso con ayuda de un biopsiador-sacabocado Miltex® (Figura 8).

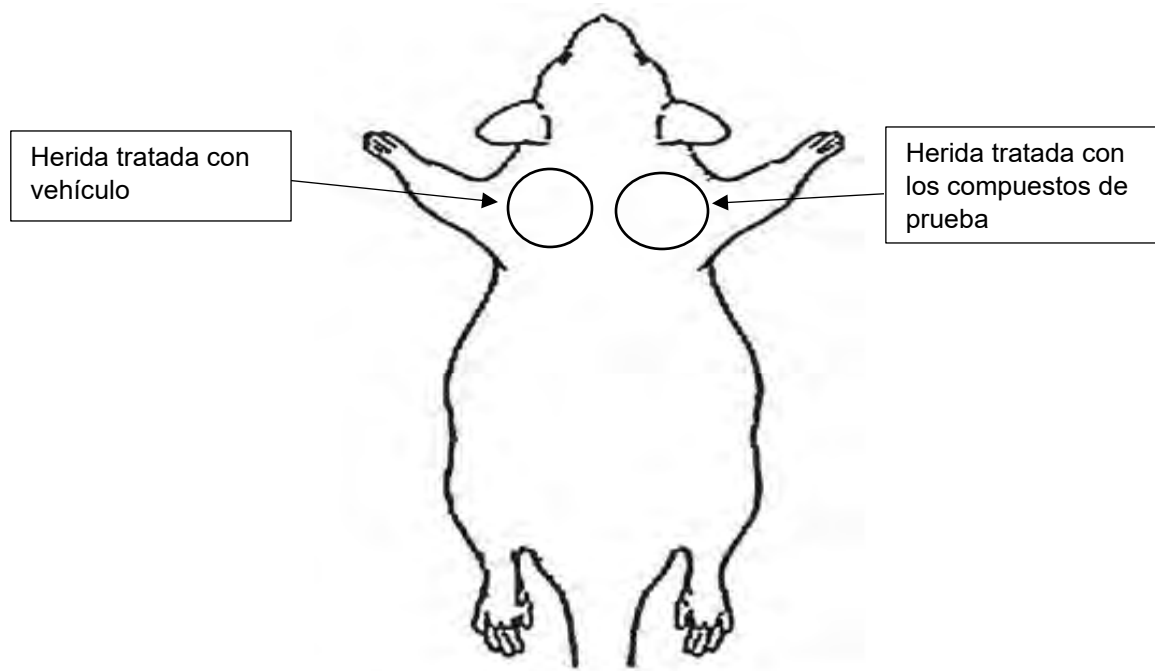


Figura 8: Esquema de la parte dorsal de rata Wistar para aplicación de sustancias.

7.2.4.2 Evaluación de la actividad cicatrizante de los ácidos purificados obtenidos de corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*)

Se formaron grupos de 6 animales experimentales, a los cuales se aplicaron los tratamientos por vía tópica en una solución de propilenglicol-etanol (90:10) en una concentración de 300 µg/herida de acuerdo a la Tabla 6.

Tabla 6. Grupos para la evaluación de los ácidos purificados obtenidos de corteza de Cuachalalate (<i>Amphipterygium adstringens</i>).		
Grupo de prueba	Grupos control	Grupo testigo ^{35,36}
Ácido 3 α -hidroximasticadienónico	Solución propilenglicol-etanol (90:10)	Pirfenidona
Ácido masticadienónico	NAIVE (curso normal de la cicatrización)	
Ácidos anacárdicos		
Mezcla de ácidos (3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos 1:1:1)		
Extracto hidroalcohólico		
n= 6 animales por grupo		

Se aplicó el tratamiento correspondiente en la herida diariamente durante 15 días (tiempo en que se desarrollan las distintas fases de la cicatrización). Se midió el área de lesión cada 24 horas por medio de imágenes tomadas con un microscopio Celestron 44302-A y analizadas con el programa ImageJ. Posteriormente los datos se sometieron a análisis estadístico con ayuda del programa GraphPadPrism 7 para identificar diferencias significativas con los distintos tratamientos.

7.3 Método para la evaluación de la angiogénesis (Modelo CAM)

A huevos embrionados de 3 días de desarrollo se les realizó una técnica de asepsia y antisepsia con una solución de etanol al 70% dentro de una campana de flujo laminar. Se realizó un pequeño orificio en el polo agudo del huevo (cuidando de no perforar la yema) por el cual se retiró 4 mL de albúmina con ayuda de una jeringa hipodérmica con aguja 26G. Posteriormente se marcó una ventana de 2.5 cm x 2.5 cm en el cascarón y se cortó cuidadosamente usando un esmeril de rueda ancha, se retiró la ventana con ayuda de una pinzas previamente sumergidas en etanol al 70%, finalmente la ventana se tapó con tela adhesiva. Los huevos se incubaron

hasta el día 10 de desarrollo del embrión, transcurridos esos días se abrió la ventana nuevamente y se colocó un disco de metilcelulosa estéril de 0.5 mm de diámetro con 30 µg de los tratamientos respectivos: ácido 3α-hidroximasticadienónico, masticadienónico, anacárdicos y mezcla de estos (1:1:1), además de tres grupos testigos: histamina 5.6 µg (proangiogénico), ácido acetilsalicílico 9 µg y pirfenidona 9.2 µg (antiangiogénico), se tapó la ventana nuevamente y se incubaron hasta el día 12 de desarrollo del embrión. Al llegar el día 12 se hizo el registro visual mediante la toma de una fotografía con ayuda del microscopio Celestron 44302-A, a la cual se evaluó la angiogénesis con ayuda del programa ImageJ® siguiendo el método cualitativo de “análisis de ramificación de vasos sanguíneos” descrito por Barnhill RL y colaboradores.³⁷ Que brevemente consiste en la cuantificación de las ramificaciones de los vasos sanguíneos que convergen del disco en una distancia de 1 mm de diámetro, la determinación se realiza mediante una escala que va de cero a dos.(Figura 9)

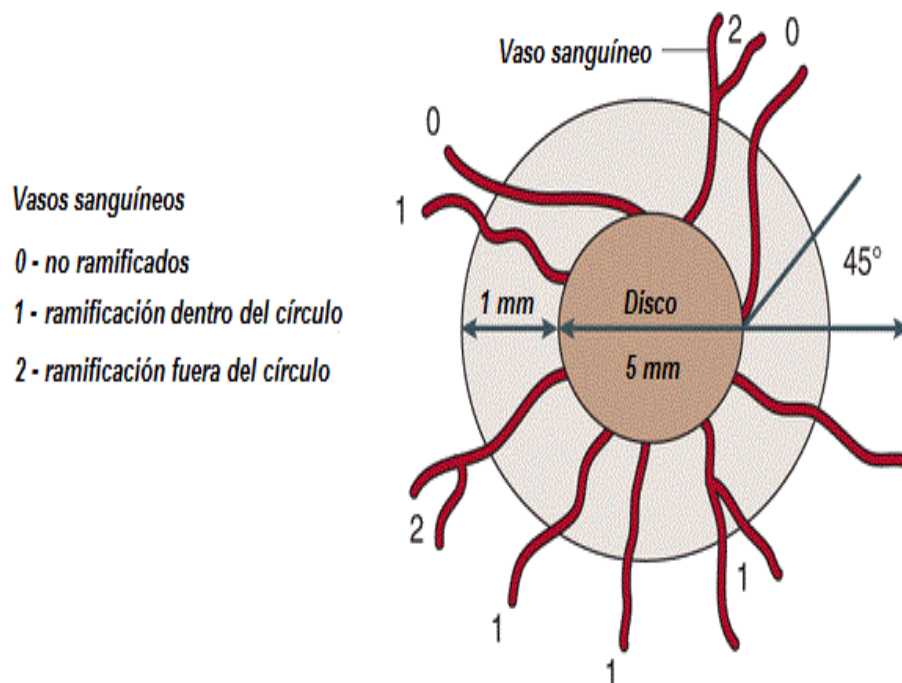


Figura 9. Método de cuantificación de la respuesta angiogénica en el modelo CAM de embrión de pollo mediante escala cualitativa. Tomado y modificado de Ribatti D. et al.³⁸

8. Resultados

8.1 Extracción y aislamiento de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos

La mezcla de ácidos anacárdicos se aislaron de la fracción 10 a la 28 eluidas con hexano: acetato de etilo en proporción 8:2 se obtuvo 25.8 g de un aceite amarillento denso. El ácido masticadienónico se aisló a partir de la fracción 35 a la 47 eluida con hexano: acetato de etilo en proporción 7:3, se obtuvo 1.4 g de cristales con punto de fusión de 178-180° C y una pureza cromatográfica del 98.45%. El ácido 3 α -hidroximasticadienónico se aisló de la fracción 50 a la 69 eluidas con hexano: acetato de etilo en proporción 7:3, se obtuvo 3.9 g de cristales amorfos con un punto de fusión de 146-148° C con una pureza de 98.96%.

8.2 Caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos

Se realizó la espectroscopia de los compuestos aislados para su identificación. Los espectros de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C de una dimensión se encuentran en el anexo 3 de este trabajo y corresponden con los reportados previamente^{1,8,39}. Las estructuras de los ácidos triterpenicos se muestran en la Figura 10.

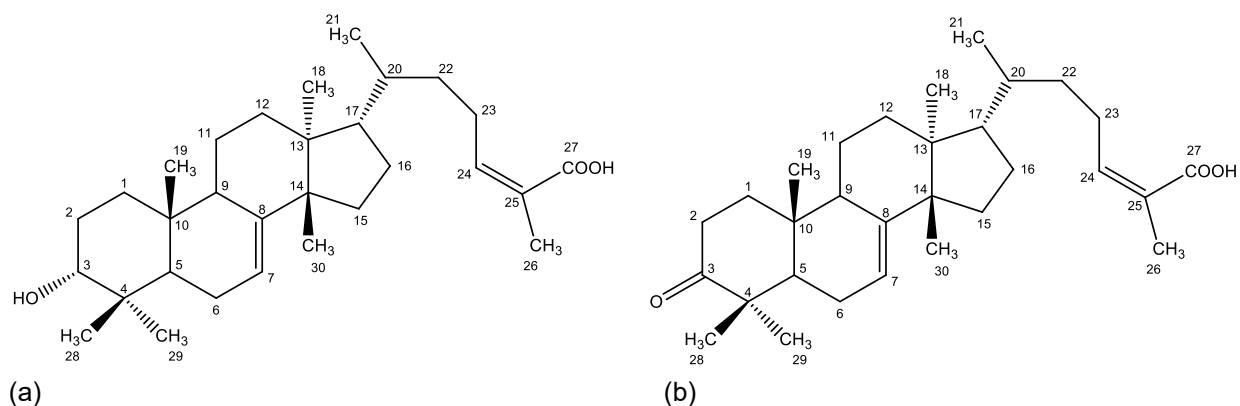


Figura 10. Estructuras del (a) ácido 3 α -hidroximasticadienónico: Ácido (13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3 α -hydroxylanosta-7,24-dien-26-oico y (b) del ácido masticadienónico: Ácido (13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3-Oxolanosta-7,24-dien-26-oico

La asignación completa de señales para ambos compuestos de RMN de ^1H y ^{13}C se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7: Asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C para los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico				
	Ácido masticadienónico		Ácido 3 α -hidroximasticadienónico	
Posición	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)
1	24.52	2.12 (m)	23.89	1.96 (m)
2	38.69	2.75 (td, J=14.5, 5.5 Hz)	36.27	2.56 (m)
		2.45 (td, J=15.4, 7.0 Hz)		2.44 (dt, J= 15.2, 6.9 Hz)
3	217.09	-	76.32	3.47 (t, J= 2.8 Hz)
4	36.21	-	35.65	-
5	52.50	1.73 (m)	48.63	2.34 (dd, J= 8.7, 5.1 Hz)
6	18.32	1.64 (m)	17.96	1.49(m)
7	117.96	5.30 (dd, J = 3.2 Hz)	117.82	5.25 (d, J= 3.5 Hz)
8	147.31	-	147.09	-
9	34.21	1.52 (m)	31.21	1.41 (m)
10	48.03	-	43.20	-
11	28.36	1.96 (m)	28.18	1.92 (m)
12	35.13	2.12 (m)	33.98	1.49 (m)
13	43.69	-	37.50	-
14	51.35	-	51.25	-
15	35.03	2.12 (m)	33.78	1.63 (m)
16	48.64	2.35 (m)	44.53	1.78 (m)
17	53.04	1.53 (m)	52.80	1.49 (m)
18	22.12	0.78 (s)	21.82	0.77 (s)
19	21.76	1.09 (s)	26.90	0.93 (s)
20	33.80	1.87 (m)	25.40	2.02 (m)
		1.92 (d, J= 1 Hz)		1.93 (d, J= 7.3 Hz)
21	18.62	0.89 (m)	18.22	0.89 (m)
22	35.80	1.56 (m)	34.65	1.11 (m)
		1.16 (m)		-
23	27.07	2.57 (m)	27.10	2.56 (m)
		2.41 (m)		2.44 (dt, J= 15.2, 6.9 Hz)
24	146.12	6.08 (dd, J = 7.4, 1.1 Hz)	146.10	6.08 (dd, J = 7.3, 6.4 Hz)
25	125.92	-	125.62	-
26	20.71	2.09 (m)	20.53	2.02 (m)
27	172.85	-	172.50	-
28	24.62	0.93 (s)	21.80	0.84 (s)
29	12.96	0.81 (s)	12.97	0.77 (s)
30	27.58	0.97 (s)	27.76	0.94 (s)

Adicionalmente a los compuestos tritéricpenicos se les realizó difracción de rayos X de monocristal con el programa ORTEP esto con la finalidad de conocer las estructuras (**Figura 11 y 13**) y el empaquetamiento de las moléculas en la red cristalina (**Figura 12 y 14**) que forman una celda unitaria para dichos compuestos, por primera vez se logró determinar estas estructuras para los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico, ya que previamente se reportó la difracción de rayos X del derivado metilado del ácido masticadienónico.⁴⁰

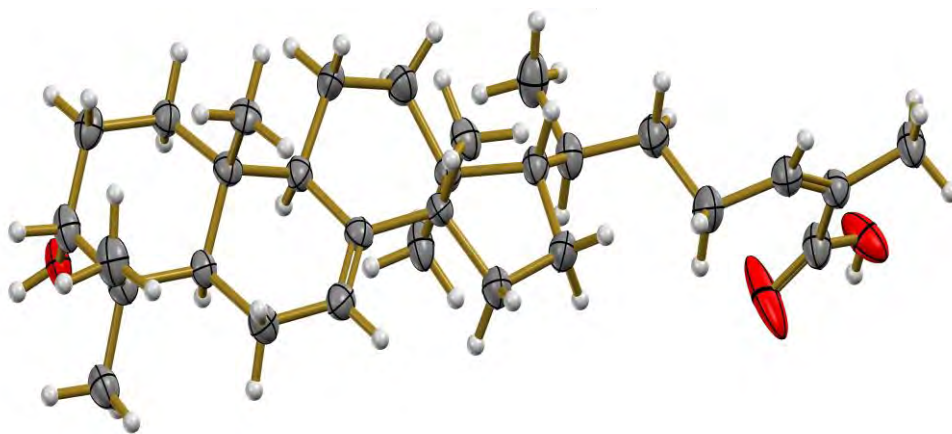


Figura 11. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido 3 α -hidroximasticadienónico que muestra su conformación molecular. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

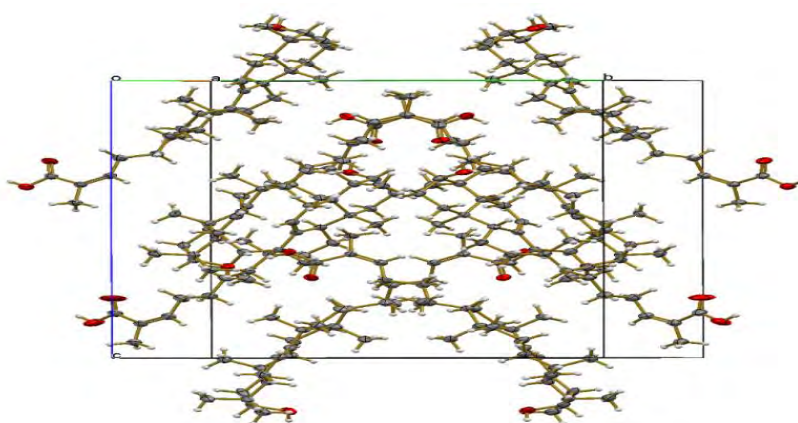


Figura 12. Perspectiva del empaquetado de moléculas del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en la celda unitaria. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

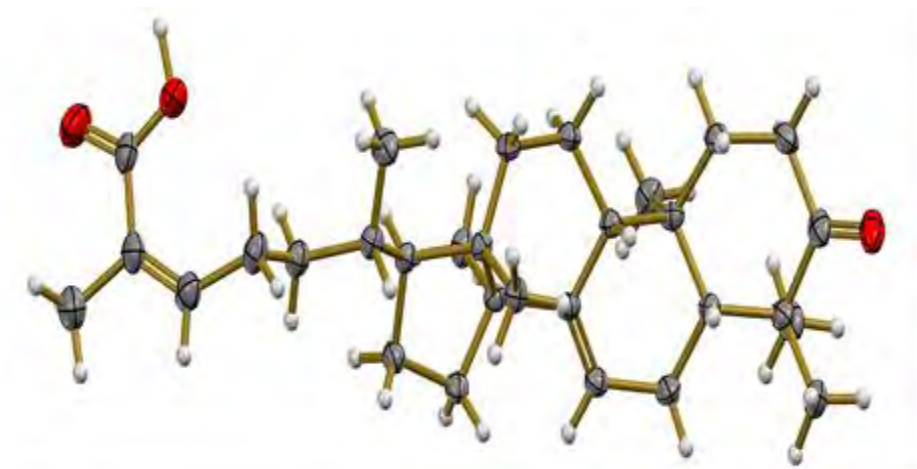


Figura 13. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido masticadienónico que muestra su conformación molecular. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

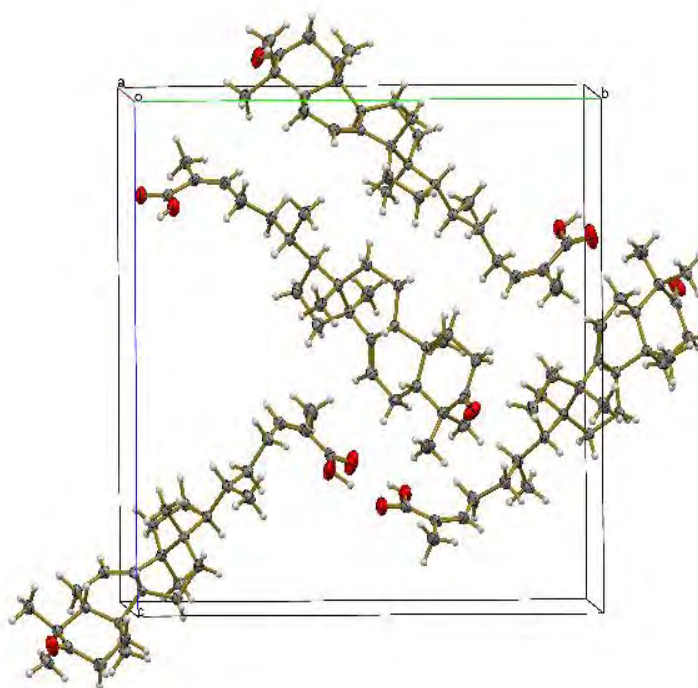


Figura 14. Perspectiva del empaqueo de moléculas del ácido masticadienónico en la celda unitaria. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos

8.3 Evaluación del efecto cicatrizante de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos

Se realizaron los cursos temporales abarcando las tres fases de la cicatrización: fase I – inflamatoria (días 0-3), fase II – proliferativa (días 4-8) y fase III – epitelización (días 9-15), se comparó día por día en el gráfico para obtener las diferencias significativas en ellas, cada una de las gráficas que aparecen a continuación se muestra el porcentaje de cicatrización (también llamado porcentaje de cierre) de la herida durante los 15 días del tratamiento, este porcentaje fue determinado mediante la fórmula mostrada en la figura 15.

$$\% \text{ cicatrización de la herida} = \frac{\text{Área inicial de la herida (cm}^2\text{)} - \text{Área final (cm}^2\text{)}}{\text{Área inicial de la herida (cm}^2\text{)}} \times 100$$

Figura 15. Fórmula para la determinación del porcentaje de cicatrización de la herida por escisión de rata Wistar. Los datos graficados fueron obtenidos mediante esta fórmula y fueron trazados con sus respectivos días en la cual se tomó la fotografía. Los datos representan la media para 6 animales de cada grupo.

En la Figura 16 se presenta el porcentaje de cicatrización durante 15 días del tratamiento del grupo NAIVE y del control, en esta gráfica se observa que no existe diferencia significativa en ninguno de los días entre estos dos tratamientos, por lo que se corrobora que el vehículo utilizado no altera el transcurso normal de la cicatrización, aumentándola o disminuyéndola y que la respuesta cicatrizante se deberá únicamente a los tratamientos aplicados.

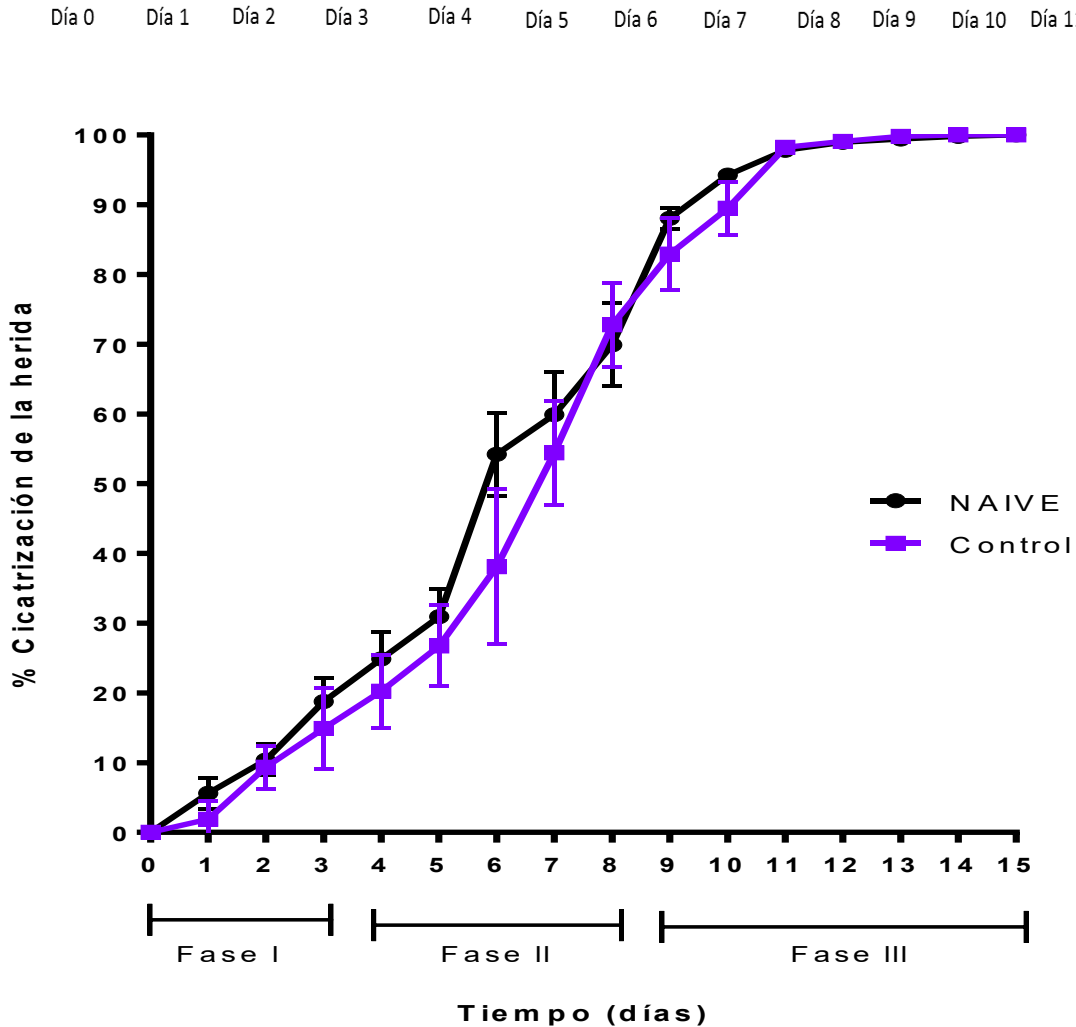
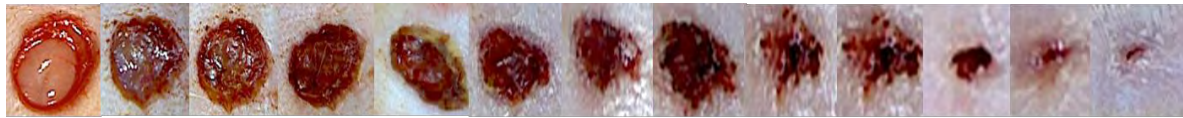


Figura 16. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de la cicatrización tratadas con vehículo y el grupo NAIVE. Los datos representan la media \pm EEM para 6 animales de cada grupo. En la parte superior se representa el proceso de cierre natural de la herida (NAIVE) del día cero al día doce.

En la Figura 17 muestra el porcentaje de contracción de la herida durante las 3 fases de la cicatrización de los animales tratados con pirfenidona en comparación con el control, en esta gráfica se observa que existe una diferencia significativa en el día 2 y 3 de la fase I (inflamatoria) con un porcentaje de cicatrización de 32.8 y

40.87% respectivamente, el control muestra un 9.36 y 14.9% para los mismos días. En los días 4 hasta el día 7 de la fase II (proliferativa), también se observó efecto significativo ya que para los animales tratados con pirfenidona los porcentajes de cicatrización fueron de 51.58, 67.40, 77.21, 86.63% respectivamente, por otro lado los porcentajes de cicatrización para el control fueron de 20.25, 26.75, 38.12, 54.41%.

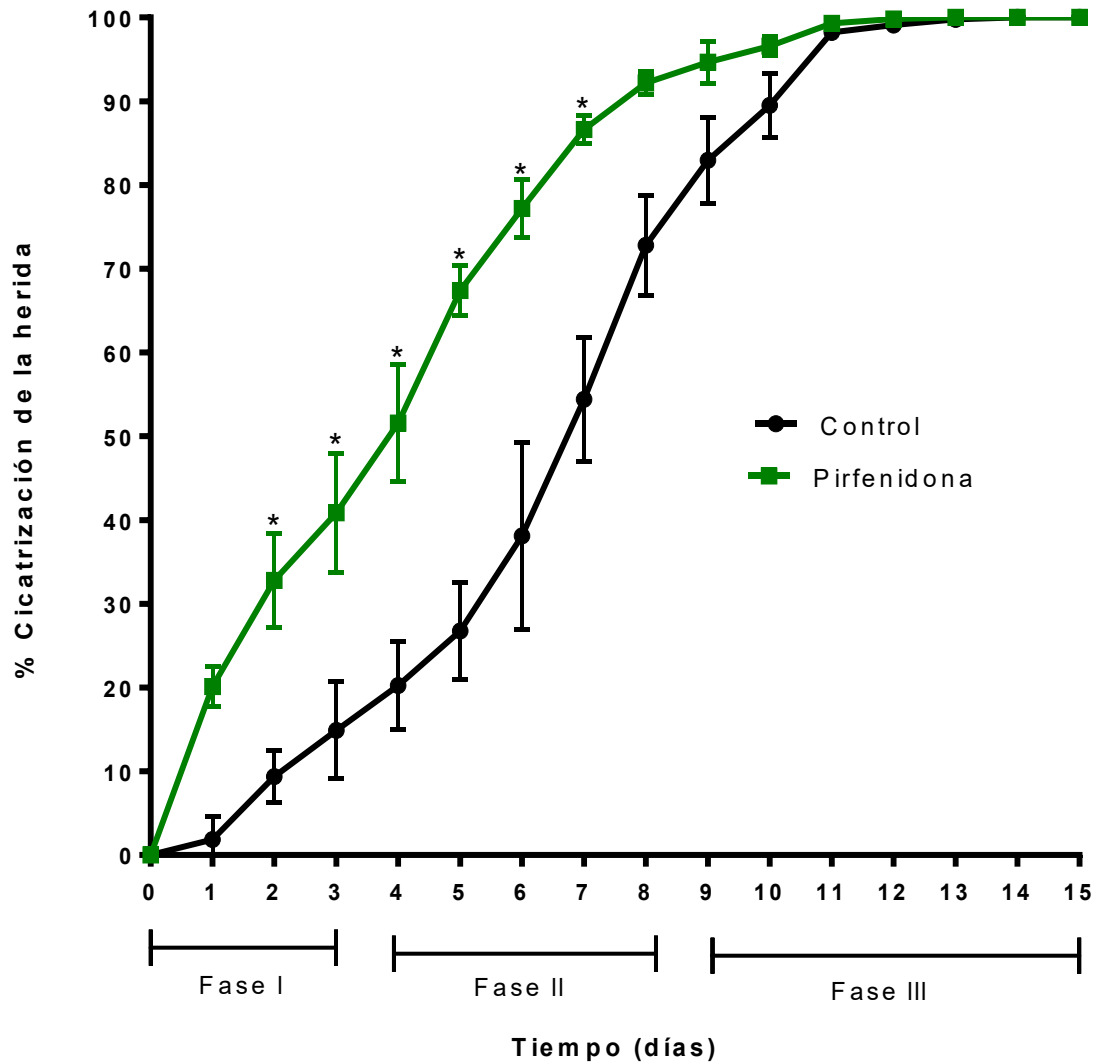


Figura 17. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de la cicatrización tratadas con pirfenidona (fármaco de referencia) y el control. Los datos representan la media \pm EEM para 6 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ con respecto al control aplicando un análisis de varianza de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey.

En la Figura 18 se observa el porcentaje de contracción de la herida durante las 3 fases de la cicatrización con el extracto hidroalcohólico en comparación con el control, en esta gráfica se puede observar que el extracto aumenta ligeramente el porcentaje de cicatrización pero no de forma significativa.

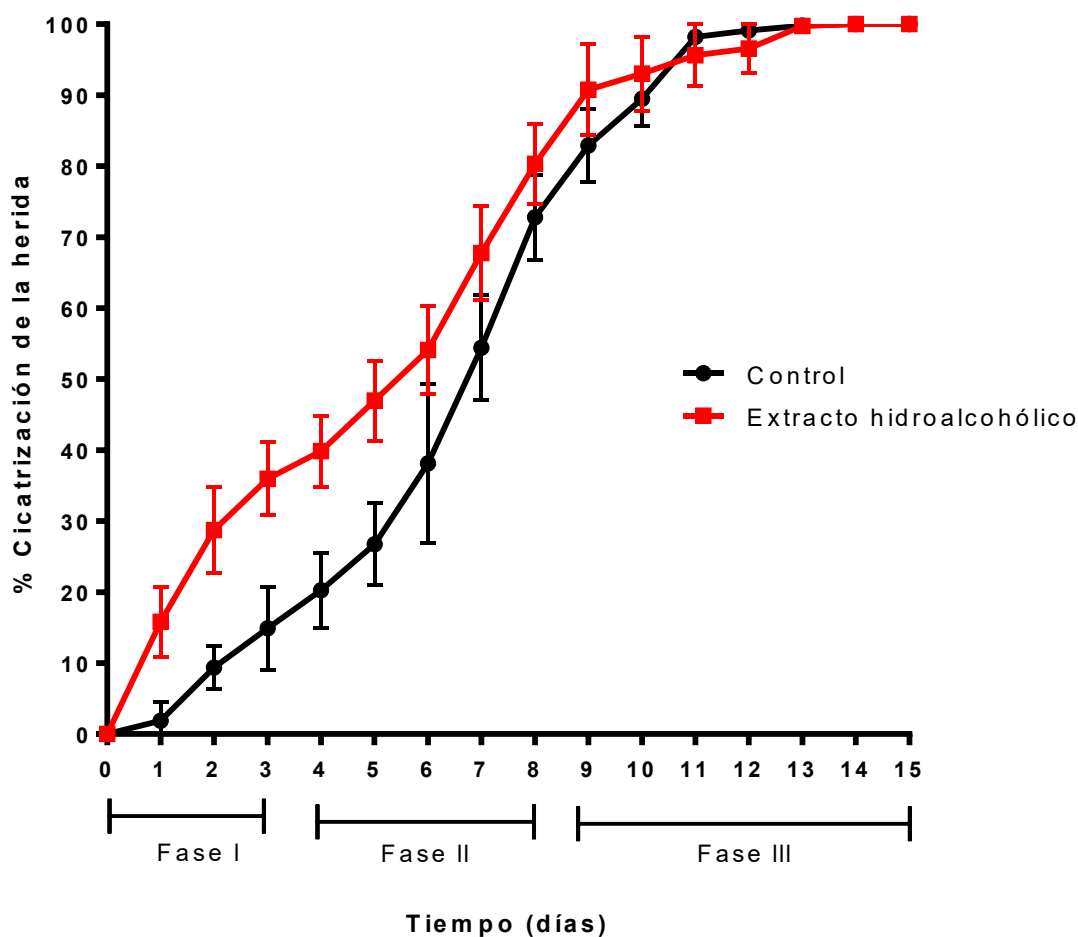


Figura 18. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar tratadas con extracto hidroalcohólico y el control durante las 3 fases de la cicatrización. Los datos representan la media \pm EEM para 6 animales de cada grupo.

En la Figura 19 se observa el porcentaje de contracción de la herida en las 3 fases de la cicatrización del ácido 3 α -hidroximasticadienónico comparado con el control, en ella se puede apreciar una diferencia significativa desde el día 3 hasta el día 7, abarcando así el último día de la fase inflamatoria hasta el penúltimo día de la fase proliferativa, los porcentajes de cicatrización para estos puntos fueron de 41.81,

43.94, 53.34, 65.64 y 79.13% respectivamente, en cambio los porcentajes para el control en los mismos días fueron de 14.90, 20.25, 26.75, 38.12 y 54.42%.

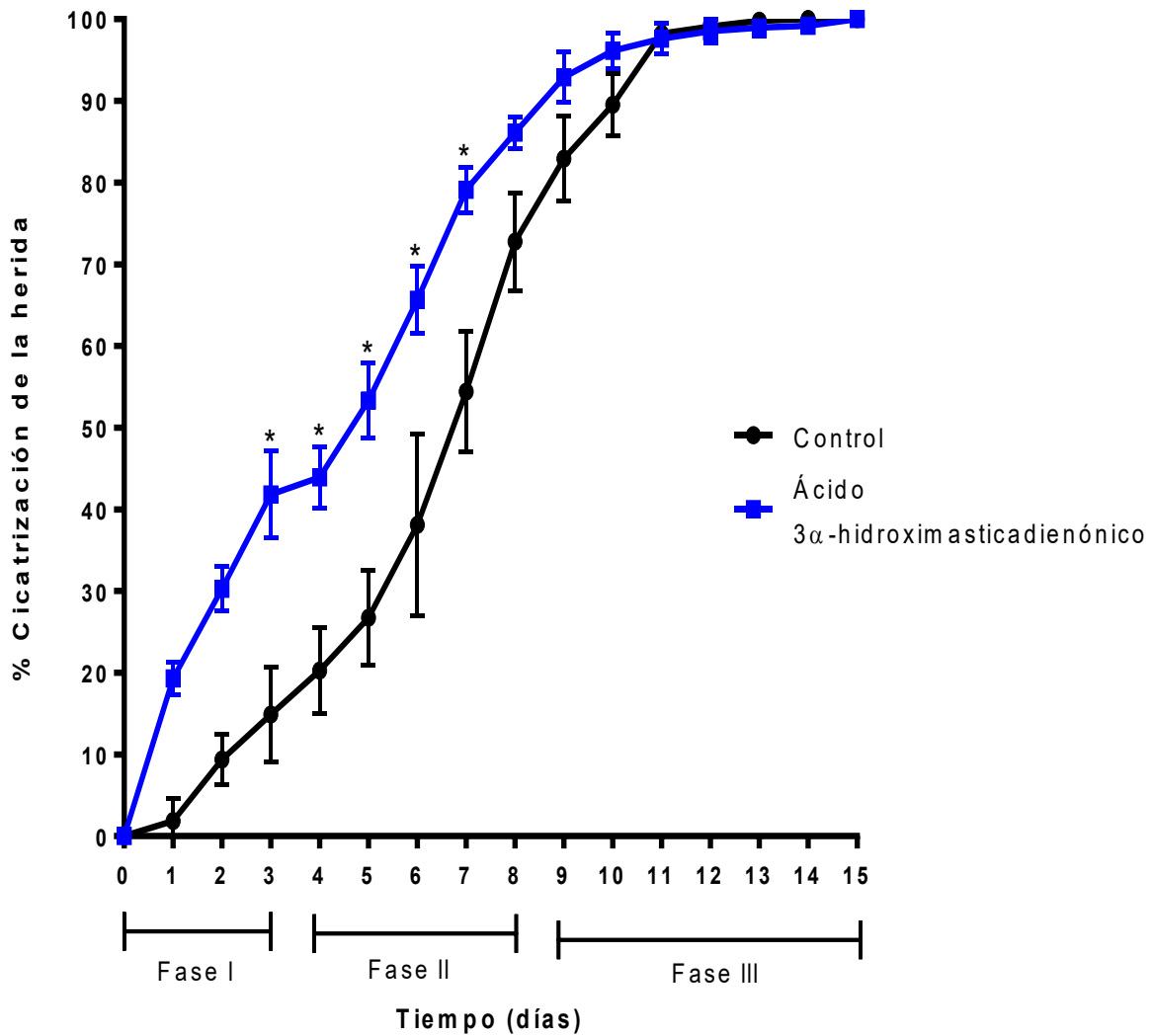


Figura 19. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar tratadas con ácido 3α-hidroximasticadienónico y el control durante las 3 fases de la cicatrización. Los datos representan la media ± EEM para 6 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ con respecto al control aplicando un análisis de varianza de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey.

La Figura 20 muestra el porcentaje de cicatrización en el transcurso de 15 días de las ratas tratadas con ácido masticadienónico en comparación con el control, en esta gráfica no existe diferencia significativa en ningún punto entre estos dos tratamientos por lo que no favorece el proceso de cicatrización.

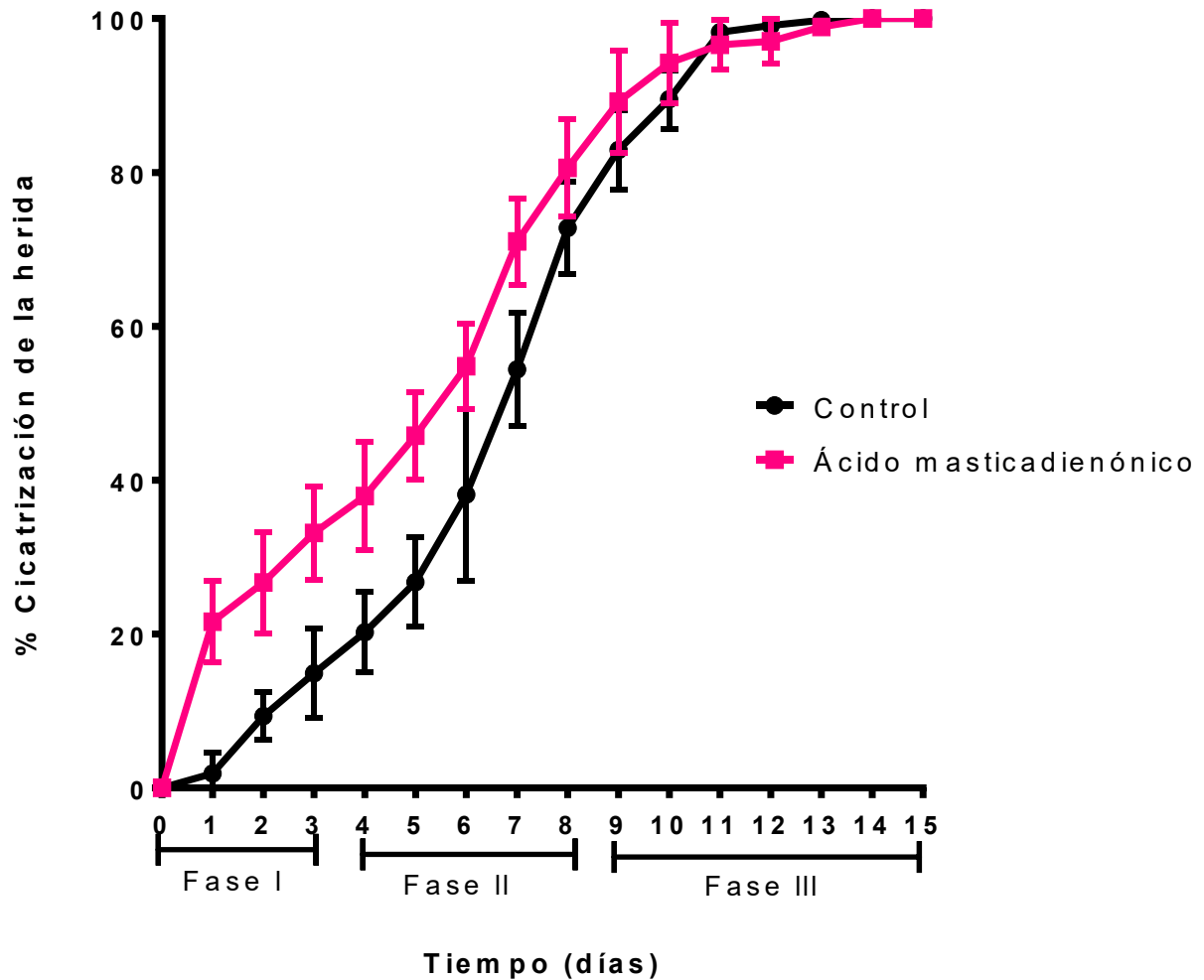


Figura 20. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de cicatrización tratadas con ácido masticadienónico y el control. Los datos representan la media \pm EEM para 6 animales de cada grupo.

En la Figura 21 se observa el porcentaje de contracción de la herida durante las 3 fases de la cicatrización de los animales tratados con ácidos anacárdicos en comparación con las tratadas con vehículo, en esta gráfica se puede observar que estos compuestos poseen actividad cicatrizante en la fase II de la cicatrización empezando desde el día 5 hasta el 7 con una diferencia significativa en estos puntos. Los porcentajes de cicatrización para los ácidos anacárdicos fueron 56.31, 65.55 y 80.49% respectivamente para los días 5,6 y 7, por otra parte los porcentajes de cicatrización para estos mismos días en el control fueron 26.75, 38.12, 54.41%.

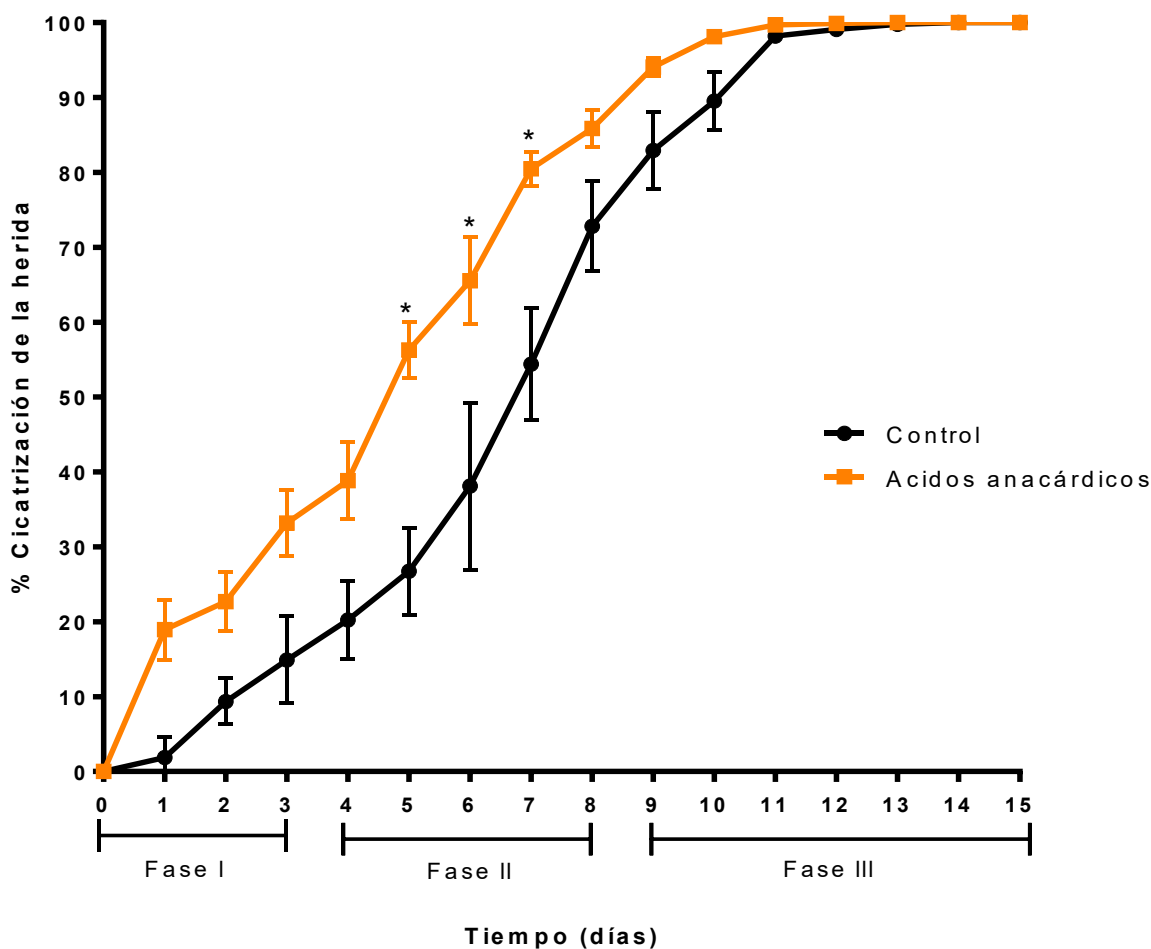


Figura 21. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de cicatrización tratadas con los ácidos anacárdicos y el control. Los datos representan la media \pm EEM para 6 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ con respecto al control aplicando un análisis de varianza de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey.

En la Figura 22 se observa el porcentaje de cicatrización durante las tres fases, para los animales tratados con la mezcla de ácidos comparado con el grupo control. La mezcla de ácidos (ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y ácidos anacárdicos, en proporción 1:1:1) muestra una diferencia significativa comparado con el control, desde el día 4 hasta el día 7 abarcado mayoritariamente la fase II – proliferativa. Los porcentajes para estos días fueron 43.94, 57.46, 77.03, 83.03% respectivamente, a pesar que la cantidad de ácidos individuales es 3 veces menor en este prueba, es decir 100 μ g de cada ácido, la capacidad cicatrizante es

equivalente a la de los ácidos individuales administrados a 300 µg. Esto sugiere que existe una sinergia de la combinación.

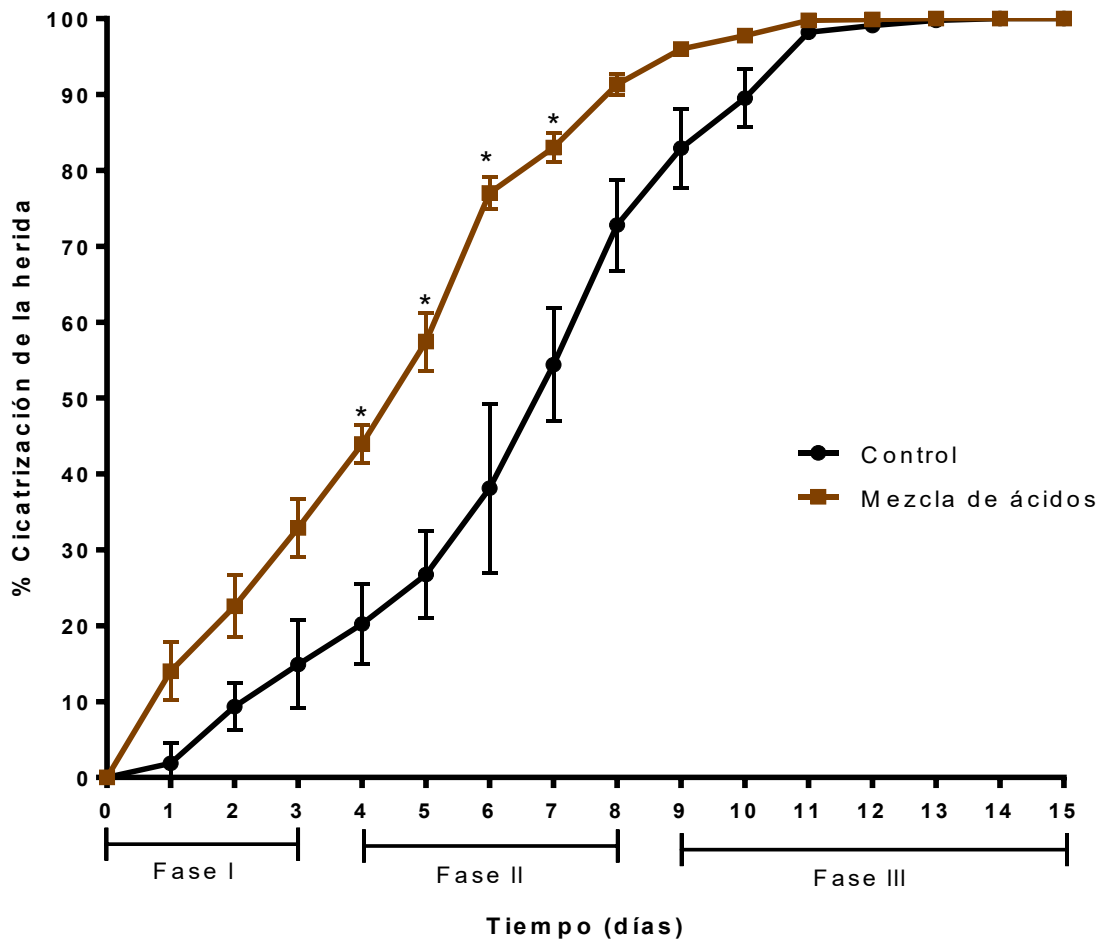


Figura 22. Porcentaje de cicatrización en ratas Wistar durante las 3 fases de cicatrización tratadas con la mezcla de ácidos y el control durante 15 días. Los datos representan la media \pm EEM para 6 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ con respecto al control aplicando un análisis de varianza de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey.

En las Figura 23 y 24 se presentan las imágenes representativas del cierre de la herida por escisión en rata Wistar para cada tratamiento durante 12 días. Se muestran hasta este día ya que la herida estaba por completo cerrada para todos los tratamientos

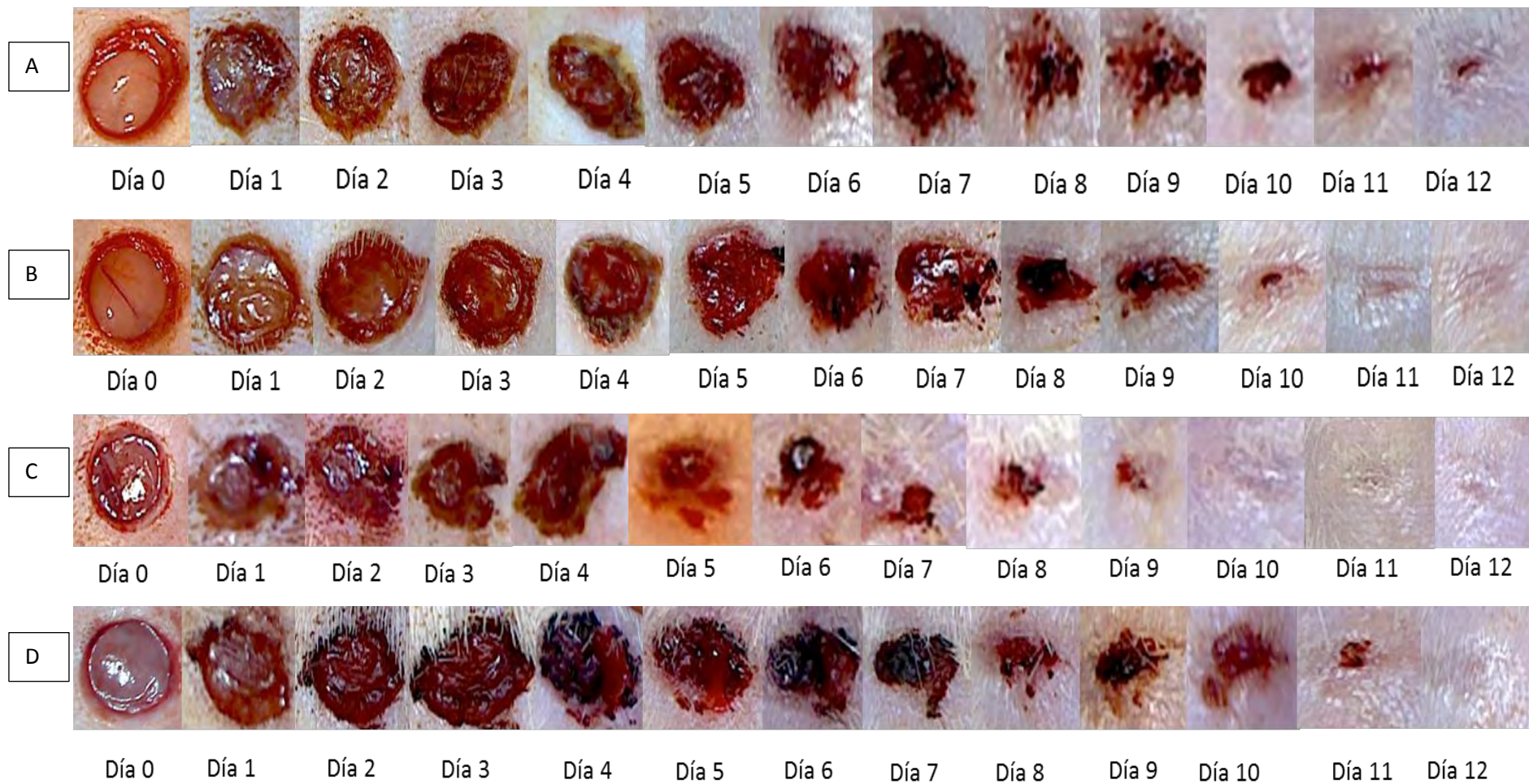


Figura 23. Fotografías de la evolución del cierre de las heridas durante el transcurso del tratamiento para los grupos; A) NAIVE, B) Control, C) Pirfenidona, D) Extracto hidroalcohólico de *A. adstringens*.

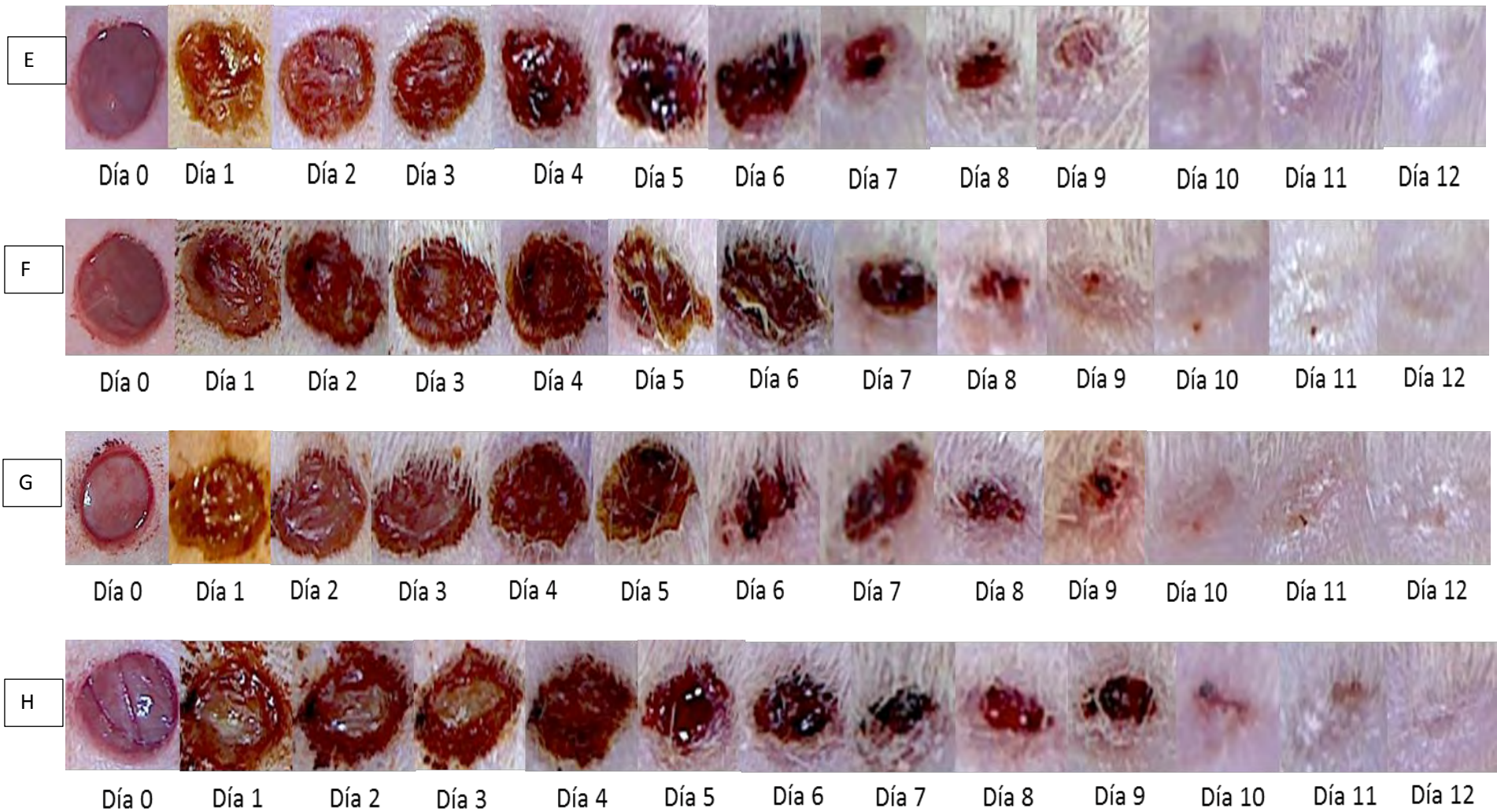
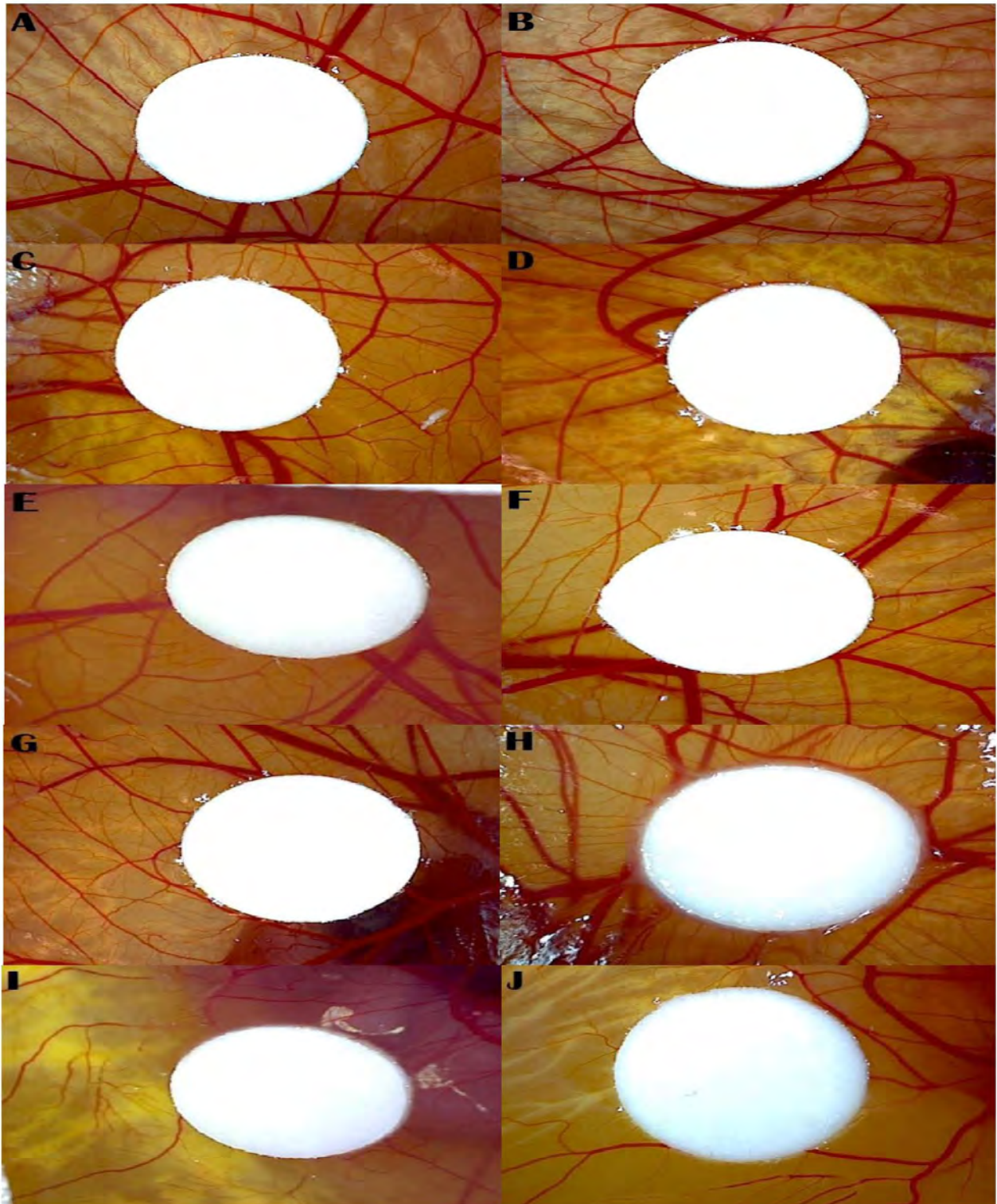


Figura 24. Fotografías de la evolución del cierre de las heridas durante el transcurso del tratamiento para los grupos; E) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico, F) Ácido Masticadienónico, G) Ácidos anacárdicos, H) Mezcla de ácidos

8.4 Evaluación del efecto angiogénico de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos

En la Figura 25 se muestran fotografías representativas para los distintos tratamientos aplicados en la CAM a una concentración de 30 μ g. Los resultados arrojan que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, los ácidos anacárdicos y la mezcla de ácidos poseen propiedades proangiogénicas (**Figura 25E, 25G y 25H**). Un dato interesante fue que el extracto hidroalcohólico (**Figura 25I**) posee propiedades antiangiogénicas, finalmente el que careció de alguna propiedad angiogénica o antiangiogénica fue el ácido masticadienónico (**Figura 25F**) ya que no mostro diferencia significativa en el número de ramificaciones en vasos sanguíneos. La pirfenidona y ácido acetilsalicílico (**Figura 25J Y 25D**) como fármacos testigos antiangiogénicos y la histamina (**Figura 25C**) como fármaco testigo proangiogénico corroboran nuestros resultados y nos dan un indicativo que la experimentación se llevó de forma adecuada (Ver apartado 7.3 y Fig. 9).



Figuras 25. Fotografías representativas de la CAM para los distintos tratamientos; A) control, B) NAIVE, C) histamina, D) ácido acetilsalicílico, E) ácido 3 α -hidroximasticadienónico, F) ácido masticadienónico, G) ácidos anacárdicos, H) mezcla de ácidos, I) extracto hidroalcohólico, J) pirfenidona

Se muestra las gráficas de caja y bigote, en ella se representa el número de vasos sanguíneos para cada compuesto de prueba, los datos que se grafican representan la mediana, el valor máximo y mínimo para cada tratamiento de al menos 6 huevos.

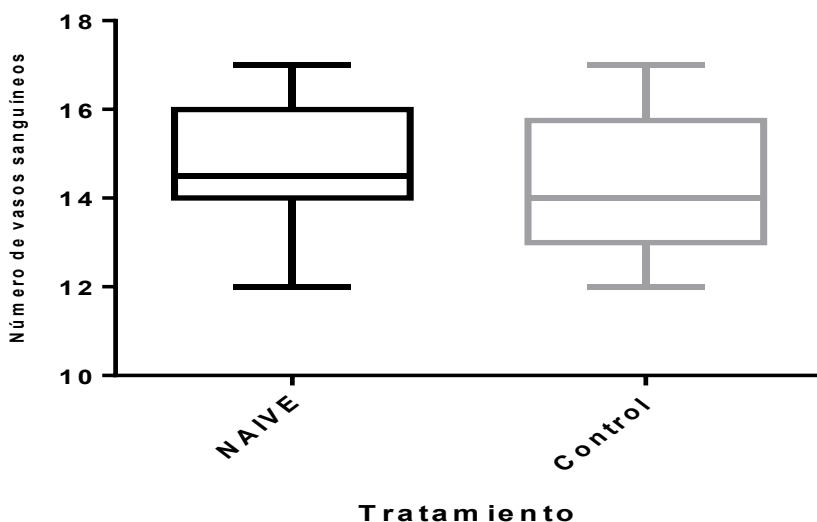


Figura 26. Número de vasos sanguíneos en modelo CAM de embrión de pollo para el grupo NAIVE y el control. La gráfica representa; la línea dentro de la caja representa la mediana, la caja representa los percentiles (25 y 75), las líneas verticales los valores máximo y mínimo del número de ramificaciones de vasos sanguíneos del conteo de al menos seis huevos. Se comparó la mediana de los grupos tratados mediante un análisis de varianza en rangos de una vía, seguido de una prueba post hoc Mann-Whitney, no se encontró diferencia estadística.

La Figura 26 muestra los tratamientos de NAIVE y control, estos dos tratamientos obtuvieron medianas de 14.5 y 14 respectivamente con un 25 y 75 percentil de los datos por lo que no existe diferencia significativa entre estos dos grupos, lo cual nos indica que el disco de metilcelulosa así como el disolvente DMSO al 0.1 %, no desencadena respuestas angiogénicas en el modelo CAM de embrión de pollo y que las respuestas se deberán solo a la aplicación de los respectivos tratamientos.

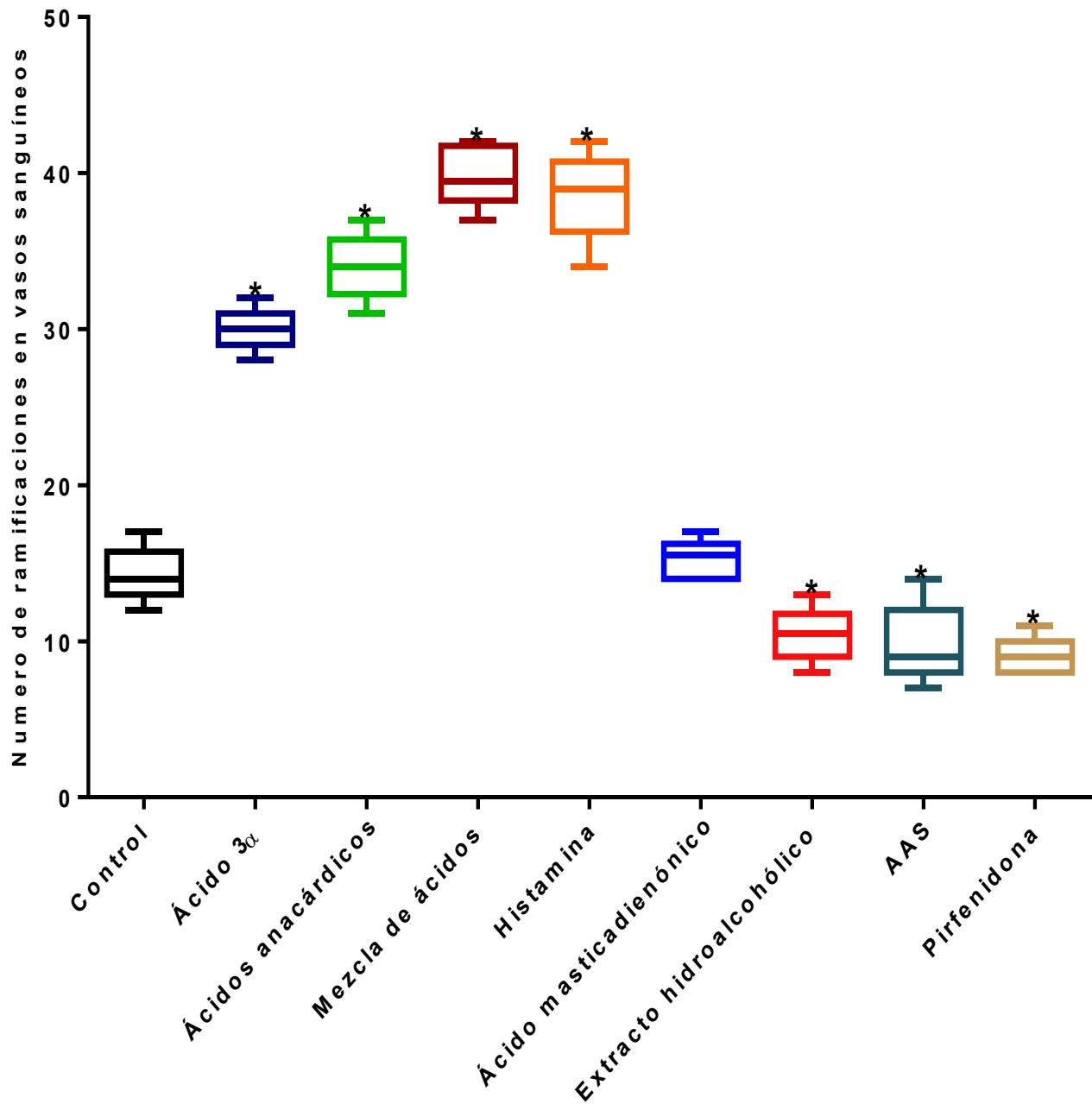


Figura 27. Número de ramificaciones de vasos sanguíneos en modelo CAM para los distintos tratamientos. La gráfica representa; la línea dentro de la caja representa la mediana, la caja representa los percentiles (25 y 75), las líneas verticales los valores máximo y mínimo del número de ramificaciones de vasos sanguíneos del conteo de al menos seis huevos. * $p < 0.05$ con respecto al control aplicando un análisis de varianza en rangos de una vía, seguido de una prueba post hoc de Dunn's.

En la Figura 27 se puede observar que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácidos anacárdicos, mezcla de ácidos y la histamina obtuvieron una mediana de 30, 34, 39 y 39.5 ramificaciones de vasos sanguíneos respectivamente, que comparadas con la mediana del control la cual fue de 14 existe una diferencia significativa y con ello una actividad proangiogénica. El extracto de Cuachalalate presentó una mediana de 10.5 que comparándola con el control con mediana de 14 sorpresivamente posee actividad antiangiogénica disminuyendo el número de ramificaciones en los vasos sanguíneos casi equiparable con los fármacos testigos antiangiogénicos, como el ácido acetilsalicílico y pirfenidona con medianas de 9 para ambos casos.

9. Discusión de resultados

Los resultados encontrados en este estudio muestran claramente que los ácidos aislados de corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) como el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, los ácidos anacárdicos y la mezcla de ácidos presentan un efecto cicatrizante en la fase II de la cicatrización (**Figura 19, 21, 22, 24E, 24G y 24H**) en el modelo de herida por escisión en rata Wistar a una concentración de 300 μ g/herida, aplicados por vía tópica. También, se encontró que los mismos compuestos poseen propiedades proangiogénicas en el modelo CAM de embrión de pollo a una concentración de 30 μ g (**Figura 25E, 25G y 25H**), sugiriendo así que la actividad cicatrizante es favorecida mediante la estimulación de la angiogénesis en la fase II de este proceso. Resultados parecidos fueron reportados en 1999 por Moon y colaboradores quienes encontraron que las propiedades cicatrizantes del *Aloe vera*, mejor conocida como sábila, se debía a la presencia de un compuesto mayoritario: β -sitoesterol, un triterpeno de estructura similar a las sustancias en este estudio, este compuesto mayoritario acelera el proceso de cicatrización mediante la estimulación de angiogénesis en el modelo CAM de embrión de pollo³¹, la angiogénesis es un proceso importante ya que durante la fase temprana de la cicatrización, el nuevo estroma, también llamado tejido de granulación, comienza a formarse aproximadamente 4 días después de la lesión, es decir en la fase II de la cicatrización, este proceso juega un papel muy importante en esta fase, ya que los nuevos brotes capilares angiogénicos invaden el coagulo rico en fibrina y fibronectina formado y en pocos días se organizan en una red microvascular a través del tejido de granulación, los cuales suministran nutrientes y oxígeno al tejido en formación, además de que sirve para el drenado de productos de desecho del mismo.⁴¹

El ácido masticadienónico no presentó propiedades cicatrizantes ni angiogénicas (**Figura 20 y 25F**) aunque aumento ligeramente el porcentaje de cicatrización en el curso temporal no lo hizo de forma significativa, sin embargo en la mezcla de ácidos contribuyó para que este tuviera un efecto mayor. En estudios previos de gastroprotección y actividad antiulcerosa se encontró que en relación estructural-

actividad el efecto es debido al grupo hidroxilo en el carbono 3 del triterpeno.^{8,42} El ácido masticadienónico es la forma oxidada del ácido 3 α -hidroximasticadienónico, posee un grupo carbonilo en lugar del hidroxilo en su estructura, por lo cual no presenta efecto gastroprotector. La presencia del hidroxilo en la estructura triterpenoide podría relacionarse también con el efecto cicatrizante y angiogénico de estas moléculas.

Para el caso de los ácidos anacárdicos existen estudios en donde esta mezcla de ácidos fenólicos de cadena larga poseen actividad antimicrobiana y antiparasitaria,^{11,43} lo cual es determinante para el cierre de una herida ya que al no contener microorganismos, la fase inflamatoria se torna rápida y eficaz dando paso a la fase II de la cicatrización y aumentando la epitelización en la última fase.

En estudios recientes con productos naturales se ha encontrado que algunos triterpenos aislados de algunas plantas como *Centella asiática*,⁴⁴ *Cestrum nocturnum*⁴⁵ y *Morinda citrifolia*⁴⁶ aumentan el proceso de cicatrización llevándose a cabo este proceso en menos tiempo y con propiedades estéticas satisfactorias. Los triterpenos mayoritarios en estas plantas son el ácido asiático, β -lupeol, ácido oleanólico y ácido ursólico, estos compuestos poseen el hidroxilo en la estructura triterpenoide similar al ácido 3 α -hidroximasticadienónico, aislados en este trabajo. Los mecanismos de acción son diversos; el β -lupeol induce la expresión de β -catenina promoviendo así la angiogénesis.⁴⁷ El ácido asiático y sus respectivos glucósidos llamados asiaticósidos aumentan la síntesis de colágeno, además de que inducen la producción de mediadores como VEGF. El ácido ursólico y oleanólico inducen la producción de algunos mediadores inflamatorios como el factor de crecimiento derivado de plaquetas.^{48,49}

Por otro lado, el extracto hidroalcohólico no presentó actividad cicatrizante (**Figura 18**), pero en el modelo CAM de embrión de pollo presentó efecto antiangiogénico (**Figura 25I**). Aunque el extracto contiene como compuestos mayoritarios al ácido 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico y estos resultaron ser proangiogénicos en los tratamientos individuales. Esto nos sugiere que el extracto contiene otros compuestos en cantidades pequeñas que abaten la actividad

proangiogénica de los ácidos individuales. Si esto se puede demostrar, esto podría dar sustento científico al uso tradicional de la corteza de *Amphipterygium adstringens* como auxiliar en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como se reporta en la literatura.¹ Por otro lado, sería muy importante evaluar el extracto hidroalcohólico en modelos de cáncer ya que al ser antiangiogénico podría presentar potencial como anticancerígeno y con ello dar sustento científico al uso tradicional de esta planta.

10. Conclusiones

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácidos anacárdicos y la mezcla de ácidos actuaron como agentes cicatrizantes en una concentración de 300 μ g/herida/día durante 15 días mediante la estimulación de la angiogénesis.

El ácido masticadienónico careció de propiedades cicatrizantes, así como de propiedades angiogénicas.

Finalmente, el extracto hidroalcohólico no presentó propiedades cicatrizantes como se esperaba. Sin embargo, en el modelo CAM de embrión de pollo presentó propiedades antiangiogénicas.

11. Perspectivas

Evaluar el efecto cicatrizante de extractos que contengan la mayor cantidad de compuestos triterpenicos y mezcla de ácidos anacárdicos para corroborar si presenta o no actividad cicatrizante.

Aislar otros compuestos de estructura similar a los compuestos en este estudio como el β -sitoesterol, ácido cuachalálico o ácido instapolinácico presentes en corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) para corroborar si el efecto cicatrizante se debe al hidroxilo en C-3.

Evaluar el efecto cicatrizante del ácido 3 α -hidroximasticadienónico, anacárdicos y mezcla de ácidos en un modelo de herida por quemadura o en úlceras crónicas o en ratas con hiperglucemia.

Determinar la presencia de algunos factores de crecimiento presentes en el proceso de cicatrización y corroborar el mecanismo de acción por el cual se desencadena la angiogénesis.

Implementar un método cuantitativo para el modelo CAM de embrión de pollo, como espectroscopía electrónica de barrido o refractometría cuantitativa.

10. Referencias

1. Navarrete A, Mata R. (2009). Plantas medicinales de México; monografía científica Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Sentido giratorio EDICIONES. México.
2. Mantle D, Gok MA, Lennard TW. (2001). Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. *Adverse Drug Reaction and Toxicological Reviews*. 20(2):89-103.
3. Chávez-Piña, A., Navarrete, A. (2009). Chapter 3. Gastroprotective Triterpenoids: Pharmacology Mechanism. *Medicinal Plants Classification, Biosynthesis and Pharmacology*. Nova Science Publishers, New York; 97-138.
4. Cuachalalate - *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl. - Planta medicinal. Vinculo disponible en: www.ethnobotanik.org/Heilpflanzen/Amphipterygium-adstringens/Cuachalalate-Amphipterygium-adstringens-es.html (Consultado el 01 de marzo de 2018).
5. Jagan MR, Patlolla and Chintlalapally V. (2012). Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13:147-155.
6. Dzubac, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Bidermann, D., Markova, L., Urban, M. & Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Products Reports*; 23: 394-411.
7. Navarrete A, Martinez-Uribe L S, Reyes B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytother Res*. 12: 1-4.
8. Arrieta, J., Benítez, J., Flores, E., Castillo, C. & Navarrete, A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae); Role of prostaglandins, sulfhidryls, nitric oxide and capsaicin sensitive neurons. *Planta Médica*; 69: 905-909.

9. Navarrete, A., Mata, R. & Delgado, G. (1989). Alkyl anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Médica*; 55: 579.
10. Mata, R., Calzada, F. & Navarrete, A., Del Rio, F. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*; 34: 147-154.
11. Rivero-Cruz I, et al. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J. Pharm. Pharmacol*; 57: 1117-26.
12. Rodriguez-Canales, M., et al. (2016). Protective Effect of *Amphipterygium adstringens* Extract on Dextran Sulphate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–12.
13. Huether E., McCance LK. (2017). *Understanding Pathophysiology*. 6ª ed. Ed. Elsevier. U.S.A. 1053 pp.
14. Arenas, R. *Dermatología*. (2015). 2ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México: 1-3 pp.
15. Dorland W. (2005). *Dorland's Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina*. 30ª ed. Elsevier. España. pp 915.
16. Rivera et al. (2015). Fisiología de la cicatrización. *Revista Mexicana de Dermatología*. 1: 30-35
17. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* 2007; 25: 9-18.
18. Benavides, J. (2008). Reparación de heridas cutáneas. *Rev Asoc Col Dermatol*. 16(1):29-35.
19. Gonzalez AC, Costa TG, Andrade ZA, Medrado ARAP. (2016). Wound healing -A literatura review. *An Bras Dermatol*; 91(5):614-2
20. Kumar V., Abul K. (2015). *Patología estructural y funcional*. 9ª ed. Elsevier. España. 106-108 pp.
21. Martínez-Ezquerro JD., Herrera LA., (2006). Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. *Revista de Cancerología* 1: 83-96.
22. Tahergorabi, Z., & Khazaei, M. (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(6), 1110–1126.

- Secretaría de Salud Pública, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 2008.
34. Navarrete, A., et al. (2006). Quantitative determination of triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by liquid chromatography and thin-layer chromatography and morphological analysis of cuachalalate preparations. *Journal of AOAC International*, 89(1), 1–7.
 35. Janka-Zires, et al. (2016). Topical Administration of Pirfenidone Increases Healing of Chronic Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Crossover Study. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–7.
 36. Gasca-Lozano, L. E., et al. (2017). Pirfenidone Accelerates Wound Healing in Chronic Diabetic Foot Ulcers: A Randomized, Double-Blind Controlled Trial. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 1–12.
 37. Barnhill, R. L., & Ryan, T. J. (1983). Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *The Journal of Investigative Dermatology*, 81(6), 485–488.
 38. Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., & Presta, M. (2006). The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nature Protocols*, 1(1), 85–91.
 39. Morales-Martínez, EA. (2011). Estudios de absorción in vitro de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico aislados de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Tesis profesional de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
 40. Soriano-García, et al. Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 43(5), 990–992.
 41. Tonnesen, M. G., Feng, X., & Clark, R. A. F. (2000). Angiogenesis in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5(1), 40–46.
 42. Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. L., & Reyes-Trejo, L. (2002). Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 383–388.

43. Himejima, M., & Kubo, I. (1991). Antibacterial agents from the *cashew Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 418–421.
44. Somboonwong, J., Kankaisre, M., Tantisira, B., & Tantisira, M. H. (2012). Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1115.
45. Nagar, H. K., Srivastava, A. K., Srivastava, R., Kurmi, M. L., Chandel, H. S., & Ranawat, M. S. (2016). Pharmacological Investigation of the Wound Healing Activity of *Cestrum nocturnum* (L.) Ointment in Wistar Albino Rats. *Journal of Pharmaceutics*, 1(1), 1–8.
46. Nayak, B. S., Sandiford, S., & Maxwell, A. (2009). Evaluation of the Wound-Healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(3), 351–356.
47. Prasad, S., Kalra, N., & Shukla, Y. (2007). Hepatoprotective effects of lupeol and mango pulp extract of carcinogen induced alteration in Swiss albino mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(3), 352–359.
48. Moura-Letts, G., Villegas, L. F., Marçalo, A., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (2006). In Vivo Wound-Healing Activity of Oleanolic Acid Derived from the Acid Hydrolysis of *Anredera diffusa*. *Journal of Natural Products*, 69(6), 978–979.
49. Ngo, L. T., Okogun, J. I., & Folk, W. R. (2013). 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. *Natural Product Reports*, 30(4), 584.
50. Stewart G, H. W. (2016). *Angiogenesis Protocols*. (S. G. Martin & P. W. Hewett, Eds.) (Vol. 1430). New York, NY: Springer New York. 107-129.
51. Ponce, M. L., & Kleinmann, H. K. (2003). The Chick Chorioallantoic Membrane as an In Vivo Angiogenesis Model. In *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
52. Ribatti, D. (2008). Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis (pp. 181–224).

53. Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2008). Chapter 2. Chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules. *Methods in Enzymology*, 444, 21–41.
54. Choi, S., et al. (2002). Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. *Planta Medica*, 68(4), 330–335.
55. DiPietro, L. A., & Burns, A. L. (2003). *Wound Healing* (Vol. 78). New Jersey: Human Press. 3-15.
56. Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., & Presta, M. (2006). The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nature Protocols*, 1(1), 85–91.
57. Gatne, D. P., Mungekar, S., Addepalli, V., Mohanraj, K., Ghone, S. A., & Rege, N. N. (2016). Development of collateral vessels: A new paradigm in CAM angiogenesis model. *Microvascular Research*, 103, 11–13.
58. Demidova-Rice, T. N., Durham, J. T., & Herman, I. M. (2012). Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 1(1), 17–22.
59. Thompson, W. D., & Brown, F. I. (1987). Quantitation of histamine-induced angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane: mode of action of histamine is indirect. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*, 6(4), 343–357.
60. Sörbo, J., Jakobsson, A., & Norrby, K. (1994). Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine₁ and histamine₂. *International Journal of Experimental Pathology*, 75(1), 43–50.
61. Zhang, X., et al. (2013). Impact of acetylsalicylic acid on tumor angiogenesis and lymphangiogenesis through inhibition of VEGF signaling in a murine sarcoma model. *Oncology Reports*, 29(5), 1907–1913.
62. Zhao, Q., Wang, Z., Wang, Z., Wu, L., & Zhang, W. (2016). Aspirin may inhibit angiogenesis and induce autophagy by inhibiting mTOR signaling pathway in murine hepatocarcinoma and sarcoma models. *Oncology Letters*, 12(4), 2804–2810.

63. Liu, X., Yang, Y., Guo, X., Liu, L., Wu, K., & Yu, M. (2017). The Antiangiogenesis Effect of Pirfenidone in Wound Healing In Vitro. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 33(9), 693–703.
64. Bradley, U., Cullum, N., Nelson, E.A. (1999). Systematic reviews of wound care management dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. *Health Technology Assessment* 3:1-18.
65. Bryan BA, D' Amore PA. (2007). What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64(16): 2053-65.
66. Valencia C. (2015). Cicatrización: proceso de reparación Tisular. Aproximaciones terapéuticas. *Investigaciones Andinas*. 20(12): 85-98.
67. Demidova-Rice, T. N., Durham, J. T., & Herman, I. M. (2012). Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 1(1), 17–22.

11. Anexos

Anexo 1: Documento aprobatorio OFICIO/FQ/CICUAL/200/17



**FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/200/17
ASUNTO: DICTAMEN**

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Presente

Por éste medio le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el protocolo:

“Estudio de las propiedades del Árnica Mexicana (*Heterotheca inuloides* Cass), Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y Toloache (*Datura stramonium*) para el tratamiento de heridas y úlceras diabéticas en rata Wistar”.

No. de animales empleados en el estudio: 216 ratas Wistar macho

Constatando que realizó las correcciones solicitadas, se emite el dictamen de:


APROBADO

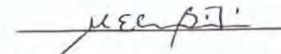
Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 7 de marzo del 2017


M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente


Dra. Ma. Elena Bravo Gómez
Secretaria

c.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
c.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaria Administrativa, FQ.
c.c.p. Expediente CICUAL.

Anexo 2. Certificado de calidad y uso de embriones



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
EN PRODUCCIÓN AVÍCOLA
(CEIEPAV)



Ciudad de México, a 23 de abril de 2018.

A quien corresponda.

Por este medio, informo a ustedes que los huevos fértiles y embrionados que se venden en este Centro provienen de gallinas reproductoras de la estirpe Bovans White, las cuales se encuentran en buen estado de salud y libres de enfermedades. Lo anterior se sustenta en los programas de bioseguridad y vacunaciones que se realizan; además se monitorean serológicamente cada tres meses a fin de garantizar que los huevos fértiles y/o embrionados se puedan emplear en los laboratorios de la UNAM y otras instituciones para distintos fines.

Sin más por el momento, se extiende la presente para los fines que le convengan al interesado.

Atentamente

Arturo Cortes Cuevas

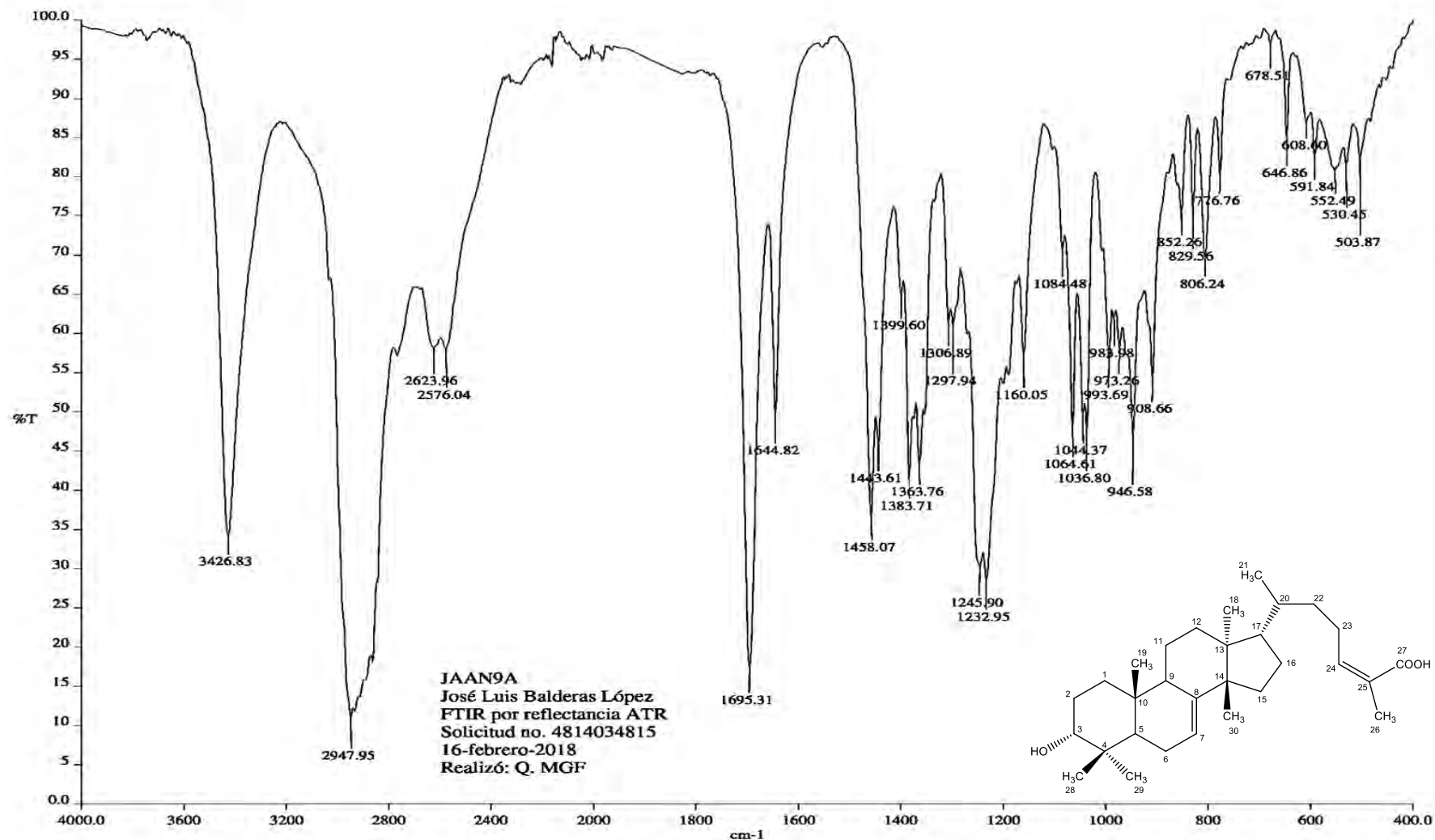
Profesor Titular C

Encargado del área de reproductoras

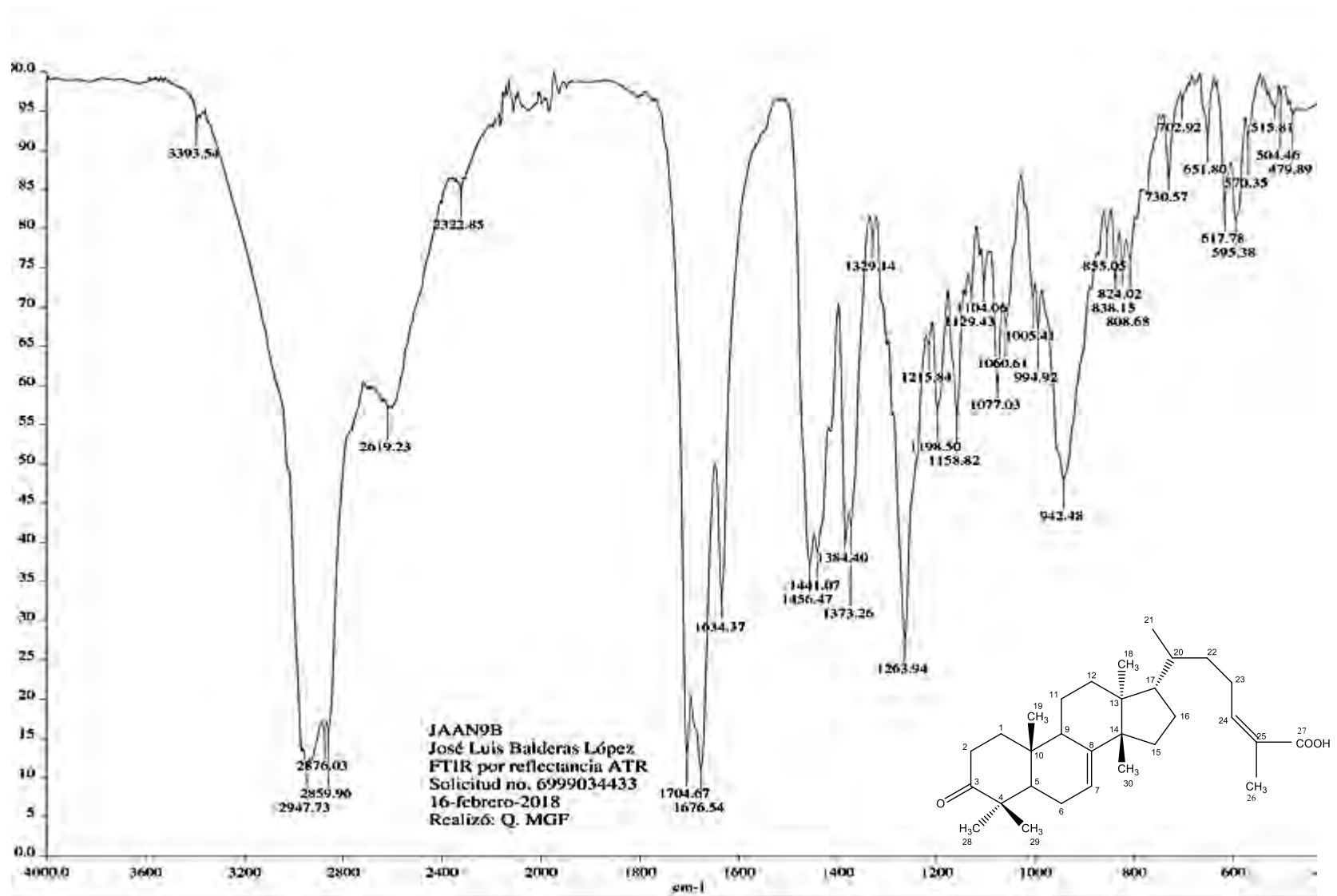


Manuel M. López S/N, Col. Zapotitlán, Deleg. Tláhuac C.P. 13209, Cd. Mx.
Tel. 58 63 42 39 y 58 45 15 30.

Anexo 3. Espectros



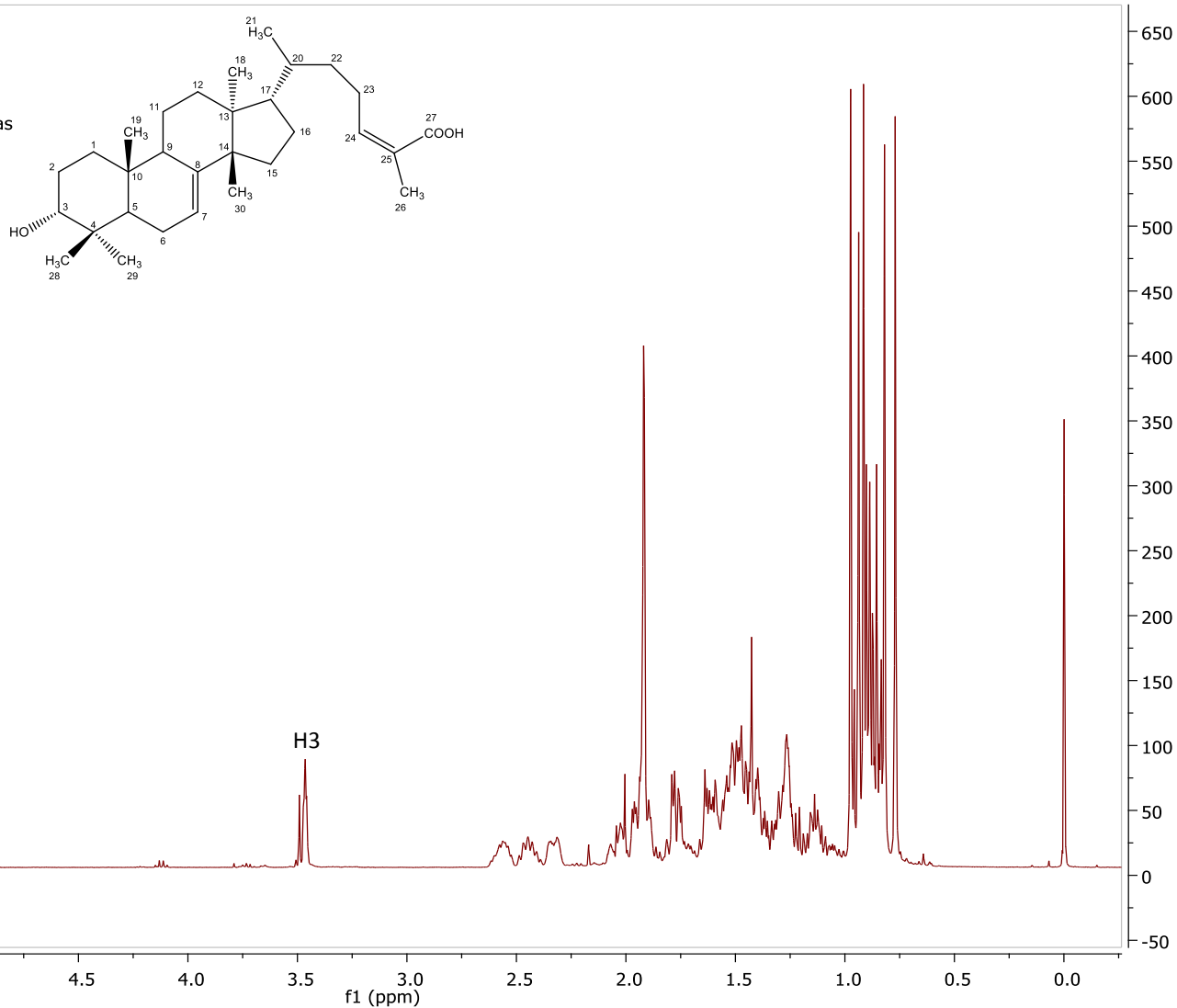
Espectro 1. Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) del ácido 3α-hidroximasticadienónico.



Espectro 2: Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) del ácido masticadienónico.

0567-1H_JAAN9A
0567

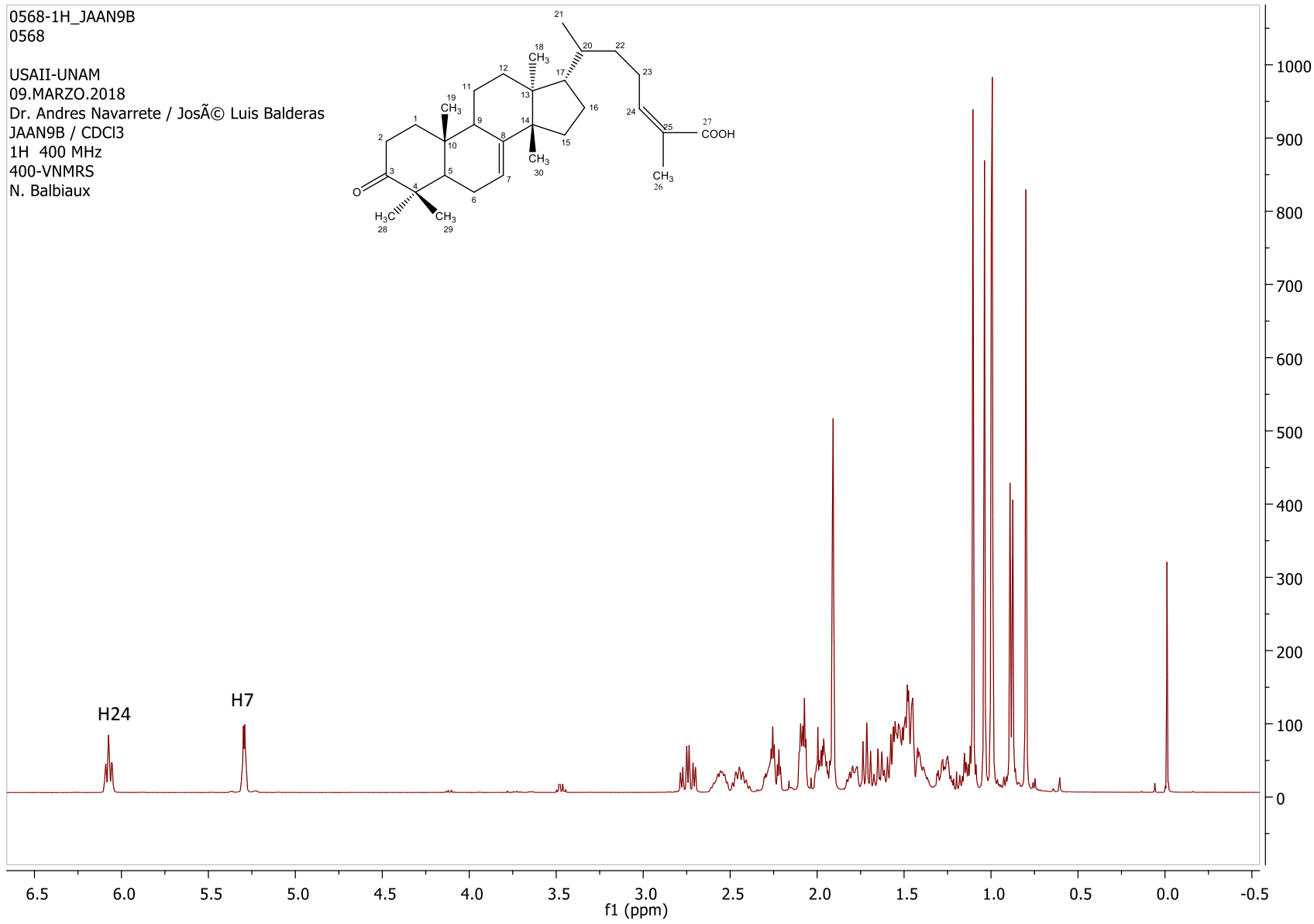
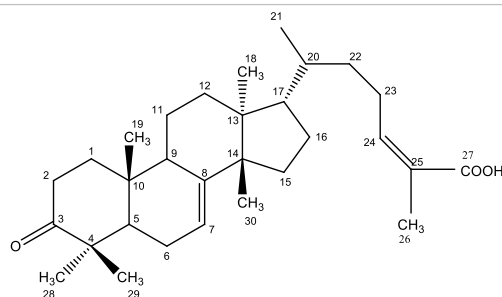
USAII-UNAM
09.MARZO.2018
Dr. Andres Navarrete / JosÃ© Luis Balderas
JAAN9A / CDCl₃
1H 400 MHz
400-VNMRS
N. Balbiaux



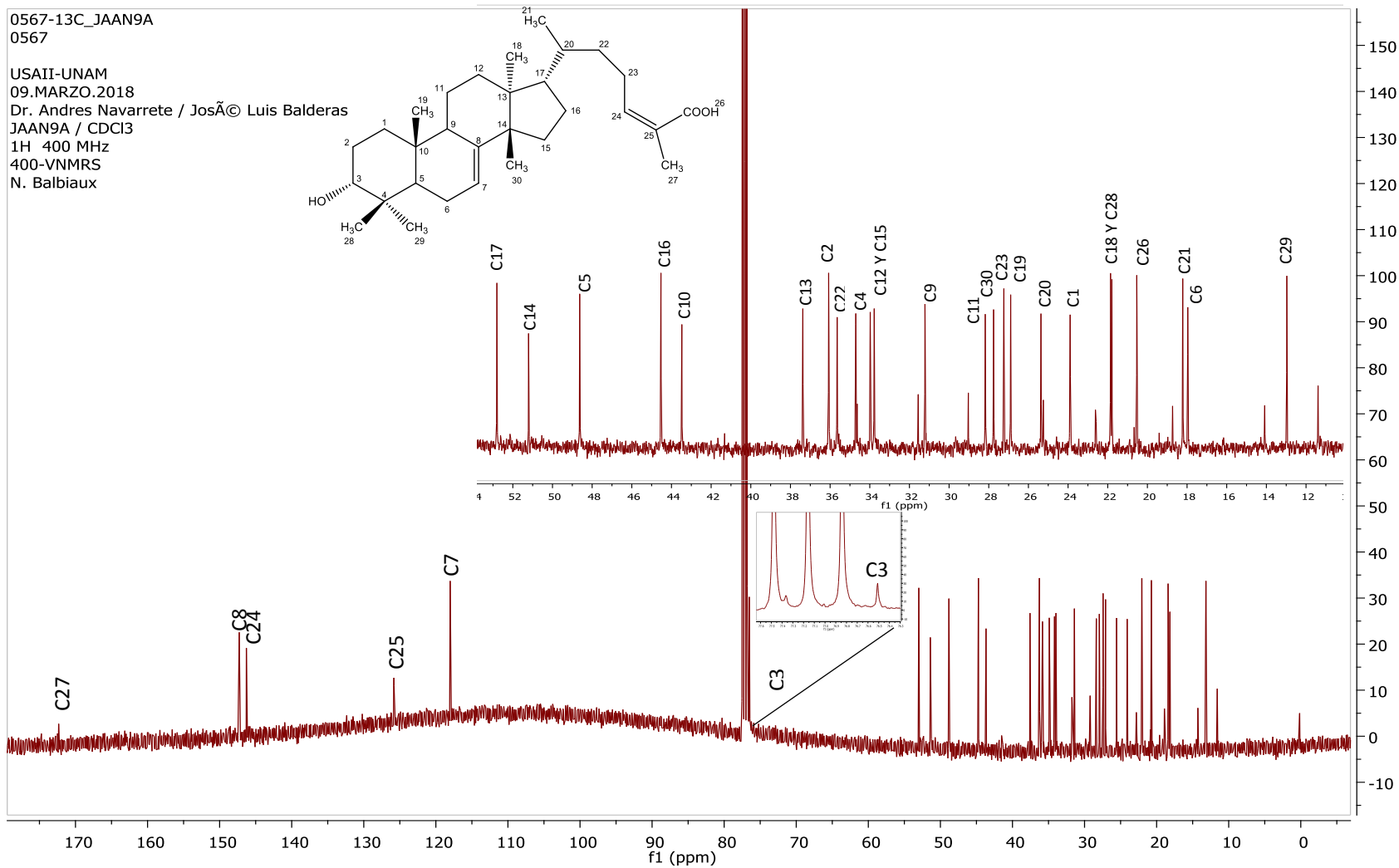
Espectro 3: Espectro de RMN ¹H del ácido 3α-hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl₃).

0568-1H_JAAN9B
0568

USAII-UNAM
09.MARZO.2018
Dr. Andres Navarrete / JosÃ© Luis Balderas
JAAN9B / CDCl3
1H 400 MHz
400-VNMRS
N. Balbiaux



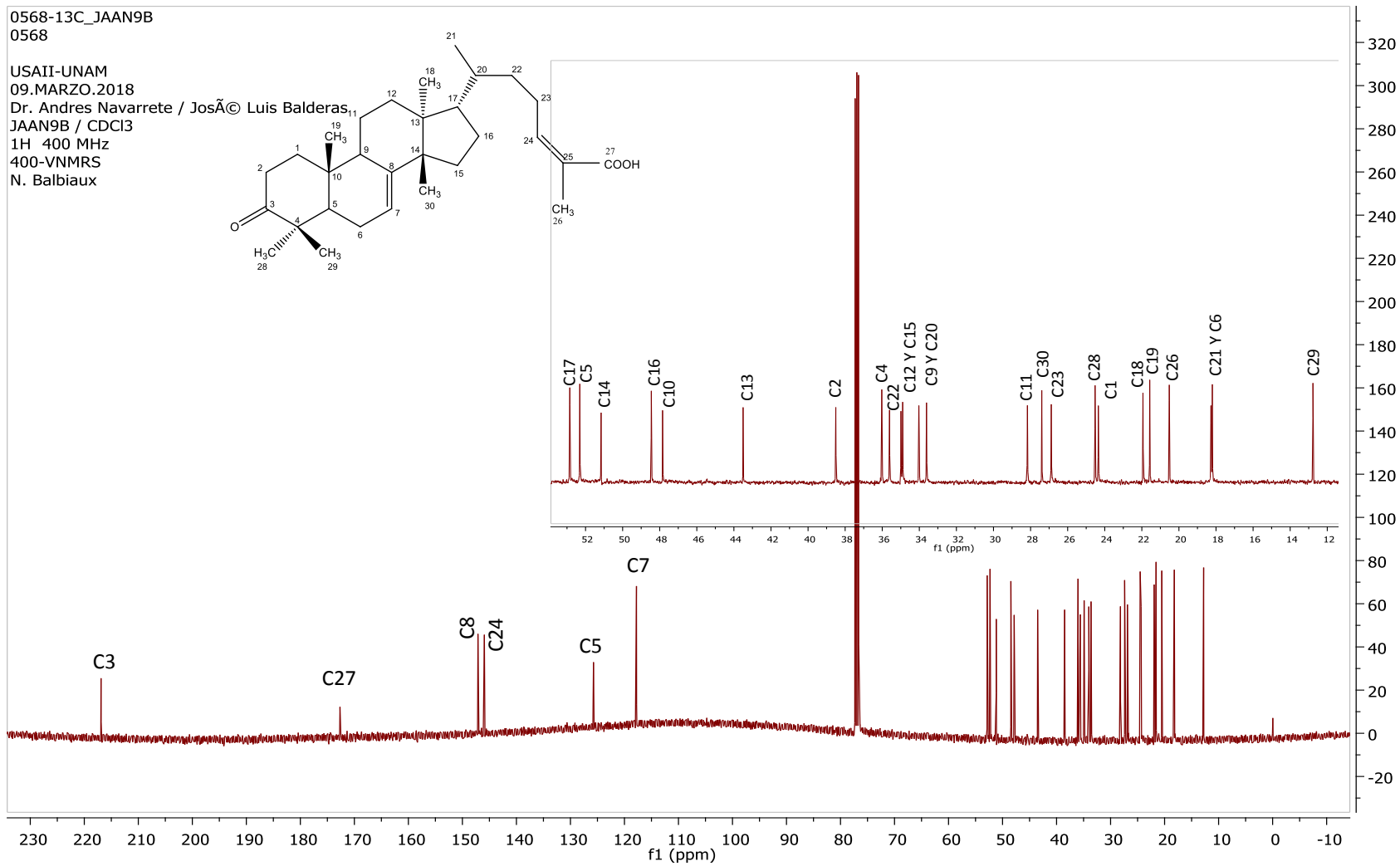
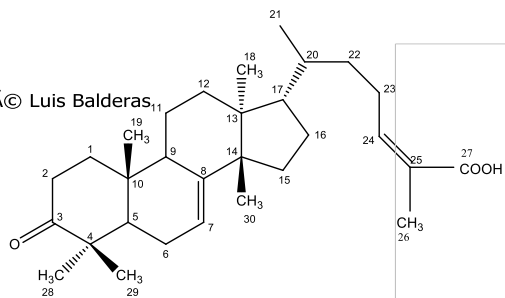
Espectro 4: Espectro de RMN ^1H del ácido masticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3).



Espectro 5: Espectro de RMN ^{13}C del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3).

0568-13C_JAAN9B
0568

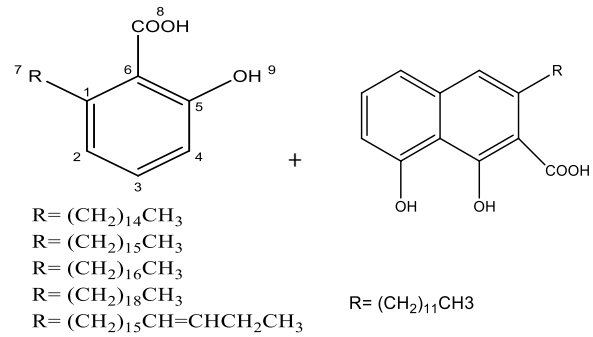
USAII-UNAM
09.MARZO.2018
Dr. Andres Navarrete / JosÃ© Luis Balderas,
JAAN9B / CDCl₃
1H 400 MHz
400-VNMRS
N. Balbiaux



Espectro 6: Espectro de RMN ¹³C del ácido masticadienónico (400 MHz, CD-Cl₃).

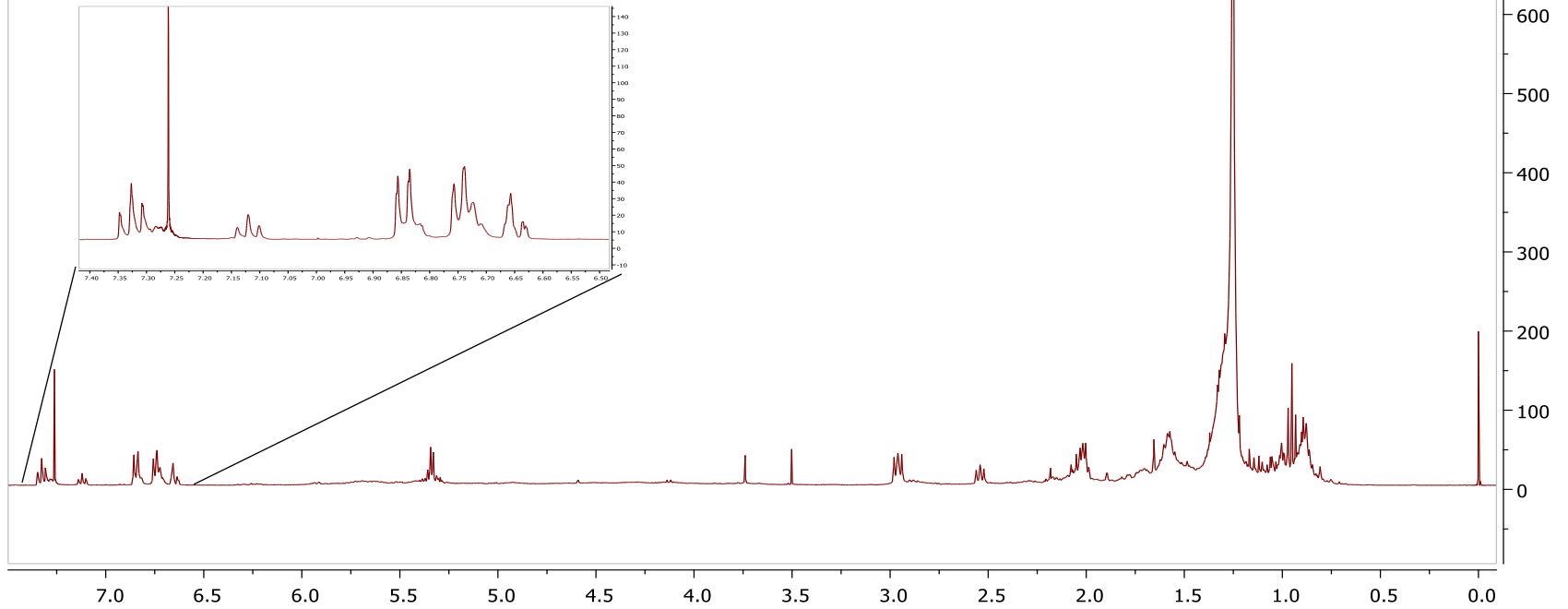
(1) 1386-1H_JAAN7
1386

USAII-UNAM
13.Septiembre.2017
Dr. Andres Navarrete / Jose Balderas
JAAN7 / CDCl3
1H 400 MHz
400-MR
MMB



R = (CH₂)₁₄CH₃
R = (CH₂)₁₅CH₃
R = (CH₂)₁₆CH₃
R = (CH₂)₁₈CH₃
R = (CH₂)₁₅CH=CHCH₂CH₃

R = (CH₂)₁₁CH₃



Espectro 7: Espectro de RMN ¹H para la mezcla de ácidos anacárdicos (400 MHz, CD-Cl₃).