



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Estudio de las propiedades cicatrizantes del Cuachalalate
(*Amphipterygium adstringens*) y sus metabolitos para el tratamiento de heridas”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Christian Verónica Pérez Contreras

TUTOR

Dr. Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química UNAM

Ciudad de México, ☐ Noviembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Vocal	Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el trabajo:

Laboratorio 126, Conjunto "E", Departamento de Farmacia
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Bajo la dirección del Dr. Andrés Navarrete Castro

Sustentante: Q.F.B. Christian Verónica Pérez Contreras



*“Nada es más contrario a la curación
que el cambiar frecuentemente de remedio”*

Séneca

Healing...is not a science but the intuitive art of wooing nature.

W. H. Auden

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	6
DEDICATORIA	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE GRÁFICAS	14
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	17
1. Marco Teórico	19
1.1 Anatomía y fisiología de la piel	19
1.1.1 Epidermis	20
1.1.1.1 Estrato basal o germinativo	20
1.1.1.2 Estrato espinoso o de Malpighi	21
1.1.1.3 Estrato granuloso	21
1.1.1.4 Estrato lúcido	21
1.1.1.5 Estrato córneo.....	22
1.1.2 Dermis	22
1.1.3 Hipodermis	23
2. Herida.....	24
3. Proceso de cicatrización	24
3.1 Fase hemostasia/inflamatoria	25
3.1.1 La respuesta vascular: hemostasia y coagulación	26
3.1.2 La respuesta celular: Inflamación	26
3.2 Fase proliferativa	27
3.2.1 Angiogénesis/neovascularización.....	28
3.2.2 Formación del tejido de granulación	28
3.2.3 Reepitelización.....	29
3.3 Fase de remodelación.....	30
4. Tipos de cicatrización	31
4.1 Cicatrización por primera intención	31
4.2 Cierre primario diferido	31
4.3 Cicatrización por segunda intención.....	32
5. Microbiología de las heridas	33
5.1 Pruebas antimicrobianas	36
6. Modelos para evaluar cicatrización	36
6.1 Modelos in vitro	37
6.2 Modelos in vivo.....	37
6.3 Modelos de mamíferos	38
6.4 Modelos angiogénicos	41
7. Tratamiento para la cicatrización de heridas	42
7.1 Fármacos para cicatrización de heridas.....	42
8. Pirfenidona	46
9. Plantas con propiedades cicatrizantes.....	47
10. Cuachalalate	51

10.1 Usos tradicionales.....	52
10.2 Constituyentes químicos del cuachalalate	53
10.3 Bioactividad de los compuestos de cuachalalate	54
11. Ajo	55
11.1 Constituyentes químicos del ajo.....	56
11.2 Bioactividad de los componentes del ajo	57
12. Justificación	59
13. Hipótesis	60
14. Objetivos	60
Objetivo General	60
Objetivos Particulares	60
15. Parte experimental	61
15.1 Material vegetal	61
15.2 Fármacos y reactivos	61
15.3 Preparación de los extractos de cuachalalate.....	61
15.4 Aislamiento y caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de cuachalalate	61
15.5 Pruebas antimicrobianas.....	62
15.5.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	62
15.6 Evaluación in vivo	63
15.6.1 Animales	63
15.6.2 Formación de las heridas y evaluación de los tratamientos.....	64
15.6.3 Evaluación de la herida y porcentaje de cierre.....	65
15.6.4 Registro del peso de los animales.....	66
15.7 Modelo CAM para evaluación de la angiogénesis.....	66
16. Análisis histológico	67
17. Análisis estadístico	71
18. Resultados.....	72
18.1 Obtención de los extractos de cuachalalate.....	72
18.2 Aislamiento y caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de cuachalalate	72
18.3 Pruebas antibacterianas.....	76
18.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	76
18.4 Evaluación de la herida y porcentaje de cierre	77
18.5 Peso de los animales	85
18.7 Modelo CAM para evaluación de la angiogénesis.....	85
18.8 Análisis histológico	89
Discusión.....	111
Conclusiones	116
Perspectivas	117
ANEXOS	118
REFERENCIAS.....	125

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado y así poder realizar mis estudios de maestría (Número de becario 606066).

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 Posgrado a través del Proyecto PAIP5000-9143.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

A mi tutor Dr. Andrés Navarrete Castro por el apoyo académico, profesional y personal brindado durante la realización de este proyecto, por sus consejos y recomendaciones.

A los miembros del jurado Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. José Fausto Rivero Cruz, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Dr. Fernando Edgar Krötzsch Gómez, por su tiempo y valiosas aportaciones al presente trabajo.

Al Dr. José Luis Balderas por el apoyo profesional y técnico recibido.

Al personal de la USAII por la realización de los espectros de los compuestos en estudio.

Al Dr. Marcos Flores Álamo por el apoyo en la caracterización mediante difracción de rayos X de monocristal de los compuestos de interés.

Asimismo, agradezco al Dr. Edgar Krötzsch, a la Maestra Rosa M. Salgado, y al Biólogo Noé Zacula Juárez del *Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra"* por su apoyo en la determinación histomorfológica.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida y darme la fortaleza y paciencia para no rendirme y de esta manera crecer personal y profesionalmente.

A mis padres Verónica y José Luis por su apoyo incondicional, por su tiempo, esfuerzo, consejos y amor durante toda mi vida, porque sin ustedes no hubiera sido posible. Los amo infinitamente.

A mis hermanos José Luis y Mary Carmen por ser mis compañeros de vida, por estar siempre conmigo, por los momentos y experiencias compartidas y sobre todo porque junto a mis padres son mi razón de vivir.

A Jessica Aguilera mi mejor amiga y hermana, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas a pesar de la distancia, por mostrarme tu apoyo, tu cariño y por creer en mí. Te quiero.

Al agonista de mi vida: Hafid Segovia. Por llegar á mí en el momento correcto y llenar mis días de felicidad. Por ser mi complemento perfecto y mi razón de ser. Te amo.

A Jesús Alvarado por hacer de mi maestría algo inolvidable, por el apoyo durante la realización de los experimentos y por los buenos momentos.

A Alejandra Orona por el apoyo, paciencia y conocimientos compartidos durante toda la maestría. Por ser mí tutora y amiga.

A Josué Velázquez por su amistad, observaciones y conocimientos aportados durante la realización de este trabajo.

A mis amigos del laboratorio 126, Mario Díaz, Arturo Sánchez, Jorge Mendoza Monroy, Ibrahim Ubiarco, Elizabeth Pineda, Diego Estrada, Lizbeth Sánchez y demás integrantes, por hacer divertida mi estancia en el laboratorio, por las experiencias vividas, pláticas interminables, observaciones y tiempo compartido estos 2 años.

A Karina Zarco, Leopoldo Torres Vences y Aldahir Ramos por su amistad, cariño y apoyo siempre que los necesité.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgCl	Cloruro de plata
AgNO₃	Nitrato de plata
Ag₂SO₄	Sulfato de plata
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	Factor de crecimiento de los fibroblastos básico
CAM	Membrana corioalantoidea
CBP	Proteínas de unión a colágena
cm²	Centímetros cuadrados
Clg	Colágena
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHX	Digluconato de clorhexidina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO₂	Dióxido de carbono
°C	Grados Celsius
d	Doblete
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EI	Endocarditis infecciosa
FGF	Factor de crecimiento de los fibroblastos
FQ	Fibrosis quística
G	Gauge
GTP	Guanosíntrifosfato
h	Horas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HClO₄	Ácido perclórico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1α	Factor 1-alfa inducible por hipoxia
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia

Hz	Hertz
IFN-γ	Interferón γ
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
IP-10	Proteína 10 inducida por interferón γ
ITU	Infecciones del tracto urinario
J	Constante de acoplamiento
KGF	Factor de crecimiento de los queratinocitos
kg	Kilogramos
m	Multiplete
M	Molar
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
Mg	Miligramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
MIP-1	Proteína inflamatoria de macrófagos 1
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MMP's	Metaloproteinasas
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-$\kappa$$\beta$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células β activada
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PEG	Propilenglicol
p.ej.	Por ejemplo

PGE₂	Prostaglandina E ₂
RMN de ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Segundos
s	Singulete
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
spp	Especies Plurales
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th1	Linfocitos T helper 1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
δ	Desplazamiento químico

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen embrionario de las estructuras de la piel _____	19
Tabla 2. Principales actividades de los factores de crecimiento durante la cicatrización cutánea _____	25
Tabla 3. Características principales de algunos patógenos específicos _____	34
Tabla 4. Modelos <i>in vitro</i> de cicatrización usados en investigación _____	37
Tabla 5. Modelos <i>in vivo</i> de cicatrización usados en investigación _____	38
Tabla 6. Características de los principales antisépticos _____	43
Tabla 7. Plantas comunes con propiedades cicatrizantes y mecanismo de acción reportado _____	48
Tabla 8. Plantas y su mecanismo de acción descritos en la literatura _____	50
Tabla 9. Tratamientos a evaluar en las heridas de los animales _____	65
Tabla 10. Sustancias aplicadas como tratamiento estimulador de la cicatrización _____	68
Tabla 11. Escala para determinar el índice de epitelización _____	68
Tabla 12. Escala análoga visual para evaluar infiltrado inflamatorio _____	69
Tabla 13. Escala para cuantificación de vasos sanguíneos según su calibre _____	69
Tabla 14. Escala análoga visual para evaluar colágena total _____	70
Tabla 15. Escala análoga visual para evaluar colágenas tipo I y tipo III _____	70
Tabla 16. Asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C para los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico _____	73
Tabla 17. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos evaluados _____	76
Tabla 18. Tratamiento evaluado y propiedad respecto a la angiogénesis _____	89
Tabla 19. Evaluación histomorfológica del infiltrado celular en la zona de la lesión en relación con el tratamiento y el tiempo _____	91
Tabla 20. Evaluación histomorfológica de la arquitectura de la matriz colagénica en la zona de la lesión en relación con el tratamiento y el tiempo _____	97
Tabla 21. Evaluación histomorfológica de la distribución y proporción de las colágenas I y III en la zona de la lesión en relación con el tratamiento y el tiempo _____	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la piel _____	20
Figura 2. Epidermis _____	20
Figura 3. Epidermis, dermis e hipodermis _____	23
Figura 4. Cicatrización por primera intención _____	31
Figura 5. Cierre primario diferido _____	32
Figura 6. Cicatrización por segunda intención _____	32
Figura 7. Variaciones de los modelos <i>in vivo</i> de cicatrización en ratones _____	39
Figura 8. Capas de la piel en diferentes animales usados en la investigación de cicatrización _____	41
Figura 9. Estructura molecular de la pirfenidona _____	47
Figura 10. Corteza de cuachalalate _____	52
Figura 11. Árbol de cuachalalate _____	52
Figura 12. Estructura química del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y del ácido masticadienónico _____	53
Figura 13. Derivados anacárdicos de <i>A. adstringens</i> _____	54
Figura 14. Partes del ajo _____	55
Figura 15. Heridas excisionales en rata Wistar _____	64
Figura 16. Determinación del índice vascular _____	67
Figura 17. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido 3 α -hidroximasticadienónico que muestra su conformación molecular _____	74
Figura 18. Perspectiva del empaqueo de moléculas del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en la celda unitaria _____	74
Figura 19. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido masticadienónico que muestra su conformación molecular _____	75
Figura 20. Perspectiva del empaqueo de moléculas del ácido masticadienónico en la celda unitaria _____	75
Figura 21. Imágenes fotográficas representativas de la evolución del cierre de la herida de los diferentes grupos tratados _____	77
Figura 22. Fotografías representativas de la CAM para los distintos tratamientos _____	88
Figura 23. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo, mezcla y extracto de cuachalalate _____	92
Figura 24. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, ácido masticadienónico, ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácidos anacárdicos _____	93
Figura 25. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo y pirfenidona _____	94

Figura 26. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo y aceite ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate _____	95
Figura 27. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo, mezcla y extracto de cuachalalate _____	98
Figura 28. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, ácido masticadienónico, ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácidos anacárdicos _____	99
Figura 29. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo, y pirfenidona _____	100
Figura 30. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo y aceite ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate _____	101
Figura 31. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo, mezcla y extracto de cuachalalate _____	105
Figura 32. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, ácido masticadienónico, ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácidos anacárdicos _____	106
Figura 33. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo, y pirfenidona _____	107
Figura 34. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos del grupo control, vehículo, y aceite ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate _____	108

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de cierre de la herida del grupo control y vehículo _____	78
Gráfica 2. Porcentaje de cierre de la herida del grupo pirfenidona 8% y el vehículo _____	79
Gráfica 3. Porcentaje de cierre de la herida del grupo extracto hidroalcohólico al 70% de cuachalalate y el vehículo _____	80
Gráfica 4. Porcentaje de cierre de la herida del grupo ácido 3 α -hidroximasticadienónico y el vehículo _____	81
Gráfica 5. Porcentaje de cierre de la herida del grupo ácido masticadienónico y el vehículo _____	82
Gráfica 6. Porcentaje de cierre de la herida del grupo ácidos anacárdicos y el vehículo _____	82
Gráfica 7. Porcentaje de cierre de la herida de la mezcla de ácidos y el vehículo _____	83
Gráfica 8. Porcentaje de cierre de la herida de la mezcla ajo-extracto hidroalcohólico de cuachalalate 0.016% y el vehículo _____	84
Gráfica 9. Porcentaje de cierre de la herida de la mezcla aceite de ajo-extracto de cuachalalate 0.016%, vehículo y el extracto hidroalcohólico de cuachalalate _____	84
Gráfica 10. Cambio de peso de los diferentes tratamientos durante 15 días de tratamiento _____	85
Gráfica 11. Número de ramificaciones de vasos sanguíneos en modelo CAM para los distintos tratamientos _____	86
Gráfica 12. Número de vasos sanguíneos en modelo CAM de embrión de pollo para el grupo control y el vehículo _____	87
Gráfica 13. Gráfica de índice de epitelización de los diferentes tratamientos comparados contra el control durante los 15 días de evaluación _____	90
Gráfica 14. Gráfica de infiltrado inflamatorio de los diferentes tratamientos durante los 15 días de evaluación _____	90
Gráfica 15. Gráficos de colágena total de los diferentes tratamientos durante los 15 días de evaluación _____	96
Gráfica 16. Gráfica de colágena tipo I de los diferentes tratamientos durante los 15 días de evaluación _____	103
Gráfica 17. Gráfica de colágena tipo III de los diferentes tratamientos durante los 15 días de evaluación _____	103
Gráfica 18. Gráfica del contenido de vasos sanguíneos de los diferentes tratamientos a los 7 y 15 días de evaluación _____	109
Gráfica 19. Gráfica del contenido de vasos sanguíneos de acuerdo al calibre de los mismos de los diferentes tratamientos a los 7 días de evaluación _____	110
Gráfica 20. Gráfica del contenido de vasos sanguíneos de acuerdo al calibre de los mismos de los diferentes tratamientos a los 15 días de evaluación _____	110

RESUMEN

La cicatrización es un evento fisiológico importante que incluye diversas etapas (hemostasia/inflamación, proliferación y remodelación). Una cicatrización no apropiada tiene consecuencias notables, desde heridas que no cierran, cicatrices inmaduras, cicatrices patológicas (hipertróficas y queloides), así como disminución de la sensibilidad y riego sanguíneo que llevan a la necrosis del tejido, principalmente en las regiones más distantes del organismo.

La corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) ha sido utilizada tradicionalmente para el tratamiento de lesiones gástricas, cutáneas, lesiones de boca, afecciones renales, urinarias, ginecológicas, y como cicatrizante; sin embargo, hasta el momento no existe sustento científico de la actividad cicatrizante del extracto de esta planta o de sus metabolitos, por lo que en este trabajo se estudiaron dichas propiedades cicatrizantes, utilizando un modelo murino de heridas excisionales de espesor total en el dorso de rata Wistar.

Los compuestos evaluados fueron el extracto hidroalcohólico 70%, metabolitos aislados y purificados de la corteza de cuachalalate, cada uno por separado y una mezcla de los mismos, así también la combinación con otro producto natural (aceite de ajo) administrados tópicamente sobre las heridas durante un período de 15 días.

La evaluación macroscópica de las heridas se llevó a cabo por medio de la determinación del porcentaje de cierre y microscópicamente por análisis histomorfológico.

En los resultados obtenidos, se observó que las heridas tratadas con el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y con pirfenidona, presentaron mayor porcentaje de cierre al día 3 con respecto a los grupos control y con los otros tratamientos del cuachalalate ($p < 0.05$). El ácido 3 α -hidroximasticadienónico presentó un aumento considerable de colágena y un empaquetamiento celular con distribución semejante a lo normal. Por otra parte, al día 7, la mezcla de los ácidos anacárdicos y la pirfenidona presentaron un mayor porcentaje en el cierre ($p < 0.05$), con variaciones temporales relacionadas con el empaquetamiento de las fibras de colágena.

Los resultados obtenidos sugieren que algunos metabolitos del cuachalalate como el ácido 3 α -hidroximasticadienónico así como la mezcla de ácidos anacárdicos, poseen

un efecto importante sobre la zona de reparación de la herida cuando se administran tópicamente.

Mediante el método de CAM (membrana corioalantoidea de embrión de pollo), el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, la mezcla de los ácidos triterpénicos, así como la mezcla de ácidos anacárdicos presentan propiedades que favorecen la formación de vasos sanguíneos (proangiogénicos). Adicionalmente, la mezcla de ácidos anacárdicos presenta actividad antimicrobiana frente a patógenos comunes en heridas que pueden provocar infección y un tiempo de cicatrización notablemente elevado.

Con ello se puede concluir el uso potencial de los compuestos de cuachalalate para el tratamiento de heridas, que actúan a través de diversos estados patológicos, evitando así tasas de infección, disminuyendo la respuesta inflamatoria, favoreciendo la angiogénesis y proporcionando al paciente una cicatriz menos visible y más aceptable estéticamente.

INTRODUCCIÓN

Algunas plantas medicinales y los principios activos derivados de éstas, han demostrado beneficios para tratar las heridas cutáneas en diferentes modelos animales. No existen datos precisos para evaluar la extensión de la aplicación global de las plantas medicinales, no obstante, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerelle, 1993).

La piel humana es un órgano complejo que cumple la función de barrera contra patógenos externos, estímulos físicos y químicos, termorregulación, síntesis de vitamina D, etc., (Proksch et al., 2008; Summerfield et al., 2015). Al estar expuesta al medio ambiente, representa una importante protección física e inmunológica contra lesiones e infecciones (Summerfield et al., 2015). Por lo tanto, la interrupción de la integridad de la piel puede conducir a la pérdida de funciones esenciales (Zeng et al., 2018).

Las heridas pequeñas y superficiales van acompañadas de contracción de la piel y crecimiento de células, seguido del cierre y recuperación de la herida. Mientras que las heridas grandes generalmente tienen dificultad para cerrar, lo que puede provocar una infección grave y un tiempo de cicatrización prolongado, o inclusive pérdida de la funcionalidad, ya que implican el compromiso funcional de músculos y órganos, cuyo tratamiento más común son intervenciones quirúrgicas, representando una mayor problemática.

En los Estados Unidos de Norteamérica, el costo promedio para curar una herida es de \$ 3,927 dólares. Los colgajos y los injertos son los tratamientos de heridas más costosos, con un valor promedio de más de \$ 9,000 dólares por herida. En general, las heridas en la piel condujeron a un costo estimado de \$ 75 mil millones de dólares en atención médica directa y un costo indirecto de \$ 11 millones de dólares en los Estados Unidos en 2013 (Zeng et al., 2018).

El cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), es una planta de la familia Julianiaceae. Donde los árboles de esta especie son resinosos. Es un género

americano que se encuentra desde México hasta Perú, y la planta se conoce comúnmente como cuachalalate, quechalalatl o cuachalalá. Es cultivada en México en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos, Puebla, Jalisco, Michoacán, Colima y Estado de México (Olivera et al., 1999)

Es una planta medicinal comúnmente utilizada en México y su corteza se vende en casi todos los mercados del país, algunas personas le atribuyen propiedades curativas como cicatrizante, antibiótico, para disolver cálculos biliares y cálculos renales, para atenuar cólicos y fiebre, agente hipocolesterolemizante, antimalárico, antiinflamatorio, para tratamiento de cáncer del tracto digestivo y para curar úlceras gástricas (olivera et al., 1999). El efecto cicatrizante del cuachalalate se ha reportado desde 1832, donde se hace mención que causa una aceleración del proceso de cicatrización, además, se describe su uso tópico veterinario para lavar y curar las llagas de los caballos (Navarrete et al., 2009)

Con la finalidad de obtener evidencia experimental que permita el desarrollo de una alternativa terapéutica para el tratamiento de heridas al acelerar y/o mejorar el proceso de cicatrización y obtener una cicatriz estéticamente satisfactoria, en el presente trabajo se estudiaron las propiedades cicatrizantes del cuachalalate, tanto del extracto hidroalcohólico al 70% como de sus metabolitos puros, una mezcla de ellos, así como una mezcla de extracto de cuachalalate y aceite de ajo comercial, utilizando un modelo murino de heridas por escisión, análisis histomorfológico, el modelo CAM de embrión de pollo y la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias sobre diferentes bacterias, y de esta manera dar el sustento científico del uso tradicional de esta planta.

1. Marco Teórico

1.1 Anatomía y fisiología de la piel

La piel es el órgano más grande en el cuerpo humano, pesa aproximadamente 4 kg con una superficie promedio de 2 m² en el adulto. Desempeña múltiples funciones como barrera, para termorregulación y la transmisión de estímulos (Marks et al., 2019; Summerfield et al., 2015). La piel es multiestratificada, lisa, suave, resistente, flexible, elástica, extensible, turgente y húmeda. Tiene dos caras, la externa y la interna, unida al organismo, de modo que se encuentra sujeta a interacción tanto del medio externo como del interno. La superficie presenta entrantes y salientes, depresiones y orificios. El grosor y color es variable según factores raciales y genéticos, las regiones y la nutrición del individuo. El color además depende de varios factores, como la cantidad del pigmento melánico, la red vascular, la transparencia de las células epidérmicas e inclusive otros pigmentos como los carotenos y la hemosiderina. La piel y sus anexos proceden de dos capas embrionarias distintas: ectodermo y mesodermo (Tabla 1) (Amado, 2001).

Ectodermo	Epidermis Folículos pilosos Glándulas sebáceas y sudoríparas Uñas Melanocitos Nervios, células de Merkel Queratinocitos
Mesodermo	Tejido conjuntivo Músculo erector del pelo Vasos y células de la dermis (fibroblastos, mastocitos, histiocitos) Células de Langerhans

Desde el punto de vista histológico la piel se puede dividir en: epidermis, dermis, anexos y grasa subcutánea, la división se ejemplifica en la Figura 1 (Amado, 2001).

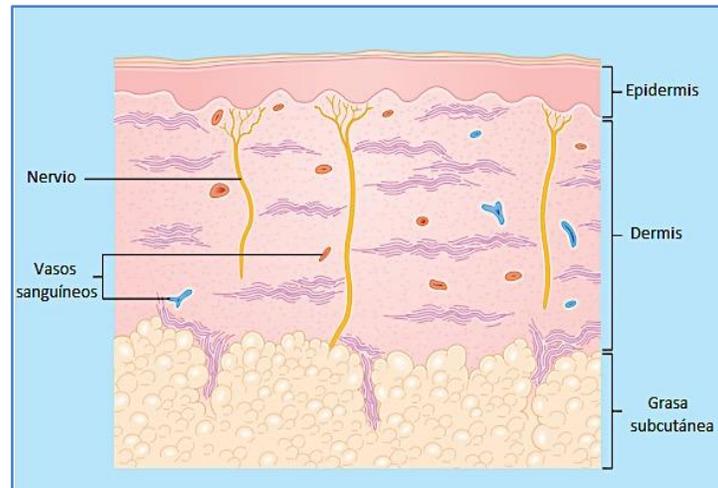


Figura 1. Anatomía de la piel (Marks et al., 2019).

1.1.1 Epidermis

Es la capa externa de la piel. La célula más abundante es el queratinocito (95% de las células que la constituyen). Se divide en cuatro capas principales según el estado de diferenciación de los queratinocitos: células basales, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo (en orden ascendente) (Figura 2) (Amado, 2001).

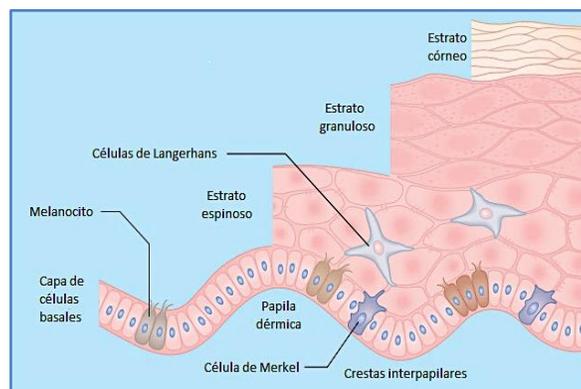


Figura 2. Epidermis (Marks et al., 2019).

1.1.1.1 Estrato basal o germinativo

El estrato basal está constituido de células cilíndricas basófilas, dispuestas perpendicularmente a la dermis, con mitosis y en constante proliferación. De trecho en trecho se observan células claras con núcleo pequeño llamadas melanocitos o

células claras de Masson. Las células basales reciben irrigación e inervación de los vasos y nervios de las papilas dérmicas y su continua diferenciación origina las otras capas celulares de la epidermis. Cada 5 a 10 queratinocitos se intercalan células dendríticas (células de Langerhans) y no dendríticas (células de Merkel). Las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos que provienen de la médula ósea y pertenecen al sistema de macrófagos-mononucleares; contienen gránulos o cuerpos raquetoides (de Langerhans o Birbeck). Las células de Merkel funcionan como mecanorreceptores y tienen relación con terminaciones nerviosas sensitivas (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

1.1.1.2 Estrato espinoso o de Malpighi

El estrato espinoso está compuesto por varias capas de células poliédricas, dispuestas en mosaico que tienen como característica llevar en su citoplasma unas fibrillas de pared a pared llamadas *tonofibrillas* que a nivel de la membrana parecen condensarse y formar un “puente” de célula a célula llamado *desmosoma*. Los desmosomas dan cohesión a la epidermis, cuando se destruyen, las células se separan y sufren importantes alteraciones (acantolisis). Las células espinosas también se unen a las basales por desmosomas y éstas a su vez presentan hacia su cara profunda, hemidesmosomas que se unen a la dermis. Las células espinosas contienen estructuras ovals cubiertas por una membrana (cuerpos de Odland) con grandes cantidades de lípidos y enzimas hidrolíticas (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

1.1.1.3 Estrato granuloso

El estrato granuloso está formado de células con granulaciones de queratohialina (precursor de la queratina) que han ido migrando de los estratos basales (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

1.1.1.4 Estrato lúcido

El estrato lúcido sólo está presente en piel muy gruesa, como las palmas de las manos y plantas de los pies, formado por eleidina (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

1.1.1.5 Estrato córneo

El estrato córneo es variable en su espesor desde 0.02 mm hasta 0.5 mm en las plantas de los pies, está constituido por hileras de células muertas, aplanadas, sin núcleo y llenas de tonofibrillas con alta concentración de grupos disulfuro contenidos en la queratina. Se distinguen dos partes, la parte más profunda o compacta conserva aún los desmosomas y la parte más superficial donde se rompen los desmosomas y las células se desprenden (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

La unión de la epidermis y la dermis no es plana, sino que presenta ondulaciones debido a las papilas dérmicas y las crestas inter-papilares epidérmicas. Entre la capa basal y la dermis se encuentra la membrana basal epidérmica. Ésta se divide en: a) membrana celular de la célula basal, b) lámina lúcida, contiene laminina y epiligrina, c) lámina densa y sub-lámina densa. Puede ser atravesada por diversas células y es muy importante, pues le da la cohesión necesaria a la piel y si se ve alterada se presentan problemas graves de separación de la dermis a la epidermis. En estas capas están presentes los antígenos que se involucran en dos enfermedades ampollosas: el penfigoide y la epidermólisis bulosa adquirida; entre otras (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

1.1.2 Dermis

Se clasifica en superficial, media y profunda. Compuesta de tejido conjuntivo, vasos, nervios y anexos cutáneos. Contiene tres clases de fibras proteínicas: colágenas que aporta su fuerza de tensión, reticulares y elásticas que proporcionan cohesión y elasticidad, unidas por una sustancia fundamental compuesta de glicosaminoglicanos y ácido hialurónico, la matriz, que provee unión y es el medio donde se realizan las funciones metabólicas, la difusión de nutrientes y oxígeno, y sirve como andamio para la migración celular en la reparación de heridas. Las fibras colágenas están formadas por una escleroproteína en cuya formación intervienen la hidroxiprolina y la hidroxilisina. La colágena está formada por diferentes subtipos genéticos del I al XXIX de acuerdo con su morfología, composición y propiedades. La colágena tipo I se encuentra en la dermis, piel, huesos, tendones y ligamentos; la II en cartílago; la III en piel fetal y la IV en membrana basal. Las células que la componen son: 1) fibroblastos, con núcleo fusiforme y en sus ribosomas se

producen las moléculas de colágena y otras proteínas reticulares, elásticas y sustancia intersticial; tienen funciones de proliferación y migración en respuesta a estímulos quimotácticos, mitógenos y citocinas, 2) miofibroblastos, involucrados en la contracción de heridas y tejido de granulación, 3) histiocitos, con gran movilidad, 4) mastocitos o células cebadas, productoras de histamina, heparina y otros mediadores de inflamación y células del torrente sanguíneo (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

La dermis superficial se llama papilar, es más laxa con fascículos delgados, orientados de manera perpendicular a la epidermis, la dermis media o reticular tiene fibras largas y densas y la dermis profunda formada por fibras gruesas horizontales (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

En la dermis en ocasiones se encuentran lobulillos de grasa y fibras musculares, como en la piel del escroto, así como el músculo erector del pelo (Figura 3) (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

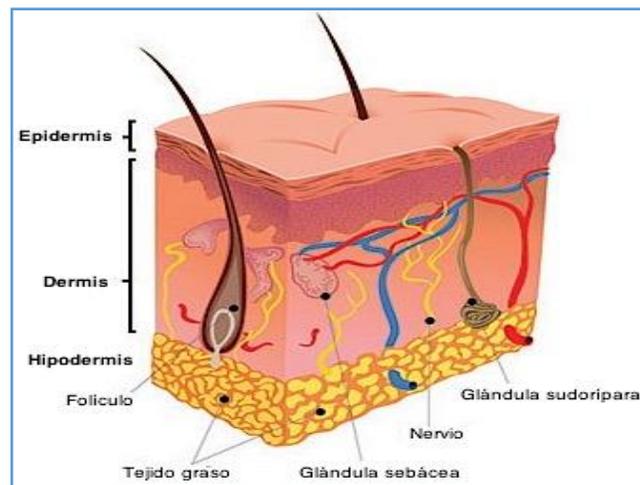


Figura 3. Epidermis, dermis e hipodermis. Tomado y modificado de <https://oushia.com/sabias-que-nuestra-barrera-con-el-exterior-esta-formada-por-celulas-muertas-pero-biologicamente-activas/capas-de-la-piel-humana/> (“Capas de la piel,” 2018)

1.1.3 Hipodermis

Es el tejido celular subcutáneo formado por adipocitos o células grasas que forman lobulillos separados por tabiques de tejido conjuntivo (Figura 3), su función es servir como reserva energética, aislantes de calor, amortiguación de traumatismos, función

endocrina (liberación de leptina), comunicación neurológica e incitador de células madre pluripotenciales (Amado, 2001; Marks et al., 2019).

2. Herida

Es la región anatómica donde queda interrumpida la continuidad celular, resultando en la pérdida local de fluidos, dolor por estímulos neurales y liberación de productos celulares a la circulación (Ramírez-Hernández, 2010). Puede variar desde un simple corte en la integridad del epitelio de la piel o puede ser más profundo, extendiéndose dentro del tejido subcutáneo con daño en otras estructuras como los tendones, músculos, vasos sanguíneos, nervios, órganos parenquimatosos e incluso huesos (Velnar et al., 2009).

3. Proceso de cicatrización

La cicatrización es un proceso biológico complejo que incluye una amplia gama de fases que involucran a la coagulación, inflamación, síntesis y depósito de la matriz, angiogénesis, fibroplasia, epitelialización, contracción y remodelación (Ribeiro et al., 2009). Es importante para mantener la integridad de la piel después de una lesión y así reducir infecciones, molestias y secuelas. Una aberración en la cicatrización, como la cicatrización excesiva de la herida (cicatriz hipertrófica y queloide), mala calidad (cicatrices retráctiles) o defectos en la cicatrización como una herida crónica (úlceras) afectan la función física normal y traen consigo problemas estéticos. La cicatrización es un proceso importante y complicado que se rige por fases secuenciales pero superpuestas, que incluyen: fase de hemostasia/inflamación, fase de proliferación y fase de remodelación (Senet, 2008; Wang et al., 2018). En el proceso de cicatrización intervienen numerosos factores de crecimiento generados por las células implicadas en el proceso, lo que conduce a la reparación del tejido lesionado, en la Tabla 2 se muestran los principales de ellos, así como las células productoras (Senet, 2008).

Tabla 2. Principales actividades de los factores de crecimiento durante la cicatrización cutánea (Senet, 2008):

	Células productoras	Actividad
TGF β	Plaquetas, macrófagos, linfocitos, fibroblastos	Proliferación de los fibroblastos y de las células endoteliales, síntesis de matriz extracelular
PDGF	Plaquetas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos	Migración y proliferación de los fibroblastos, síntesis de colágena Quimiotáctico para neutrófilos y monocitos
bFGF (FGF2)	Queratinocitos, fibroblastos, plaquetas	Angiogénesis Epitelización
VEGF	Queratinocitos, macrófagos, plaquetas	Angiogénesis
KGF (FGF 7)	Fibroblastos	Migración y proliferación de los queratinocitos
EGF	Plaquetas, queratinocitos, macrófagos	Migración y proliferación de los queratinocitos Proliferación de las células endoteliales y de los fibroblastos

3.1 Fase hemostasia/inflamatoria

La fase hemostasia/inflamatoria se produce inmediatamente después de la lesión con la consiguiente pérdida de plasma, células y factores hacia el intersticio. La hemostasia se inicia con la activación de los elementos celulares de la sangre y lleva a la formación del coágulo o tapón hemostático, proceso en el cual interfiere la cascada de los factores de la coagulación y el fenómeno de agregación plaquetaria. El factor esencial en la fijación de las plaquetas es el de von Willebrand, una glicoproteína perteneciente a la familia de las integrinas. Los neutrófilos y los macrófagos son las células que van a luchar contra la infección y producen la generación de radicales libres. En esta fase, las plaquetas y los macrófagos son las fuentes principales de citocinas y factores quimiotácticos (Ramírez-Hernández, 2010; Senet, 2008). Esta fase puede ser dividida en dos eventos principales: la respuesta vascular y la respuesta celular (Ramírez-Hernández, 2010; Senet, 2008).

3.1.1 La respuesta vascular: hemostasia y coagulación

Las diferentes cascadas de coagulación son iniciadas por factores de coagulación de la piel lesionada (sistema extrínseco) y los trombocitos se activan para la agregación por medio de la colágena extravascular (sistema intrínseco). Los vasos lesionados sufren una vasoconstricción durante 5 a 10 minutos desencadenada por las plaquetas, para reducir la pérdida de sangre y llenar el espacio con un coágulo sanguíneo compuesto de citocinas, así como moléculas de fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondinas formando una matriz provisional para la migración de leucocitos, fibroblastos y células endoteliales. Seguido a la vasoconstricción continúa una vasodilatación que permite que las células circulantes lleguen al foco de la herida. Las plaquetas influyen en la infiltración de leucocitos mediante la liberación de factores quimiotácticos (Reinke et al., 2012).

Tanto las plaquetas como los leucocitos liberan citocinas y factores de crecimiento para activar el proceso inflamatorio (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α), estimular la síntesis de matriz (FGF-2, IGF-1, TGF- β), activar la transformación de fibroblastos a miofibroblastos (TGF- β), iniciar la angiogénesis (FGF-2, VEGF-A, HIF-1 α , TGF- β) y apoyar el proceso de reepitelización (EGF, FGF-2, IGF-1, TGF- α) (Reinke et al., 2012).

3.1.2 La respuesta celular: Inflamación

La fase inflamatoria se activa durante la hemostasia y la fase de coagulación. Puede dividirse en una fase temprana con reclutamiento de neutrófilos y una fase tardía con la aparición y transformación de monocitos. Los neutrófilos se reclutan en el sitio de la lesión y están presentes durante 2-5 días a menos que la herida se infecte, esto debido a la respuesta de la vía activada del complemento, a las plaquetas desgranuladas y a los subproductos de la degradación bacteriana (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

El trabajo de los neutrófilos es crucial durante los primeros días después de la lesión, por su capacidad fagocítica y la secreción de proteasas que elimina las bacterias locales y ayuda a degradar el tejido necrótico, además, liberan mediadores como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que amplifican la respuesta inflamatoria y estimulan VEGF e IL-8 para una respuesta de reparación adecuada. Comienzan su desbridamiento

mediante la liberación de sustancias antimicrobianas altamente activas (péptidos catiónicos y eicosanoides) y proteinasas (elastasa, catepsina G, proteinasa 3 y un activador del plasminógeno tipo urocinasa). Aproximadamente 3 días después de la lesión, los macrófagos entran en la zona de la lesión y apoyan el proceso en curso mediante la fagocitosis de patógenos, restos celulares y células apoptóticas, secretando citocinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α , promoviendo la resolución de la inflamación. Además de sus funciones inmunológicas como células presentadoras de antígenos durante la reparación de heridas, los macrófagos desempeñan un papel integral mediante la síntesis de numerosos factores de crecimiento tales como TGF- β , TGF- α , FGF básico, PDGF y VEGF, que promueven la proliferación celular y la síntesis de moléculas de la matriz extracelular (MEC) para la restauración de los tejidos. Algunas interleucinas (p.ej. IL-1) y el TNF- α producidos por los neutrófilos y macrófagos estimulan la síntesis de óxido nítrico, que contribuye a la actividad antiinfecciosa en la herida, ejerce una función inmunomoduladora y estimula la proliferación y migración de queratinocitos. La respuesta inflamatoria es esencial para el suministro de citocinas, responsables de los movimientos celulares y tisulares, cruciales para los mecanismos de reparación. Existe evidencia de que la cantidad de inflamación determina el grado de formación de la cicatriz (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

3.2 Fase proliferativa

En la fase de proliferación (aproximadamente del día 3-10 después de la herida) el objetivo principal consiste en cubrir la superficie de la herida, formar tejido de granulación y restaurar la red vascular. Por lo tanto, junto a la migración de fibroblastos locales a lo largo de la red de fibrina y comienzo de la reepitelización desde los bordes de la herida, hay otros eventos como neo-vascularización y angiogénesis. La base de la nueva matriz de tejido conjuntivo es dada bajo el control de citocinas reguladoras como IGF-1, EGF, TNF- α , IFN- γ , el TGF- β y el PDGF-BB, que sirven para la migración y proliferación de fibroblastos. La síntesis de colágena aumenta a lo largo del tiempo de reparación de la herida, mientras que la proliferación de fibroblastos disminuye sucesivamente, ajustando el equilibrio entre la síntesis y la degradación de la MEC (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

3.2.1 Angiogénesis / neovascularización

La restauración del sistema vascular de la piel es una cascada compleja de eventos celulares, humorales y moleculares en el lecho de la herida. Los iniciadores son factores de crecimiento, como son: factor de crecimiento endotelial vascular(VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y la serin proteasa trombina.

Las citocinas angiogénicas durante la cicatrización son el bFGF, sintetizado por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales; el factor de crecimiento transformante β (TGF β), las angiopoyetinas, VEGF y PDGF. La expresión en las células endoteliales de los receptores de la familia de las integrinas, en especial el $\alpha\beta_3$, receptor para la fibrina y la fibronectina, son indispensable para la angiogénesis. La hipoxia tisular también estimula la angiogénesis, a la que también contribuyen las proteasas que degradan la matriz extracelular.

Las células endoteliales activadas secretan enzimas proteolíticas que modifican la lámina basal, por lo tanto, las células endoteliales ahora pueden proliferar y migrar hacia la herida. Además, liberan metaloproteinasas de matriz lisando el tejido circundante para la proliferación endotelial en curso. Los brotes recién construidos forman pequeños canales tubulares que se interconectan a otros. A partir de entonces, los nuevos vasos se diferencian en arterias y vénulas y maduran mediante una estabilización adicional de la pared de sus vasos mediante el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso. Finalmente, el flujo sanguíneo completa el proceso angiogénico (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

3.2.2 Formación del tejido de granulación

El último paso en la fase de proliferación es el desarrollo del tejido de granulación agudo, en este tiempo, la fase de remodelación ya inició. El tejido transicional, reemplaza la matriz provisional de la herida basada en fibrina/fibronectina y puede producir una cicatriz por maduración. Además, se caracteriza por una alta densidad de fibroblastos, granulocitos, macrófagos, capilares y haces de colágena poco organizados. Como resultado, aparece con un enrojecimiento clásico y puede traumatizarse fácilmente. Las células dominantes en esta fase son los fibroblastos, que sintetizan una nueva matriz extracelular que en un principio está formada sobre

todo por colágena III y colágena I, fibronectina y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán y sulfato de heparán), fibronectina y proteoglicanos. También participan en la remodelación de la matriz a través de la producción de enzimas proteolíticas, entre las cuales destacan las metaloproteinasas (colagenasa o MMP-1, gelatinasa o MMP-2, estromelisinina o MMP-3). La formación de la MEC representa otro paso importante, ya que proporciona un andamio para la adhesión celular y críticamente regula y organiza el crecimiento, movimiento y la diferenciación de las células dentro de ella. El fibroblasto es, por lo tanto, el precursor de la matriz provisional de la herida y en la que tiene lugar la migración celular y la organización respectiva. Al final de esta fase, el número de fibroblastos en maduración se reduce por la diferenciación a miofibroblastos y termina con su apoptosis consecutiva (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

3.2.3 Reepitelización

El proceso de reepitelización está regulado por los queratinocitos en los bordes de la herida y por las células troncales epiteliales de los folículos pilosos o las glándulas sudoríparas. Este proceso se activa mediante rutas de señalización de células epiteliales y no epiteliales que liberan diferentes citocinas y factores de crecimiento. El óxido nítrico (NO) y los factores de crecimiento de la familia del EGF, el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) y los TGF α y β son los más importantes durante la fase de epitelización, es decir, de la adherencia de los queratinocitos, así como de la reconstrucción de la unión dermoepidérmica.

La inhibición por contacto y la tensión física en los desmosomas y hemidesmosomas produce mediadores lipídicos y activa cinasas asociadas a la membrana (SRC cinasas) dando como resultado una permeabilidad incrementada de las membranas para iones, como el calcio. Esto muestra una señal de iniciación a las células en los bordes de la herida con una retracción y reorganización de sus tonofilamentos intracelulares en la dirección de la migración (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

Mediante la disolución enzimática de los desmosomas, a través de la colagenasa y la elastasa, los queratinocitos activados migran a lo largo del coágulo de fibrina preformado en las capas superiores del tejido de granulación, a lo largo de un

gradiente quimiotáctico establecido por mediadores como IL-1, y sobre una matriz rica en fibronectina en el centro de la herida. La migración se rige mediante la polimerización de las fibras de actina del citoesqueleto y la formación de una adhesión focal en la MEC mediada por integrinas. Estos mecanismos del citoesqueleto están regulados por Rho GTPasas (Rho, Rac, Cdc42). Las GTPasas son los cambiadores de la organización intracelular de las fibras y son esenciales para un proceso de epitelización, así como para la terminación de la migración. Este proceso continúa hasta que las células migratorias se tocan entre sí, entonces, las GTPasas disminuirán su expresión lo que lleva a una reorganización del citoesqueleto. La integración del epitelio opuesto se realiza por una degradación de las fibras de actina que son sustituidas por contactos de adherencia intercelular para finalmente cerrar la herida (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

3.3 Fase de remodelación

La remodelación es la última fase de la cicatrización. La formación de tejido de granulación se detiene a través de la apoptosis de las células. Durante la maduración de la herida, los componentes de la MEC sufren ciertos cambios. La colágena III, que se produjo en la fase proliferativa, ahora se reemplaza por colágena I más fuerte. Este tipo de colágena está orientada en pequeños haces paralelos y, por lo tanto, es diferente de la colágena de tejido de la dermis sana. Posteriormente, los miofibroblastos causan contracciones de la herida debido a su múltiple adhesión a la colágena y ayudan a disminuir la superficie de la cicatriz en desarrollo.

Asimismo, los procesos angiogénicos disminuyen, el flujo sanguíneo de la herida disminuye, y la actividad metabólica de la herida se reduce y finalmente se detiene. Existen ciertos componentes de la piel que nunca se recuperarán por completo después del cierre de la herida, a diferencia de la curación de heridas fetales, los apéndices sub-epidérmicos como los folículos pilosos o las glándulas sudoríparas no tienen potencial para sanar o volver a crecer después de una lesión grave.

La epidermis de la cicatriz resultante difiere de la piel ilesa después de la cicatrización debido a la falta de papilas que normalmente están ancladas en la matriz subyacente del tejido conjuntivo y son responsables de la estrecha conexión

de la epidermis con la dermis (Proksch et al., 2008). La resistencia de la cicatriz al estiramiento después del proceso de cicatrización es de alrededor del 15% de la que observa en la piel normal . La remodelación de la matriz incrementa de manera considerable la resistencia de la cicatriz, que alcanza el 80-90% de su fuerza final hacia la 6ª semana (Reinke et al., 2012; Senet, 2008).

4. Tipos de cicatrización

4.1 Cicatrización por primera intención

La cicatrización por primera intención ocurre en heridas con bordes limpios y definidos, sucede cuando los bordes de la herida de grosor completo se aproximan poco después de que se ha creado la herida primaria. Es la manera ideal de tratar una herida. La epitelización y la contracción tienen poco que ver, aunque se produce una epitelización mínima dentro de las 24 horas y se sella la herida de contaminación bacteriana (Carrico et al., 1984).

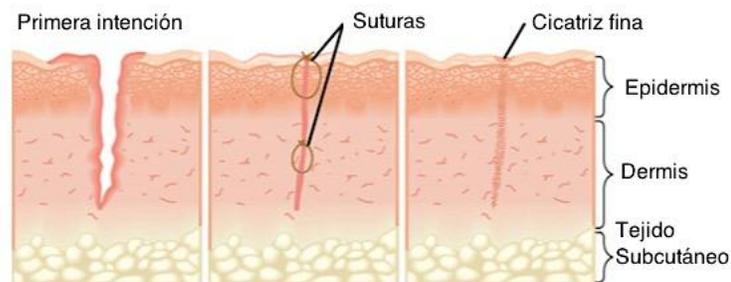


Figura 4. Cicatrización por primera intención. Tomado y modificado de <https://nursekey.com/skin-integrity-and-wound-care/>

4.2 Cierre primario diferido

En este tipo de cierre, la herida se encuentra muy contaminada y por lo tanto el cierre se retrasa, lo que permite tiempo para respuestas inflamatorias e inmunes del huésped para controlar la infección. Se disminuye la morbilidad por infección de la herida mientras que el desarrollo de la fuerza de la herida permanece intacta (Carrico et al., 1984).

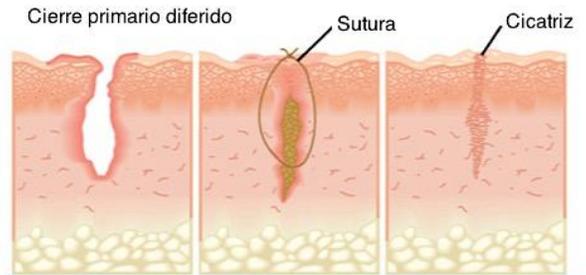


Figura 5. Cierre primario diferido. Tomado y modificado de <https://nursekey.com/skin-integrity-and-wound-care/>

4.3 Cicatrización por segunda intención

Esto se realiza mediante procesos biológicos naturales sin intervención quirúrgica, que generalmente ocurre en heridas grandes asociadas con la pérdida de piel o tejido blando. Aunque la epitelización y el depósito de colágena están involucrados, la contracción es el fenómeno más importante en el cierre espontáneo de grandes heridas abiertas. A menos que ocurra una contracción y se unan las estructuras dérmicas, la superficie de granulación estará cubierta solo por una capa de células epiteliales que son inútiles para proporcionar cobertura con fuerza e integridad, Como es lógico, estas heridas tardarán más para cicatrizar y la cicatriz será de mayor tamaño y por tanto menos estética (Carrico et al., 1984).



Figura 6. Cicatrización por segunda intención. Tomado y modificado de <https://nursekey.com/skin-integrity-and-wound-care/>

5. Microbiología de las heridas

Las heridas abiertas han perdido su barrera protectora de la piel y pueden ser invariablemente colonizadas por microorganismos. La contaminación se define como la presencia de organismos no replicantes dentro de una herida, mientras que la colonización es definida como la presencia de organismos replicantes en la herida provocando daño tisular local (Izadi et al., 2005).

Una biopelícula bacteriana puede definirse como una comunidad compleja de bacterias incrustadas dentro de una matriz de sustancia polimérica extracelular fabricada por ellas mismas, es un complejo estructural y dinámico que proporciona a las bacterias un entorno idóneo que les permite que sobrevivan y se desarrollen en las heridas crónicas y que afectan la cicatrización en el 60% de las heridas de la piel (Seth et al., 2012; Brandenburg, et al., 2018). La resistencia a antibióticos por parte de las bacterias en la biopelícula, contribuye a la cronicidad de las infecciones. A diferencia de las heridas agudas, todas las heridas crónicas contienen un nivel tisular de flora microbiana (Izadi et al., 2005).

Una infección puede alterar el proceso de cicatrización al prolongar la fase inflamatoria, entre otros efectos, por acción de las enzimas bacterianas que además degradan la fibrina y factores de crecimiento que son esenciales para que se lleve a cabo. Ciertos factores como la inmunosupresión, la desnutrición y la hipoxia, pueden aumentar la probabilidad de infección de heridas (Izadi et al., 2005).

La disminución de una adecuada cicatrización se asocia con una carga bacteriana de más de 10^5 bacterias por gramo de tejido (Howell-Jones et al., 2005).

Patógenos específicos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativos, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp., son los principales causantes de efectos adversos sobre la cicatrización de heridas. Las características de algunas de ellas se muestran en la Tabla 3 (Clinmicrorevs et al., 2016; Howell-Jones et al., 2005).

Tabla 3. Características principales de algunos patógenos específicos

Bacteria	Descripción, clasificación y patogenicidad
<i>Staphylococcus aureus</i>	<p>Bacteria Gram-positiva, sin motilidad, no formador de esporas, anaerobia facultativa, catalasa positivo (Karsten et al., 2011). Su capacidad patogénica se agrava por la adquisición de resistencia a múltiples antibióticos y otros agentes con capacidad antimicrobiana, al actuar a nivel intracelular, tiene potencial para evadir la respuesta inmune, presentándose serios casos de infección e incrementando las medidas de prevención y tratamiento (Becker, 2018). Colonizador común de la piel humana, también presente en diferentes animales. Presente en área nasofaríngea, piel, tracto vaginal, y el intestino. Causa infecciones piogénicas y/o sistémicas que pueden afectar a todos los órganos y sistemas, y enfermedades mediadas por toxinas, ambas a menudo con graves consecuencias. Las infecciones cutáneas y de tejidos blandos son las más frecuentes y otras importantes incluyen infecciones de heridas, mastitis, meningitis, neumonías, infecciones óseas y articulares (Becker, 2018).</p>
<i>Streptococcus mutans</i>	<p>Coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico. Su hábitat natural es la boca humana, adhiriéndose muy cerca de la superficie del diente y en lesiones cariosas (Ojeda et al., 2013). Es capaz de adquirir nuevas propiedades que permiten la expresión de patogenicidad y virulencia (Krzyściak et al., 2014). La interacción de <i>S. mutans</i> con componentes del huésped (plaquetas, macrófagos, proteínas de la MEC) puede interferir con la función normal del sistema inmune y aumentar la inflamación, lo que produce un retraso en la reparación de los tejidos y la homeostasis. <i>S. mutans</i> posee proteínas de superficie con propiedades de unión al colágeno: la adhesina superficial SpaP, la proteína A asociada a la pared celular (WapA), Cnm y Cbm que son importantes factores de virulencia en infecciones sistémicas ya que otorgan a <i>S. mutans</i> la capacidad de unirse a prácticamente cualquier sitio de tejido que contenga colágeno expuesto y colonizarlo, exacerbando la patología de la enfermedad al bloquear los mecanismos de reparación de los tejidos y causando una disfunción endotelial. La expresión de proteínas de unión a colágeno (CBP) permite a <i>S. mutans</i> evadir la respuesta inmune y la eficacia de ciertos tratamientos antimicrobianos a menudo dando como resultado infecciones profundas y persistentes (Avilés-Reyes et al., 2017).</p>

Tabla 3. Características principales algunos patógenos específicos (continuación).

Bacteria	Descripción, clasificación y patogenicidad
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo Gram negativo, no formador de esporas, causante de múltiples enfermedades. Patógeno oportunista que es uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales y potencialmente mortales en pacientes con fibrosis quística (FQ), quemaduras, infecciones del tracto urinario (ITU), infecciones de la piel, infecciones pulmonares, infecciones gastrointestinales, y otras, especialmente en pacientes con quemaduras graves, y pacientes inmunocomprometidos, como aquellos con cáncer o SIDA. Debido a que posee un gran número de factores patogénicos, esta bacteria muestra una alta resistencia a los antibióticos más comunes, por lo que es difícil de tratar y limita las opciones terapéuticas (Mohd et al., 2018;Nithya et al., 2013).
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos Gram-negativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales, involucrada en problemas gastrointestinales, meningitis neonatal, infecciones de tejidos blandos, respiratorias y de la piel, infecciones postoperatorias, prostatitis e infecciones intraabdominales, cualquiera de los cuales puede conducir a bacteriemia y sepsis (Poolman, 2016). La prevalencia de cepas de <i>E. coli</i> multirresistentes está aumentando en muchos países siendo un peligro importante para la salud humana. Se estima que las infecciones de <i>E. coli</i> resistentes a los antibióticos representan la mitad de la carga mundial de infecciones resistentes cada año (Poolman, 2016)

En las infecciones multirresistentes es menos probable que las bacterias respondan al tratamiento, que requieran antibióticos adicionales y más costosos, tengan más probabilidades de resultar en hospitalización o prolongar la hospitalización, aumento en las complicaciones infecciosas, lo que conlleva a un problema potencialmente letal, costoso y en aumento mundialmente (Poolman, 2016). Uno de los principales problemas asociados a las infecciones, es la aparición de resistencia a antibióticos de uso común, debido principalmente a su abuso e inadecuada utilización, se han generado microorganismos multirresistentes, con importantes repercusiones en los pacientes y en los sistemas de salud, aparición de brotes epidémicos, elevación de la morbilidad y mortalidad, así como de los costos (Cervantes-García et al., 2014).

Actualmente, los investigadores se han centrado en alternativas novedosas, como extractos de plantas y numerosos compuestos medicinales derivados de plantas

biológicamente activas, ya que se han utilizado durante miles de años como tratamientos tradicionales para las infecciones humanas (Dolatabadi et al., 2018).

5.1 Pruebas antimicrobianas

Los objetivos de las pruebas antimicrobianas son detectar la resistencia de patógenos comunes a fármacos y compuestos de elección para infecciones particulares. Los métodos de prueba más utilizados incluyen la microdilución en caldo así como métodos rápidos de instrumentos automatizados. Los métodos manuales que proporcionan flexibilidad y ahorro de costos incluyen el método de difusión en disco y métodos de dilución. Cada método tiene sus puntos fuertes y debilidades, incluyendo organismos que pueden ser probados. Algunos métodos proporcionan resultados cuantitativos (p. ej., concentración inhibitoria mínima CMI), y todos proporcionan evaluaciones cualitativas de los microorganismos utilizando las categorías susceptibles, intermedias, o resistente (Reller et al., 2009).

6. Modelos para evaluar cicatrización

La búsqueda de nuevas terapias en la cicatrización de heridas se basa en varios modelos de laboratorio, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos modelos nos permiten comprender mejor la biología básica de la cicatrización de heridas normales y patológicas, necesario para la investigación de la seguridad y eficacia de un producto durante el desarrollo de terapias biológicas específicas para uso clínico; son útiles para definir parámetros farmacocinéticos, selección de indicaciones clínicas, determinación de formulaciones apropiadas y análisis de agentes individuales y combinaciones de agentes (factores de crecimiento); para usarlos de manera efectiva, es importante entender qué información puede proporcionar cada uno y cuáles son sus limitaciones. (Gottrup et al., 2000).

Un modelo se define como "una representación de un objeto real o verdadero" (Gottrup et al., 2000). La búsqueda de nuevas terapias en la cicatrización de heridas se basa en una serie de modelos de laboratorio, tanto *in vitro* como *in vivo*, que nos permiten comprender mejor el cierre de heridas normales y patológicas. Los modelos *in vitro* sirven para aislar elementos específicos del proceso de cicatrización (generalmente cultivos celulares de fibroblastos, queratinocitos, macrófagos y

células endoteliales o cultivos de órganos) y estudiarse en un sistema más simple que permite interpretar más fácilmente los resultados (Boyko et al., 2017; Gottrup et al., 2000).

6.1 Modelos *in vitro*

Son generalmente rápidos, simples, menos costosos e implican consideraciones éticas mínimas en comparación con los modelos de heridas *in vivo*. Se pueden investigar simultáneamente varios agentes farmacológicos o factores a diferentes concentraciones sin la heterogeneidad inherente de los modelos *in vivo*. Son apropiados para estudiar el mecanismo de acción, eventos celulares y moleculares de un compuesto, pero ya que son modelos altamente artificiales, la última prueba de un agente cicatrizante requiere replicación y validación en estudios con animales. Los modelos *in vitro* se pueden dividir en sistemas individuales o multicelulares y cultivos de órganos (Tabla 4) (Boyko et al., 2017; Gottrup et al., 2000).

Tabla 4. Modelos <i>in vitro</i> de cicatrización usados en investigación (Gottrup et al., 2000)	
Tipo de Modelo	Parámetros a estudiar
Sistemas de células individuales	
Monocapas	Migración, proliferación, síntesis de proteínas
Tridimensional	Interacciones célula-matriz, migración, proliferación, síntesis de proteínas, contracción de la herida
Sistemas multicelulares	
Co-cultivos	Interacciones célula-célula
Tridimensional	Interacciones célula-matriz, interacciones célula-célula, migración, proliferación, síntesis de proteínas, contracción de la herida
Cultivo de órganos	
Piel intacta	Epitelización, fuerza tensil, morfología

6.2 Modelos *in vivo*

Existe una gran variedad de especies que se han utilizado en estudios de cicatrización de heridas por su parecido con la piel de los humanos (Figura 8), se ha utilizado la piel de mamíferos como rata, ratón e inclusive cerdo. Sin embargo, a pesar de la misma estructura básica, tienen características de cicatrización

diferentes, los modelos de cicatrización *in vivo* los podemos clasificar en modelos de no mamíferos (Tabla 5) y modelos de mamíferos (Boyko et al., 2017).

Tabla 5. Modelos <i>in vivo</i> de cicatrización usados en investigación		
Modelos de no mamíferos		
Modelo	Ventajas	Desventajas
Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	DNA completamente secuenciado, tiempos de regeneración rápidos y grandes cantidades de progenie (Boyko et al., 2017).	Piel compuesta de una capa de células epidérmicas, carecen de sistema circulatorio, miofibroblastos y folículos capilares (Boyko et al., 2017).
Nemátodo (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Genoma bien estudiado, tiempo de generación rápido, conocimiento sobre el linaje de todas las células, facilitando estudios sobre células involucradas en la respuesta al daño (Boyko et al., 2017).	Epidermis de epitelio simple sobre una lámina basal y secreta una cutícula colágena flexible (Boyko et al., 2017).
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Alta fecundidad y desarrollo y costo para su crianza y reproducción son bajos (Vargas-Vargas et al., 2017). Su piel consiste de fibroblastos, y una epidermis compuesta de queratinocitos. Disponibilidad para visualizar el proceso de cicatrización en tiempo real mediante videograbación (Santos, 2011).	Falta de anticuerpos contra las proteínas de superficie, dificultad del establecimiento de ciertos cultivos celulares (Santos, 2011).
Anfibios como axolotl, tritón y salamandra	Notable capacidad para regenerar tejido perdido o dañado, y lo hacen sin formación de cicatriz aparente, incluso después de la amputación, pueden regenerar una extremidad completamente funcional (Boyko et al., 2017).	

6.3 Modelos de mamíferos

Los ratones son los animales más populares en los que se llevan a cabo experimentos de cicatrización. Son fáciles de manejar, económicos y tienen un ciclo de vida corto. La principal diferencia entre la piel del ratón y la humana es que los ratones poseen un panículo carnoso, que es una capa delgada de músculo esquelético situada entre la grasa subcutánea y la dermis, un equivalente del cual

sólo está presente en el platisma del cuello humano. Como resultado, los ratones curan las heridas escisionales más por contracción que por reepitelialización, mientras que ocurre lo contrario en los humanos. Una estrategia para asemejarlo al humano es suturar los bordes de la herida a un anillo de silicona, forzando a la herida a cicatrizar principalmente por reepitelización (Boyko et al., 2017).

Existen variaciones de la herida incisional o de escisión básica para permitir el estudio de elementos específicos de curación de heridas. En la Figura 7 se muestran algunas de ellas, a) heridas por escisión, b) implantación de una cámara en la herida, c) modelo de úlcera por presión con aplicación de imanes, d) modelo de colgajo isquémico y e) modelo de cicatrización hipertrófica con dispositivo de distracción (Boyko et al., 2017).

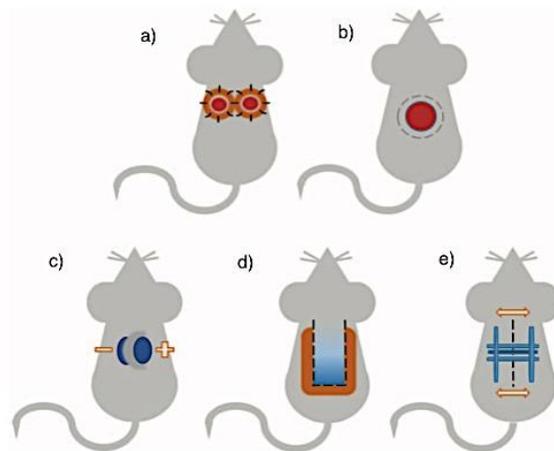


Figura 7. Variaciones de los modelos in vivo de cicatrización en ratones. Tomado y modificado de (Boyko et al., 2017).

Los modelos de heridas incisionales y escisionales se pueden reproducir con precisión y están disponibles para múltiples investigaciones, la forma de la herida depende del propósito del estudio, son empleados para investigar el proceso de cicatrización de heridas y la influencia de diferentes agentes tópicos, sistémicos y locales, así como también de apósitos (Gottrup et al., 2000).

En los modelos de herida escisional se retira una parte de piel de espesor total (como se encuentra a menudo en la práctica clínica); en la mayoría de los casos se usa la parte posterior del animal, aunque también se emplean las orejas. En los

humanos se emplean biopsias para su estudio. Se puede evaluar epitelización, contracción, reconstitución dérmica, inflamación, quimiotaxis, angiogénesis, producción/organización de la matriz y cosmética funcional. La lesión se puede observar y cuantificar mediante el cambio de área seguida de histología, aunque su principal desventaja es que la herida sana tanto por los bordes como por la contracción. Muchas de las especies utilizadas para este tipo de investigación (ratón, rata, conejo y hámster) tienen un panículo carnoso subcutáneo, que contribuye al proceso de reparación (a través de la contracción y la formación de colágena). La especie de laboratorio con la distribución de la piel considerada más cercana a los seres humanos es el cerdo, tanto en espesor como en estructura, por lo que se pueden estudiar quemaduras, heridas isquémicas y heridas por escisión e incisión, que junto con la rata, han sido las especies estándar para estas investigaciones. Sin embargo, el cerdo tiene la desventaja de una cicatrización y contracción muy rápida, son grandes y costosos para mantener, lo que los hace útiles únicamente para ensayos preclínicos finales (Boyko et al., 2017).

En los modelos de herida incisional, las heridas pueden hacerse en cualquier parte de la superficie del cuerpo, así como en la mayoría de los órganos (retina, tendones, fascia, dentro de las cavidades corporales, etc.), en ellos se realiza el análisis del desarrollo de la resistencia a la rotura (resistencia biomecánica), ya sea fisiológicamente o cuando está influenciado por agentes locales o sistémicos; también permite investigaciones de parámetros bioquímicos, contenido de colágena e histología (Boyko et al., 2017; Gottrup et al., 2000).

En el modelo de implantación de esponjas de polivinilo, poliuretano y celulosa, alcohol polivinílico o cámaras de malla de alambre de acero inoxidable en un bolsillo subcutáneo, crea un espacio muerto que se sella con tejido de granulación que se desarrolla en la periferia, y se pueden analizar factores de crecimiento, hormona del crecimiento, agentes farmacológicos, etc., y medirse mediante análisis histológico, histoquímico y bioquímico. Las ventajas de estas cámaras incluyen la capacidad de muestreo frecuente (durante más de cuatro semanas e incluso durante varios meses) y recolección de grandes cantidades de fluido de la herida y tejido de granulación. La desventaja es su tamaño y el tiempo requerido para obtener tejido

de granulación, suelen usarse roedores, principalmente ratas (Boyko et al., 2017; Gottrup et al., 2000).

Los primates, típicamente monos *Rhesus*, ofrecen una aproximación muy cercana a la piel humana, debido a que su gestación es similar a la de los humanos, se han utilizado en algunos de los estudios iniciales que documentan la capacidad de la piel fetal para cicatrizar sin dejar cicatrices en contraste con la piel adulta normal (Boyko et al., 2017).

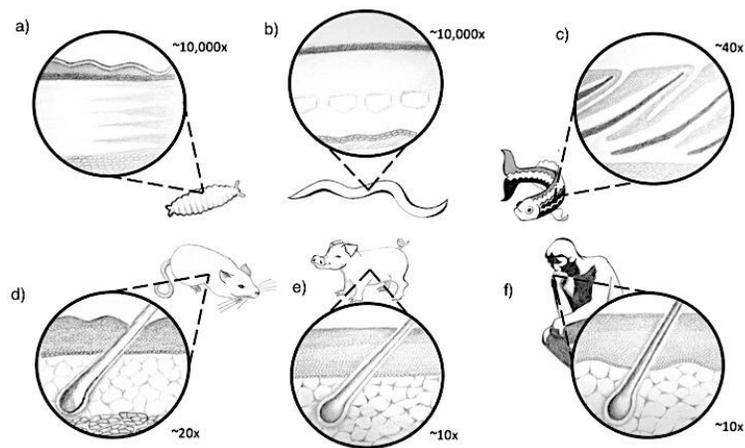


Figura 8. Ilustración de las capas de la piel en diferentes animales usados en la investigación de cicatrización a) larva de *Drosophila melanogaster*, b) *Caenorhabditis elegans*, c) pez cebra, d) ratón, e) cerdo y f) humano. Tomado y modificado de (Boyko et al., 2017).

6.4 Modelos angiogénicos

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente (Martínez-Ezquerro et al., 2006). Este proceso es una parte de las respuestas fisiológicas normales, por ejemplo, a la lesión tisular, así como un paso crítico en la patología de la progresión tumoral. Los mecanismos específicos que subrayan el cambio angiogénico implican una remodelación selectiva de la MEC por enzimas proteolíticas y la inducción, generación o liberación de factores de crecimiento angiogénicos, que inducen la formación del endotelio, seguido de reorganización y formación de nuevos vasos sanguíneos (Deryugina et al., 2008).

Para analizar los mecanismos subyacentes a la angiogénesis normal y patológica, se han establecido numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos *in vitro* proporcionan datos fáciles, rápidos y asequibles, sin embargo no pueden considerarse concluyentes; debe confirmarse por otros ensayos de complejidad creciente, que incluyen ensayos *in vivo*, los cuales emplean diferentes especies de animales de laboratorio, incluidos mamíferos (ratón, rata, hámster y conejo), aves (pollo y codorniz) y peces (principalmente peces cebra) (AlMalki et al., 2014).

El uso de modelos de embriones de pollo para estudios angiogénicos se ve facilitado por la existencia de un tejido respiratorio especializado, denominado membrana corioalantoidea de pollo (CAM) que permite el intercambio gaseoso entre el embrión y la atmósfera que lo rodea y en efecto cumple la función de un pulmón durante la vida embrionaria, este modelo ha dado lugar a un progreso importante en la elucidación de los mecanismos de acción de varios factores angiogénicos y antiangiogénicos (Deryugina et al., 2008; Ribatti et al., 2008). 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 utilizan métodos invasivos. La cuantificación suele ser rápida y precisa, además de que el método es rápido y sencillo de realizar (AlMalki et al., 2014).

Los modelos de cicatrización de heridas descritos anteriormente permiten la prueba de terapias potenciales para diversas afecciones patológicas. El objetivo final de la terapia es restaurar la piel de manera completamente funcional con cicatrices mínimas o nulas, así como comprender mejor la biología y traducir esto a la terapia humana (Boyko et al., 2017).

7. Tratamiento para la cicatrización de heridas

7.1 Fármacos para cicatrización de heridas

En la actualidad, se están desarrollando nuevos medicamentos para la cicatrización de heridas con una gran variedad de indicaciones, que en su mayoría se enfocan a terapias tópicas dirigidas a vías bioquímicas y moleculares específicas representando una ruta prometedora para mejorar, y en algunos casos, normalizar el proceso de cicatrización. Las áreas de interés actual se enfocan en la asepsia, el

desbridamiento, balance de la humedad, la angiogénesis y el crecimiento y proliferación celular (Zielins et al., 2015).

7.1.1 Fármacos antisépticos

Los fármacos antisépticos se emplean para evitar la infección de la herida, ya que es el factor que más a menudo altera el equilibrio en el proceso de cicatrización (Ortega-Peña et al., 2017). Éstos son productos químicos que se aplican sobre los tejidos con la finalidad de eliminar los microorganismos patógenos o inactivar a los virus. En el mercado hay diferentes tipos de antisépticos con propiedades y mecanismos de acción bien diferenciados, los antisépticos tópicos se usan ampliamente para el tratamiento de heridas con el objetivo de interrumpir la capacidad de formación de biopelículas por los microorganismos. En la Tabla 6 se muestran las características principales de algunos antisépticos (Esteva, 2006).

Tabla 6. Características de los principales antisépticos, tomado y modificado de Esteva, 2006.

Antiséptico	Espectro de acción	Inicio de actividad	Seguridad
Alcohol 70°	Bacterias Gram (+) Bacterias Gram (-) Virus	2 min	Inflamable
Clorhexidina	Bacterias Gram (+) Bacterias Gram (-) Esporas Hongos Virus	15-30 s	Concentraciones >4% pueden dañar el tejido
Povidona yodada	Bacterias Gram (+) Bacterias Gram (-) Hongos Virus	3 min	Retrasa el crecimiento de tejido de granulación
Peróxido de hidrógeno (1.5-3%)	Bacterias Gram (+) Bacterias Gram (-) Virus	Inmediato	Inactivo en presencia de aire y luz
Mercurocromo	Bacterias Gram (+) Bacterias Gram (-) Virus	Inmediato	No interfiere con el crecimiento del tejido de granulación

Distintos productos emplean a la plata metálica y combinada como la sulfadiazina de plata, las sales de plata (AgCl, AgNO₃, Ag₂SO₄), sistemas de liberación sostenida de plata y soluciones coloidales de plata, debido a la capacidad de este material para matar un amplio espectro de bacterias colonizadoras y resistentes a los antibióticos.

Sin embargo, estos tratamientos a pesar de controlar efectivamente las infecciones por microorganismos, retrasan la cicatrización debido a su citotoxicidad, debido a la liberación de plata al suero (Valencia, 2010; Abarca-Buis et al., 2014)

Otros ejemplos de antisépticos incluyen formulaciones activas liberadoras de cloro, como NaClO 0.057%, HClO 0.033%, soluciones superoxidantes compuestas por NaClO 0.0008% y HClO 0.0032%, óxido de disulfuro de dialilo modificado 0.008%, sodio magnesio fluorosilicato al 3%, poliaminopropilbiguanida al 0.1%, y solución electrolizada de superoxidación. De los cuales los agentes liberadores de cloro exhiben mejores efectos inmediatos anti-biopelículas a corto plazo y una menor toxicidad que la biguanida y el óxido de disulfuro de dialilo modificado que tienen mejor efectividad a largo plazo (Ortega-Peña et al., 2017).

Aunque casi todos los antisépticos probados impiden la formación temprana de biopelículas de una sola especie, su efectividad disminuye con el tiempo, ya que las biopelículas en las heridas incluyen varios microorganismos que coexisten y hacen sinergias. Inevitablemente, un efecto anti-biopelícula completo sólo es posible con tratamientos de desbridamiento y antisépticos repetidos para obtener una reducción de población microbiana y mejores resultados en la cicatrización de la herida (Ortega-Peña et al., 2017).

7.1.2 Fármacos para desbridamiento

El desbridamiento es la eliminación de tejido necrótico y objetos extraños de la herida para exponer el tejido viable subyacente y acelerar la cicatrización (Ayello et al., 2004). El desbridamiento adecuado es primordial para el cierre de la herida y el control de la infección, especialmente en el caso de quemaduras y heridas crónicas, donde el tejido necrótico puede ser abundante. Los agentes de desbridamiento enzimáticos permiten la eliminación de tejido necrótico sin pérdida de sangre, aunque pueden causar dolor y, dependiendo de si el agente utilizado es selectivo o no selectivo, dañar los tejidos circundantes. Las enzimas proteolíticas más comunes utilizadas para el desbridamiento son la colagenasa, que se dirige específicamente a las fibras de colágena, y la papaína que se dirige a la fibrina entre otras proteínas. La bromelina, originalmente descrita en la década de 1980, está emergiendo como un agente de desbridamiento, obtenida a partir de la porción del tallo de las piñas, es

útil en el desbridamiento de heridas debido a la presencia de escarasa que permite el desbridamiento selectivo de tejido no viable (Zielins et al., 2015).

7.1.3 Agentes estimuladores de la angiogénesis

La neo-vascularización esencial para la cicatrización de heridas. En esta etapa, se producen múltiples citocinas como parte de la respuesta inmune a la lesión, muchas de las cuales estimularán la angiogénesis y la vasculogénesis, entre las que se incluyen: VEGF, PDGF, HGF, TGF- β , FGF-1 y FGF-2, junto con angiogenina y angiopoyetinas. PDGF es el factor de crecimiento más utilizado, hay cinco isoformas de PDGF, que se unen a receptores de tirosina cinasa PDGFR-a y -b. De las isoformas, PDGF-BB es el más comúnmente implicado en la curación de heridas, PDGF-BB trabaja para equilibrar las acciones de VEGF en la angiogénesis, ya que VEGF induce la formación de nuevos vasos sanguíneos. Otro participante en la neo-vascularización inducida por VEGF es la angiotensina II, la cual actúa a nivel microvascular a través de dos receptores con funciones opuestas: AT₁ y AT₂. Mientras que AT₁ estimula la actividad de VEGF, AT₂ lo inhibe mediante la inhibición de la síntesis endotelial de óxido nítrico (Zielins et al., 2015).

7.1.4 Agentes para proliferación y crecimiento celular

Agentes como PDGF, angiotensina II y T β 4 son útiles debido a la diversidad de sus funciones. PDGF además de promover la neo-vascularización, estimula la proliferación de fibroblastos, lo que resulta en una mayor producción de MEC durante la etapa proliferativa. La angiotensina II también afecta la etapa proliferativa de la cicatrización de la herida, nuevamente a través de las acciones de los receptores AT₁ y AT₂, donde AT₁ estimula la síntesis de colágena, mientras que la activación de AT₂ ejerce el efecto opuesto. T β 4 modula directamente la expresión de MMPs, dada su capacidad para modular mecánicamente el entorno de la herida mediante la descomposición de la MEC, las MMPs son esenciales para la cicatrización y pueden tener efectos importantes sobre el comportamiento celular, ya sea al influir en la migración, el fenotipo o incluso la supervivencia celular (Zielins et al., 2015).

7.1.5 Apósitos

Hasta hace poco, la curación de heridas se realizaba únicamente en ambiente seco, dejando las heridas al aire o cubriéndolas con un apósito estéril (gasa). Sin embargo se ha reportado que este ambiente retrasa la cicatrización debido a que la ausencia de humedad provoca que las células epidérmicas tendiesen a desplazarse hacia el interior de la herida. Las células sanas se deshidratan, se necrosan y se forma una costra que se fija a los extremos inferiores de la herida mediante fibras de colágena que impiden la aparición de tejido nuevo. La aplicación de apósitos húmedos permite un equilibrio impidiendo la desecación, por una parte, y la maceración por otra, lo que favorece la correcta cicatrización de la herida. Se ha reportado que a través de la cura húmeda se disminuye el dolor, se ejerce un papel preventivo al evitar la fricción, se reduce el tiempo de cicatrización y se obtienen menores tasas de infección respecto a la cura seca (Esteva, 2006).

Hay diferentes tipos de apósitos:

- Alginatos
- Hidrocoloides
- Hidrogeles
- Poliuretanos
- Apósitos de silicona

8. Pirfenidona

La pirfenidona es útil en el tratamiento de heridas porque reduce la respuesta inflamatoria, acelera significativamente la epitelización, controla el edema secundario, promueve un buen suministro de sangre, disminuye el tiempo de cierre de la herida y regula la producción de colágena (Mecott-Rivera et al., 2018). La pirfenidona posee propiedades antiangiogénicas, ideal como agente anti cicatrices (Liu et al., 2017), por lo tanto, su uso como fármaco de referencia en modelos experimentales de cicatrización resulta imprescindible.

La pirfenidona es una piridina [5-metil-1-fenil-2-(1*H*)-piridona] (Figura 9), originalmente sintetizada por Gadekar en 1974, como un agente con acciones analgésicas, antipiréticas, antiinflamatorias, así como propiedades antifibróticas

específicas, utilizada como agente con potencial terapéutico para la fibrosis pulmonar idiopática. La pirfenidona es una molécula pequeña de peso molecular de 185 g/mol, con biodisponibilidad oral, y puede pasar a través de las membranas celulares sin necesidad de un acarreador. Se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, atraviesa la barrera hematoencefálica y se elimina en la orina en 6 h (Hilberg et al., 2012; Taniguchi et al., 2010).

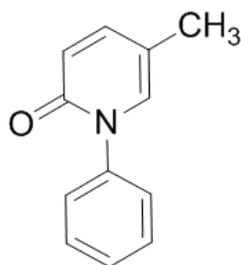


Figura 9. Estructura molecular de la pirfenidona

Los mecanismos de acción de la pirfenidona son multidireccionales, ya que se han demostrado efectos antioxidantes, antiplaquetarios, inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas de linfocitos activados, incluidos, TGF- β , la interleucina (IL)-4 y la IL-13, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17, FGF- β , PDGF, VEGF, IP-10, MIP-1, y Mig. La pirfenidona también inhibe la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 y mejora la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10, actúa como secuestrador de radicales hidroxilo, lo que contribuye a reducir el estrés oxidativo o el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), además, inhibe los comportamientos profibróticos de los fibroblastos, incluida su proliferación, diferenciación a miofibroblastos y síntesis de colágena. Algunas de estas actividades son mediadas por la inhibición de MAPK, principalmente p38 (Hilberg et al., 2012; Janka-Zires et al., 2016; Neri et al., 2016; Visner et al., 2009).

9. Plantas con propiedades cicatrizantes

De acuerdo con la definición de la OMS, los agentes a base de plantas incorporan como principios activos partes de plantas en estado crudo o procesado, así como ciertos excipientes, p.ej. disolventes, diluyentes o conservadores. La fitoterapia se usa ampliamente en la población general para la intervención y prevención de varias enfermedades. Casi 4 mil millones de personas (representando el 80% de la

población mundial) usan las plantas para curarse por su bajo costo, fácil acceso, su origen natural y por causar menos efectos secundarios (Calixto, 2000; Ekor, 2014). La seguridad relativa que se percibe de los productos naturales es una de las principales razones de su popularidad en la población. Recientemente, ciertas plantas se han usado para la cicatrización de heridas, en la Tabla 7 se mencionan algunas de ellas y el mecanismo de acción reportado gracias en estudios *in vitro* e *in vivo*, aunque no se encuentra completamente elucidado (Pazyar et al., 2014).

Tabla 7. Plantas comunes con propiedades cicatrizantes y mecanismo de acción reportado (Pazyar et al., 2014):

Planta	Mecanismo
Sábila (<i>Aloe vera</i>)	La fracción de glicoproteína aislada de <i>A. vera</i> es un componente eficaz a través de la proliferación y migración celular.
Mimosa (<i>Mimosa tenuiflora</i>)	Extractos acuosos se utilizan para la cicatrización de heridas y quemaduras. Mejora la actividad de fibroblastos dérmicos <i>in vitro</i> .
Uva (<i>Vitis vinífera</i>)	El extracto de la semilla exhibe características antiinflamatorias y antioxidantes. La aplicación tópica de extracto de proantocianidina, promueve la restauración de la herida, regulada TNF- α y VEGF en queratinocitos humanos.
Echinacea (<i>Echinacea</i>)	La equinácea y su constituyente equinacósido tienen efectos antiinflamatorios y cicatrizantes efectivos.
Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>)	Incorpora abundantes terpenoides y flavonoides que contribuyen a sus características médicas. Tiene un efecto antiulcerogénico debido a su acción antagonista sobre los receptores H ₂ promoviendo la cicatrización. Además contribuye en la reepitelización.
Ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	Promueve la angiogénesis y estimula la producción de VEGF y citocinas proinflamatorias.
Té verde (<i>Camellia sinensis</i>)	Contiene altas cantidades de polifenoles que influyen en TGF- β 1.
Jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i>)	Estudios <i>in vitro</i> sobre queratinocitos humanos y fibroblastos indican que la cera líquida de jojoba provoca la síntesis de colágena I.
Aceite de árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	Posee características antimicrobianas, antiinflamatorias y de regeneración de la herida.
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Estudios <i>in vivo</i> demuestran disminución de la inflamación, aumento de la contracción de la herida, reepitelialización, regeneración del tejido de granulación, angiogénesis, así como deposición de colágena.

Tabla 7. Plantas comunes con propiedades cicatrizantes y mecanismo de acción reportado (Pazyar et al., 2014) (Continuación):

Planta	Mecanismo
Limón (<i>Citrus limón</i>)	Buena fuente de vitamina C, que acelera la cicatrización de heridas cutáneas por sus mecanismos antioxidantes y antiapoptóticos a través de un buen sistema de administración de fármacos.
Soya (<i>Glycine max</i>)	Las antocianinas del recubrimiento de semilla de soja negra poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, mejoran la cicatrización debido a sus propiedades citoprotectoras y la potenciación de la angiogénesis.
Consuelda (<i>Symphytum officinale L.</i>)	La alantoína posee numerosas actividades, incluida la eliminación de tejido necrótico, estimulación de la mitosis celular, promoción de la estimulación epitelial, regulación de las reacciones inflamatorias y el estímulo de proliferación de fibroblastos y producción MEC.
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	Inhibición de la catalasa bacteriana y eficaz en la muerte bacteriana intracelular. Además, la acción antioxidante de la papaya reduce el riesgo de daño oxidativo a los tejidos.
Avena (<i>Avena sativa</i>)	El salvado de avena es una fuente particularmente de vitaminas del complejo B, vitamina E, proteínas, grasas y minerales, esenciales para cicatrización. Estudios <i>in vitro</i> demuestran que modula la reepitelización del epitelio recién formado.
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Estudios <i>in vivo</i> demuestran una mejora en el colágeno nuevo, maduración de las fibras de colágeno y neo-vascularización intensiva dosis dependiente.
Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>)	Sus extractos elevan la resistencia a la rotura y la cantidad de hidroxiprolina en heridas, además poseen actividad antioxidante.
Aceite de oliva (<i>Olea europea</i>)	Sus compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes más altas que las de la vitamina E sobre los lípidos y la oxidación del ADN. Capaces de prevenir la disfunción endotelial al disminuir la expresión de moléculas de adhesión celular y aumentar la producción de óxido nítrico.
Albahaca (<i>Ocimum sanctum</i>)	Exhibe propiedades de reparación e inducción de citocinas. Estudios <i>in vivo</i> informan epitelización más rápida así como un aumento en el contenido de tejido de granulación e hidroxiprolina.

Además, existen otras plantas utilizadas en cicatrización en diversos órganos y tejidos, de los cuales sus mecanismos de acción han sido estudiados y se conoce claramente. Las especies y el mecanismo por el cual actúan se enlistan en la Tabla 8 (Pazyar et al., 2014):

Tabla 8. Plantas y su mecanismo de acción descritos en la literatura (Pazyar et al., 2014)

Planta	Mecanismo
Caléndula (<i>Calendula officinalis</i>)	Neo-vascularización / epitelización
Gotukola (<i>Centella asiática</i>)	Síntesis de procolágena tipo III
Dong quai (<i>Angelica sinensis</i>)	Proliferación de fibroblastos
<i>Astragali radix</i>	Proliferación de fibroblastos
<i>Boehmeria nivea</i>	Efecto en macrófagos por inhibición de p38 y JNK
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Inhibición de NO, PGE ₂ , TNF- α
<i>Polygonum</i>	Incrementa fibroblastos, TGF- β 1
<i>Aristolochia bracteolata</i> increase	Incremento de superóxido dismutasa y catalasa
Hierba de San Juan (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	Producción de colágena
Aspilia (<i>Aspilia africana</i>)	Detiene el sangrado de la herida e inhibe el crecimiento microbiano
Sangre de dragón (<i>Dracaena cinnabari</i>)	Contracción de la herida, formación de colágena y epitelización
Hiberba de Siam (<i>Chromolaena</i>)	Actúa vía NF- κ B

La actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de las plantas contribuye al proceso de reepitelización, la angiogénesis, la formación de tejido de granulación, la proliferación de fibroblastos y el depósito de colágena en las heridas. Además, pueden ser valiosas en el manejo de cicatrización anormal, como cicatrices queloides y cicatrices hipertróficas (Pazyar et al., 2014).

Aún se desconoce mucho sobre las plantas para el tratamiento de heridas, siendo como limitantes la escasez de estudios preclínicos y clínicos, así como la complejidad de los constituyentes químicos y estudios fitoquímicos de las mismas. Es necesario realizar más estudios para encontrar alternativas que puedan ser fuente de futuros medicamentos (Pazyar et al., 2014).

10. Cuachalalate

Nombre científico: *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltdl

Familia botánica: *Anacardiaceae*

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

Definición de la droga cruda:

La droga consiste en la parte externa y protectora del tronco y de las ramas de *A. adstringens* (Figura 10).

Nombres comunes:

Cuauchalalá, coachalalate, cuauchalalate, cuauchalolote, cuachinalá (Oaxaca), muaxalaxlitli, (Morelos), cuachachalat (Guerrero), mapicerán (Jalisco), macerán (Guerrero), pacheco (Michoacán), volador (Puebla) (Navarrete et al., 2009; UNAM, 2009).

Distribución:

La especie es endémica de México y se encuentra localizada desde Nayarit hasta Oaxaca, incluyendo Jalisco, Morelos, Puebla, Guerrero, Michoacán, Colima y el Estado de México.

Descripción macroscópica:

Es un árbol que mide hasta 8 m de altura (Figura 11). Su diámetro a la altura del pecho es de hasta 40 cm, de tronco generalmente torcido, con ramas escasas, gruesas, ascendentes y torcidas. De corteza externa lisa, color moreno grisácea a gris plomiza. La corteza interna es de color crema rosado a rosado, fibrosa, con un exudado blanco cremoso, extremadamente astringente y olor picante, con un grosor total entre 10 y 20 mm, sin incluir escamas (Navarrete et al., 2009).

La parte interna de la corteza se torna roja o blanca inmediatamente después de su corte, lo que determina que se distinga al árbol entre “cuachalalate rojo” o “cuachalalate blanco”, indicándose como de uso medicinal preferentemente el rojo (Navarrete et al., 2009).



Figura 10. Corteza de cuachalalate (*A. adstringens*). Fotografía cortesía del Dr. Andrés Navarrete.



Figura 11. Árbol de cuachalalate (*A. adstringens*). Fotografía cortesía del Dr. Andrés Navarrete.

10.1 Usos tradicionales

Esta planta es usualmente empleada para lesiones gástricas (acidez, gastritis, úlceras gástricas, cáncer de tracto digestivo), lesiones cutáneas (heridas, cortaduras, llagas, picaduras de animales ponzoñosos, várices), lesiones bucales (aftas, fuegos, inflamación de encías, dolores de muelas, estomatitis), afecciones de vías urinarias (dolor e inflamación de riñones, cistitis, cálculos renales), afecciones ginecológicas (infecciones en vagina y/o útero, inflamación), afecciones digestivas (indigestiones, dolor, infección o inflamación de estómago o intestinos), afecciones respiratorias

(tos, inflamación de anginas, resfriados, tuberculosis), para disolver cálculos biliares, disminuir cólicos, contrarrestar la fiebre, paludismo, problemas de la sangre y circulación, caída del cabello, gangrena, diabetes y tifo. Es ampliamente usado en la medicina tradicional mexicana por su potencial terapéutico gracias a sus propiedades como agente cicatrizante, mitigante, antibiótico, antiséptico, antiinflamatorio, antimalárico e hipocolesterolemiante, empleado como infusión, decocción o emplasto (Navarrete et al., 2009; Olivera et al., 1999).

10.2 Constituyentes químicos del cuachalalate

La corteza de cuachalalate contiene dos tipos principales de compuestos, que pertenecen a las categorías de los triterpenoides y compuestos aromáticos simples con cadenas alifáticas de 12 a 22 átomos de carbono. Los principales triterpenos presentes en la corteza de cuachalalate son los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico (Figura 12 A), masticadienónico (Figura 12 B), instipolinácico, cuachalálico, isomasticadienónico, oleanólico, así como algunas lactonas como 3- α -hidroxi-11- α ,12- α -epoxi-oleanan-28,13 β -ólida, 3- β -hidroxi-11- α ,12- α -epoxi-oleanan-28,13- β -ólida y ocotilona y esteroides como el β -sitosterol, sarsasapogenina, y el 27-acetoxi-3- α ,15- α -dihidroxi-12,24-tirucaladieno (Navarrete et al., 2009).

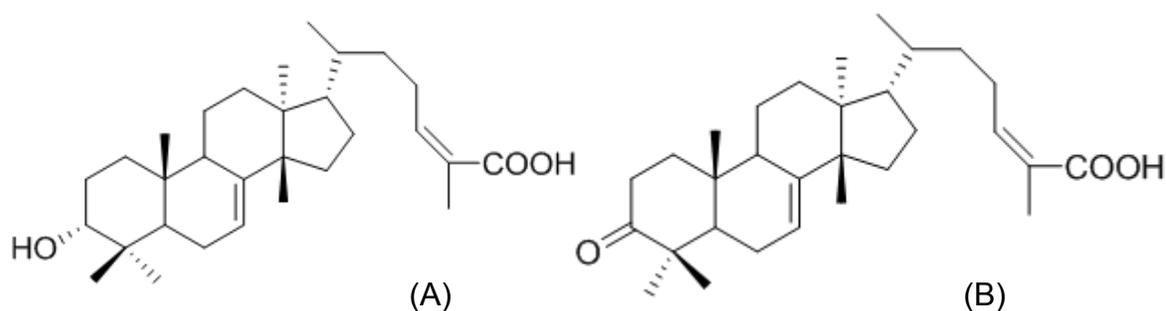


Figura 12. Estructura química del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (A) y del ácido masticadienónico (B) (Navarrete et al., 2009)

Dentro de los compuestos aromáticos simples, se han aislado una serie de ácidos y aldehídos anacárdicos (Figura 13), así como el ácido 3-dodecil-1,8-dihidroxi-naftoico (Navarrete et al., 2009).

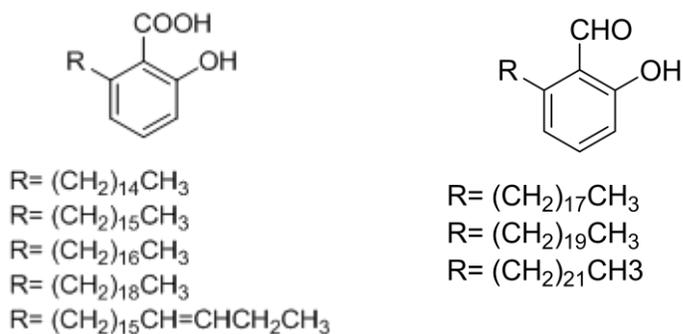


Figura 13. Derivados anacárdicos de *A. adstringents* (Navarrete et al., 2009)

10.3 Bioactividad de los compuestos de cuachalalate

Los triterpenos tienen un amplio rango de actividades terapéuticas entre las que destacan: efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, antivirales, hepatoprotectores, analgésicos, antimicóticos, inmunomoduladores, antiparasitarios, antiprotozoarios, antiplasmódicos, anticariogénicos y antiulcerogénicos gracias a su actividad gastroprotectora (Dzubak et al., 2006; Navarrete et al., 2005).

En cicatrización, los triterpenos modulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el microambiente de la herida, acelerando el proceso de reparación del tejido. También inducen la migración y proliferación celular, depósito de colágena, angiogénesis favoreciendo la formación de tejido de granulación y epitelización. Algunos triterpenos como el asiaticósido aislado de *Centella asiática*, el astragalósido IV aislado de las especies *Astragalus*, lupeol de *Celastrus paniculatus*, ácido oleanólico de *Anredera diffusa* y ácido ursólico aislado de *Shorea robusta*, contribuyen a la cicatrización gracias a sus efectos en la producción y actividad de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento, ayudando a la contracción y velocidad de epitelización (Agra et al., 2015).

Dentro de los ácidos y aldehídos anacárdicos se han descrito su potencial antimicrobiano y su posible uso como agentes antisépticos para el tratamiento de infecciones bacterianas (Castillo-Juárez et al., 2013; Mata et al., 1991).

11. Ajo

Nombre científico: *Allium sativum*

Familia botánica: *Alliaceae*

Sinónimos: comúnmente conocido como ajo es una especie de la familia de las cebollas y pertenece a la orden de las plantas liliales. Otros miembros de la familia del ajo incluyen *Allium cepa* (cebolla), *Allium ascalanicum* (chalote) y *Allium porrum* (Heeks). De todas las especies de *Allium*, el ajo es el más importante (Elizabeth K.M., 2001).

Definición de la droga cruda:

Todas las partes de la planta son comestibles, pero se consume principalmente el bulbo (Figura 14).

Distribución:

Las especies de *Allium* son una de las plantas cultivadas más antiguas del mundo debido a su larga vida de almacenamiento. El ajo es originario de Asia Central (Kazajstán, Kirguistán, Turkmenistán, Tayikistán y Uzbekistán) y las partes nororientales de Irán, aunque también se cultiva ampliamente en todo el mundo (Oosthuizen et al., 2018).

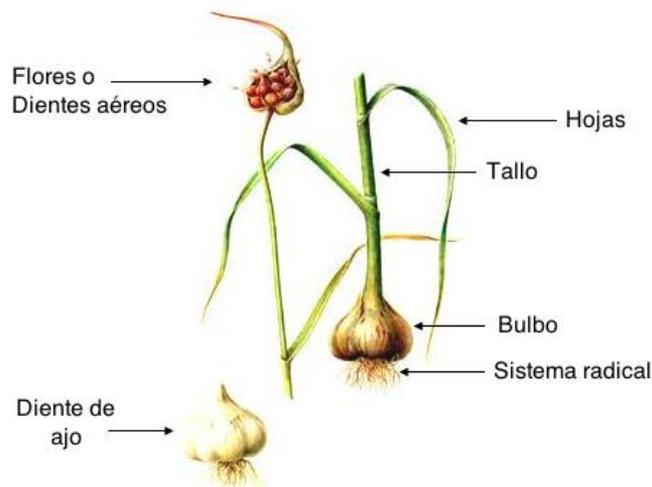


Figura 14. Partes del ajo. Tomado y modificado de <http://www.todomonografias.com/agronomia/cultivo-del-ajo/> ("Ajo (*Allium sativum*)," n.d.) Tomado julio/2018

Descripción:

El ajo se usa tradicionalmente como potenciador del sabor y se ha reconocido no solo como un aditivo alimentario común sino también como un potente agente terapéutico (Yun et al., 2014).

11.1 Constituyentes químicos del ajo

La composición química de las preparaciones obtenidas depende de las condiciones de extracción, temperatura, tiempo y polaridad del solvente. El contenido de compuestos organosulfurados en los bulbos de ajo cambia durante el cultivo y el almacenamiento. Sus actividades biológicas dependen de muchos factores, incluido el país de origen y método de procesamiento para aislar los compuestos. Por lo tanto, el desarrollo de métodos para la determinación de compuestos de azufre y la selección del ajo es de gran importancia para evaluar la calidad biológica de los productos de los diferentes ajos (Yun et al., 2014). El ajo contiene una gran concentración de compuestos de azufre que producen olor y sabor característicos y también son responsables de los efectos benéficos. El ajo contiene aproximadamente 65% de agua, 28% de carbohidratos (fructanos), 2.3% de compuestos orgánicos de azufre, 2% de proteínas (alinasas), 1.2% de aminoácidos libres (arginina) y 1.5% de fibra (Santhosha et al., 2013). El selenio es el principal mineral que se encuentra en el ajo con niveles que son 9 ppm más altos que en cualquier otra planta, lo que le atribuye propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras importantes (Manzanares et al., 2015; Oosthuizen et al., 2018).

El ajo produce más de 20 tipos de compuestos de sulfuro a partir de unos pocos aminoácidos que contienen azufre con diversas funciones. Algunos de ellos incluyen alliina, ajoeno, polisulfuros de dialilo, vinilditinas (formadas en la descomposición de la alicina), S-alilcisteína, disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo, trisulfuro de alilmetilo, tetrasulfuro de dialilo, sulfuro de dialilo, disulfuro de metilo y alilo, sulfuro de dialilo, tetrasulfuro de metilo y alilo, trisulfuro de dimetilo, alicina, metilaliltiosulfinato, 1-propenil aliltiosulfinato, L-glutamyl-S-alquil-L-cisteína, S-alilmercaptocisteína, 2-vinil-4-H-1,3-ditina, 3-vinil-4-H-1,2-ditina, así como numerosas saponinas y fenoles (Kuetze, 2017). La sustancia activa alicina (tiosulfato de dialilo)

es responsable del olor acre típico y de diversas propiedades terapéuticas (Santhosha et al., 2013).

11.2 Bioactividad de los componentes del ajo

A. sativum es una planta con numerosas propiedades farmacológicas, destacando actividades antioxidantes, antitrombóticas, antimicrobianas, antiartríticas, antitumorales, hipoglucémicas, hipolipemiantes, hipotensoras, carminativas, antisépticas, antihelmínticas, diaforéticas, expectorantes, antifúngicas, antiparasitarias, estimulantes del sistema inmune, así como numerosos usos contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurofisiológicas, enfermedades hepáticas, para el tratamiento de úlceras gástricas y para la prevención de alergias y artritis (Kuete, 2017; Yun et al., 2014).

Estos compuestos han demostrado inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tales como *E. coli*. La actividad antibacteriana del ajo se atribuye al compuesto alicina (Oosthuizen et al., 2018). El ajo es extensamente usado alrededor del mundo para picaduras de animales, forúnculos y para la prevención de infección e inflamación (Alhashim et al., 2018; Bojs et al., 1988).

En estudios realizados en la Universidad de Cambridge por Ejaz y colaboradores en 2009, demostraron que la aplicación tópica de ajo aumenta drásticamente la fase proliferativa de la cicatrización, influyendo en el cierre de la herida y la reepitelización. Asimismo, en las evaluaciones histológicas se observa un aumento significativo en la síntesis de colágena y en la angiogénesis, lo cual podría deberse a la presencia de una cantidad considerable de L-arginina, zinc y cobre en el ajo, que se consideran estimuladores angiogénicos, además, también han explicado que el ajo protege las células endoteliales vasculares del daño oxidativo inducido por H₂O₂ al inhibir la peroxidación de los lípidos, dando como resultado una angiogénesis estable (Ejaz et al., 2009). Además, existe evidencia científica de que el ajo aumenta la proliferación de fibroblastos (Alhashim et al., 2018).

En términos de seguridad, el ajo es muy seguro, aunque se informan algunos efectos secundarios. El ajo puede presentar interacciones con anticoagulantes como warfarina, antiplaquetarios, antiretrovirales como saquinavir, antihipertensivos, bloqueadores del canal de calcio, antibióticos quinolónicos como ciprofloxacina y

medicamentos hipoglucemiantes. Se informan casos aislados de quemaduras tópicas con ajo y anafilaxia. Uno de los efectos locales adversos del ajo es la dermatitis de contacto (puede ser causada por la alicina), produce inflamación local por algunos mecanismos alérgicos, si hay un cuidado inadecuado de la herida o una infección secundaria, puede causar una reacción dérmica grave y una quemadura química profunda (Hallel-Halevy et al., 1997; Kuete, 2017).

12. Justificación

Las heridas ocupan un lugar importante en la atención hospitalaria cuya incidencia ha aumentado a nivel mundial, representando un grave problema de salud pública. La cicatrización de heridas se complica por diversos factores entre los que destacan enfermedades crónico-degenerativas, como alteraciones neurológicas, alteraciones metabólicas, de circulación, así como la inmunosupresión y desnutrición, que repercuten en la calidad de vida de los pacientes.

Actualmente, existen diferentes tratamientos en el mercado para la reparación de heridas, sin embargo, a pesar de los esfuerzos recientes no han mostrado la suficiente evidencia de su eficacia para tratar o prevenir la cicatrización insuficiente o la cicatrización excesiva de las heridas.

Muchas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional han demostrado efectos benéficos para la cicatrización de heridas. El cuachalalate se ha utilizado popularmente como agente cicatrizante, sin embargo no existen estudios que respalden la efectividad de sus extractos y de sus metabolitos como agentes cicatrizantes, por lo que se considera importante realizar estudios mediante modelos *in vivo* e *in ovo* para evaluar la capacidad que tienen sobre el cierre de la herida, actividad angiogénica, capacidad antiinflamatoria, así como antimicrobiana, y de esta manera dar sustento a las atribuciones populares para ser utilizado como una alternativa eficaz para promover la cicatrización de heridas.

13. Hipótesis

El extracto hidroalcohólico de cuachalalate, los ácidos masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico y mezcla de ácidos anacárdicos acelerarán y mejorarán la arquitectura celular de la cicatriz en un modelo murino, así como también promoverán la angiogénesis como uno de sus mecanismos de acción.

14. Objetivos

Objetivo General

- Realizar la valoración del efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico y los principales triterpenos y ácidos anacárdicos presentes en la corteza de cuachalalate en un modelo murino, así como también determinar el efecto *in ovo* sobre la angiogénesis de estas sustancias.

Objetivos Particulares

1. Aislar y caracterizar los ácidos masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico y mezcla de ácidos anacárdicos de la corteza de cuachalalate.
2. Determinar el efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico y los metabolitos aislados de la corteza de cuachalalate en un modelo murino.
3. Evaluar el potencial antibacteriano del extracto hidroalcohólico y metabolitos aislados de la corteza de cuachalalate mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).
4. Evaluar el efecto cicatrizante de la combinación de aceite de ajo y el extracto hidroalcohólico de cuachalalate.
5. Evaluar el efecto angiogénico en el modelo de membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM) del extracto hidroalcohólico y compuestos aislados de cuachalalate.
6. Realizar el análisis histomorfológico de las cicatrices de los diferentes tratamientos evaluados por técnicas histológicas, utilizando las tinciones de hematoxilina-eosina, Herovici y tricrómica de Masson.

15. Parte experimental

15.1 Material vegetal

Se utilizaron un total de 900 gramos de corteza seca de cuachalalate obtenida como un donativo de los Laboratorios Mixim S.A de C.V. el 29 de julio de 2016, que se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso. Se utilizaron 200 gramos para el extracto hidroalcohólico y 700 gramos para el extracto de diclorometano para aislar los compuestos.

15.2 Fármacos y reactivos

La pirfenidona fue donada por Grupo Medifarma S.A. de C.V. y el aceite de ajo se empleó como producto comercial. El propilenglicol, cloruro de sodio, ácido acetilsalicílico, cloruro de benzalconio (Pisabental), histamina y los discos estériles de acetato de metilcelulosa fueron adquiridos en Sigma-Aldrich[®]. Los disolventes utilizados (etanol, metanol, diclorometano y acetato de etilo) fueron adquiridos en J.T. Baker[®].

15.3 Preparación de los extractos de cuachalalate

Para la obtención del extracto hidroalcohólico se utilizaron 200 g de corteza seca y molida de cuachalalate y se colocaron en 800 mL de etanol al 70%, por un periodo de tres días a temperatura ambiente. Para el extracto de diclorometano se colocaron 700 g de corteza, la cual fue puesta a reflujo con 2.5 L de diclorometano durante 4 horas, operación realizada por triplicado. Los extractos obtenidos se filtraron por gravedad y el disolvente se evaporó por destilación a presión reducida, obteniéndose después de eliminar el disolvente 59.4 g de extracto crudo.

15.4 Aislamiento y caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de cuachalalate

Cuarenta gramos de extracto se adsorbieron 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 cromatográficos similares. La presencia de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico fue monitoreada con una referencia por cromatografía en capa fina (CCF). A las fracciones donde se encontraban estos compuestos, se indujo la cristalización por par de disolventes disolviendo en 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 analizó mediante HPLC siguiendo metodologías anteriormente descritas (FHEUM, 2008; Navarrete, 2006). 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 .

Para su caracterización, 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 ^{13}C (100 MHz), 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 marca Varian modelo VNMRS.

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 difractor 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 (Navarrete et al., 2009).

15.5 Pruebas antimicrobianas

15.5.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizó un ensayo de concentración inhibitoria mínima en placa de 96 pozos. Para esta fase se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus mutans* ATCC 10449, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas se sembraron en placas de agar

BHI y se incubaron a 37°C durante 18 horas; para ajustar el inóculo se seleccionaron de dos a tres colonias que fueron suspendidas en solución salina (0.85%) hasta 67%-77% de transmitancia en un colorímetro (BioMérieux Vitek, Inc. Colirimeter).

En el ensayo se evaluaron los compuestos de prueba (extracto hidroalcohólico 70%, ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico, mezcla de ácidos anacárdicos y aceite de ajo). Además se utilizó un control sin inocular, un control de crecimiento bacteriano, controles con ampicilina, cloruro de benzalconio y con digluconato de clorhexidina 0.12%.

A cada uno de los pozos de las placas de 96 pozos se adicionaron 100 μ L de medio BHI, posteriormente en cada una de las filas (A-H) de la columna 1 de las placas se colocaron 100 μ L de suspensión en etanol al 5 % en agua desionizada de cada compuesto o de cada control, alcanzando una concentración inicial de 4 mg/mL para el extracto hidroalcohólico 70%, 500 μ g/mL para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y mezcla de ácidos anacárdicos. El aceite de ajo y el cloruro de benzalconio se probaron a una concentración de 100 μ g/mL, tomando en cuenta el volumen de medio BHI añadido. Se realizaron diluciones sucesivas de 100 μ L hasta llegar a la columna 10. Finalmente, se añadieron 20 μ L de la suspensión bacteriana de *E. coli*, *S. mutans*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* en el pozo correspondiente. Por último, las placas se incubaron por 24 horas a 37° C.

Una vez transcurrido ese tiempo se registró la absorbancia de cada uno de los pozos y la CMI se determinó como aquella concentración del compuesto de prueba que limitó la absorbancia de 0.045 a 660 nm (Rivero-Cruz et al., 2012).

15.6 Evaluación *in vivo*

15.6.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de peso entre 170 y 200 gramos obtenidos de Envigo México S.A. de C.V., mantenidas a una temperatura constante de 22 \pm 1°C, con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas y con libre acceso a agua y alimento. Todos los experimentos siguieron los estándares éticos que delimitan las guías internacionales para la investigación experimental del dolor en animales y se aplicaron los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-

1999) sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Asimismo se obtuvo la autorización del protocolo por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química OFICIO/FQ/CICUAL/200/17 (ANEXO 1). El número de animales empleados por experimento fue el mínimo necesario para tener un análisis estadístico confiable.

Los embriones de pollo de la especie Bovans white de tres días de desarrollo se adquirieron en el CEIEPAv (Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, encontrándose aptos para su manejo y experimentación OFICIO FMVZ001 (ANEXO 2).

15.6.2 Formación de las heridas y evaluación de los tratamientos

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (45 mg/kg, i.p.), se les humedeció el dorso con solución de cloruro de benzalconio al 10% y se les rasuró cuidadosamente vigilando que no quedaran residuos de pelo. Se practicaron dos heridas excisionales de 5 mm de diámetro cada una y de espesor total a cada lado del dorso (Figura 15). El procedimiento se llevó a cabo con ayuda de un sacabocados (BIOPSY PUNCH de 5 mm, desechable de plástico Miltex®). Se colocaron 6 animales por jaula antes de la operación y de manera individual en jaulas con piso de malla después de haber efectuado la escisión. Se les administró como analgésico clorhidrato de tramadol a una dosis de 4 mg/kg por vía oral en el agua, los tres días posteriores a la cirugía.

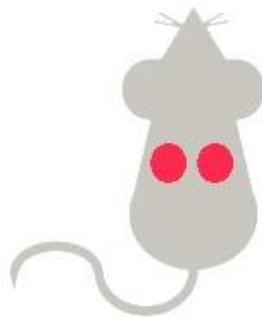


Figura 15. Heridas excisionales en rata Wistar. Tomado y modificado de (Boyko et al., 2017).

Se aplicaron los tratamientos por vía tópica en una solución de propilenglicol (PEG)-etanol (90:10) en una concentración de 10 mg/herida para el extracto hidroalcohólico y 300 µg/herida de los otros compuestos, diariamente durante 15 días, de acuerdo al diseño descrito en la Tabla 9.

Tabla 9. Tratamientos a evaluar en las heridas de los animales		
Grupo	Tratamiento	
	Herida Izquierda	Herida derecha
1	Control (sin tratamiento)	Control (sin tratamiento)
2	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Vehículo PEG-etanol (90:10)
3	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Pirfenidona 8%
4	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Extracto hidroalcohólico 70%
5	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Ácido 3α-hidroximasticadienónico
6	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Ácido masticadienónico
7	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Ácidos anacárdicos
8	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Mezcla de los 3 ácidos (ácido 3α-hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y ácidos anacárdicos)
9	Vehículo PEG-etanol (90:10)	Mezcla aceite de ajo-extracto hidroalcohólico de cuachalalate 0.016%

Al final de los días 0, 3, 7 y 15 de tratamiento, 9 animales por grupo se sacrificaron en una cámara de CO₂, se obtuvieron biopsias del tejido abarcando toda el área de lesión para realizar el análisis histológico.

15.6.3 Evaluación de la herida y porcentaje de cierre

Diariamente se midió el área de la lesión a partir de las imágenes obtenidas con un microscopio digital de mano Celestron 44302 A y el programa ImageJ 1.51m9. Se documentó cualitativamente mediante las fotografías, y de manera cuantitativa de la siguiente manera: *El área de la lesión se calculó en % de acuerdo a la lesión inicial

$$\text{Porcentaje de cierre de la herida} = \frac{\text{área inicial} - \text{área final}}{\text{área inicial}} \times 100$$

Posteriormente, los datos se sometieron a análisis estadístico con ayuda del programa GraphPad Prism 7.0 para identificar diferencias significativas con los distintos tratamientos.

15.6.4 Registro del peso de los animales

Se llevó a cabo un registro del peso diario de todos animales empleados en el estudio, durante los 15 días del experimento con ayuda de una balanza granataria para su análisis y se expresó como de cambio de peso para cada uno de los tratamientos.

$$\text{Cambio de peso} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

15.7 Modelo CAM para evaluación de la angiogénesis

Se emplearon embriones de pollo de tres días de desarrollo, se limpiaron con etanol al 70% dentro de una campana de flujo laminar Telstar Mini-V/PCR®. Se realizó un pequeño orificio en el polo agudo del huevo y con una jeringa hipodérmica con aguja de calibre 26G se retiraron 4 mL de albúmina. Se marcó una ventana de 2.5 x 2.5 cm en el cascarón y se cortó con ayuda de un esmeril rotatorio de 2 velocidades Dremel® y se retiró el cascarón para formar la ventana. Finalmente se tapó la ventana con tela adhesiva. Los huevos se incubaron a 37° C y 75 % de humedad relativa en Incubadora Riossa® E-33 hasta el día 10 de desarrollo. Transcurrido ese tiempo, se abrió la ventana y se colocó un disco estéril de metilcelulosa (74146 Sigma-Aldrich) de 0.5 mm de diámetro e impregnado con los tratamientos disueltos en DMSO al 0.1%.

Los tratamientos evaluados fueron: ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico, mezcla de ácidos anacárdicos, mezcla de los tres componentes en proporción (1:1:1) y tres grupos testigos: histamina 5.6 μ g (proangiogénico), ácido acetilsalicílico 9 μ g y pirfenidona 9.2 μ g (antiangiogénico). Se tapó nuevamente la ventana y se incubaron hasta el día 12, donde se hizo la evaluación con ayuda de una fotografía tomada con un microscopio Celestron 44302-A y posterior cuantificación con el programa ImageJ® empleando el método cualitativo de “análisis de ramificación de vasos sanguíneos” descrito por Barnhill RL y colaboradores en 1983, el cual consiste en cuantificar las ramificaciones de los vasos sanguíneos que

convergen del disco de metilcelulosa en una distancia de 1 mm alrededor del disco utilizando una escala que va de cero a dos (Figura 16). Todos los vasos discernibles que atraviesan el anillo de 1 mm alrededor del disco, se cuentan siempre que formen un ángulo de menos de 45° con la línea que irradia desde el centro del disco (Barnhill et al., 1983).

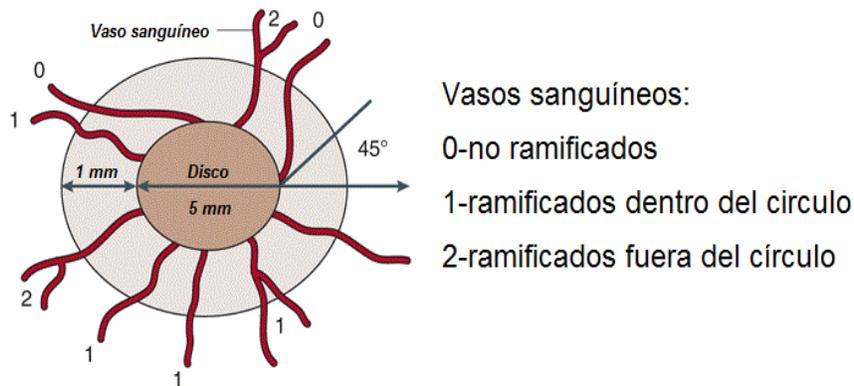


Figura 16. Determinación del índice vascular. Tomado y modificado de (Ribatti et al., 2006).

16. Análisis histológico

Se empleó el modelo de formación de heridas anteriormente descrito y se evaluaron los tratamientos de acuerdo a la Tabla 10, a los 3, 7 y 15 días de tratamiento y tras sacrificar los animales se obtuvo una biopsia central al sitio de lesión de 4 mm de diámetro de espesor total. Las muestras fueron fijadas e incluidas en parafina y se realizaron cortes de 5 μ m en Microtomo Leica RM 2125RT utilizando baño de agua (Fisher Scientific, Modelo 134). Se procesaron con diferentes técnicas histológicas y se analizaron con ayuda de Microscopio Zeiss (AXI0 Imager. Z1). Para su interpretación se empleó la denominación de acuerdo a la Tabla 10.

Tabla 10. Sustancias aplicadas como tratamiento estimulador de la cicatrización
Control
Vehículo PEG-etanol (90:10)
Pirfenidona 8%
Extracto hidroalcohólico 70%
Ácido 3 α -hidroximasticadienónico
Ácido masticadienónico
Ácidos anacárdicos
Mezcla de los 3 ácidos (ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y ácidos anacárdicos)
Mezcla aceite de ajo-extracto hidroalcohólico de cuachalalate 0.016%

Los tejidos tratados y control fueron procesados por la técnica de hematoxilina y eosina (H&E) y de ellos se valoró el índice de epitelización, tomando como base la estructura de la epidermis de la piel sana (Tabla 11) (Salgado et al., 2014). Para la determinación del infiltrado inflamatorio se empleó una escala análoga visual de acuerdo a la Tabla 12.

Tabla 11. Escala para determinar el índice de epitelización (Salgado et al., 2014).

Elemento	Puntuación (en base a la piel normal)
Presencia de papilas dérmicas	1
Epitelio estratificado	1
Presencia de lámina basal	1
Lámina basal compacta	1
Estrato basal con queratinocitos en forma de columna	1
Estrato espinoso con desmosomas	1
Estrato granuloso con gránulos de queratohialina	1
Estrato córneo	1
Total	8
Hipertrofia epitelial	-1
Capa basal difusa o gruesa	-1

Tabla 12. Escala análoga visual para evaluar infiltrado inflamatorio

Valor	Equivalencia de Infiltrado inflamatorio
0	Nulo
1	Escaso
2	Medio
3	Abundante

Finalmente, se cuantificaron los vasos sanguíneos totales y en relación con su tamaño en la zona central de la herida de acuerdo a la Tabla 13:

Tabla 13. Escala para cuantificación de vasos sanguíneos según su calibre:

Diámetro	Tamaño de los vasos sanguíneos
< 20 μm	Pequeños
20-100 μm	Medianos
> 100 μm	Grandes

Se empleó la tinción de hematoxilina eosina para analizar el infiltrado celular, el índice de reepitelización y la formación del tejido de granulación.

La hematoxilina tiene un color azul-violeta profundo y tiñe los ácidos nucleicos mediante una reacción compleja. La eosina es rosa y tiñe las proteínas de forma no específica. En un tejido típico, los núcleos se tiñen de azul, mientras que el citoplasma y la matriz extracelular tienen diferentes grados de tinción rosada (Figuras 22-25) (Fischer et al., 2008).

Por su parte, las fibras de colágena fueron evaluadas por técnicas picropolicrómicas. Por medio de la tinción tricrómica de Masson se observó la distribución, depósito y empaquetamiento de las fibras colagénicas (azul), los núcleos se tiñen de marrón oscuro, el tejido muscular se tiñe de rojo y el citoplasma se tiñe de rosa (Figuras 26-29) (Leonard et al., 2018), evaluadas a través de una escala análoga visual con intervalo de 0 a 3 de acuerdo a la Tabla 14:

Tabla 14. Escala análoga visual para evaluar colágena total

Valor	Equivalencia de colágena total
0	Nula
1	Escasa
2	Media
3	Abundante

Mientras que la diferenciación de colágenas tipo I y III se llevó a cabo por medio de la técnica de Herovici (fibras rojas y azules, respectivamente), es decir, el colágena se tiñe de color rojo y el nuevo colágena de color azul, y de esta manera evaluar la reparación tisular (Figuras 30-33) (Lillie et al.,1980), evaluadas también a través de una escala análoga visual con intervalo de 0 a 3 de acuerdo a la Tabla 15.

Tabla 15. Escala análoga visual para evaluar colágenas tipo I y tipo III:

Valor	Equivalencia de colágena
0	Nula
1	Escasa
2	Media
3	Abundante

17. Análisis estadístico

Cada experimento consistió de 3 a 6 animales. Todos los resultados están representados como la media \pm error estándar de la media (EEM) para el área de cierre de la herida, las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos se determinaron por medio de un análisis de varianza de una vía y dos vías seguida por una prueba post hoc de Dunnett o Tukey según fuera el caso.

Para el número de vasos sanguíneos del modelo CAM para el grupo control y el vehículo 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.

Para el número de ramificaciones de los distintos tratamientos del modelo CAM se aplicó un análisis de varianza de rangos de una vía, seguido de una prueba post hoc de Dunn's.

18. Resultados

18.1 Obtención de los extractos de cuachalalate

Se obtuvieron 20.1 g del extracto hidroalcohólico al 70% (10.06% de rendimiento con respecto a la corteza seca) y 59.4 g de extracto crudo de CH₂Cl₂ (8.49% de rendimiento con respecto a la corteza seca).

18.2 Aislamiento y caracterización de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos de la corteza de cuachalalate

La mezcla de ácidos anacárdicos se aislaron de las fracciones 10 a la 28 eluidas con hexano:acetato de etilo en proporción 8:2, obteniéndose 25.8 g de un aceite amarillento de alta densidad (ANEXO 3).

El ácido masticadienónico se aisló de las fracciones 35 a 47 eluidas con hexano:acetato de etilo en proporción 7:3, obteniéndose 1.4 g de un sólido blanco cristalino, punto de fusión no corregido de 178-180° C y una pureza cromatográfica del 98.45% determinada mediante HPLC.

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico se aisló de las fracciones 50 a la 69 eluidas con hexano: acetato de etilo en proporción 7:3, después de varios lavados y recristalizaciones con metanol se obtuvieron 3.9 g de un sólido cristalino amorfo, punto de fusión no corregido de 146-148° C y pureza de 98.96% determinada mediante HPLC.

La identidad del ácido 3 α -hidroximasticadienónico se determinó con ayuda de espectros de RMN de hidrógeno (RMN ¹H) y de carbono (RMN ¹³C), los cuales se presentan en los ANEXOS 4 y 5, y corresponden a los descritos en la literatura (Morales Martínez, 2011).

En la Tabla 16 se muestran los desplazamientos y las asignaciones de cada uno de los átomos de hidrógeno y carbono para la molécula.

La identidad del ácido masticadienónico se realizó igualmente por RMN ¹H y RMN ¹³C, (ANEXOS 6 y 7).

En la Tabla 16 se muestran los desplazamientos químicos de ¹H y RMN ¹³C, acorde con los reportados en la literatura (Morales Martínez, 2011).

Tabla 16. RMN ¹H y ¹³C para los ácidos 3α-hidroximasticadienónico y masticadienónico

Ácido masticadienónico		Ácido 3α-hidroximasticadienónico		
Posición	δ (¹³ C)	δ (¹ H)	δ (¹³ C)	δ (¹ H)
1	23.89	2.122 (m)	23.4	1.96 (m)
2	37.61	2.75 (td, J=14.5, 5.5 Hz)	35.52	2.56 (m)
		2.45 (td, J=15.4, 7.0 Hz)		2.44 (dt, J=15.2, 6.9 Hz)
3	75.15	-	75.49	3.46 (t, J=2.8 Hz)
4	35.48	-	35.31	-
5	51.43	1.73 (m)	48.08	2.34 (dd, J=8.7, 5.1 Hz)
6	17.76	1.64 (m)	17.46	1.49(m)
7	117.38	5.30 (q, J=3.2 Hz)	117.35	5.25 (d, J=3.5 Hz)
8	145.57	-	145.61	-
9	33.65	1.52 (m)	30.75	1.41 (m)
10	47.14	-	42.97	-
11	27.69	1.96 (m)	27.68	1.92 (m)
12	34.51	2.12 (m)	33.49	1.49 (m)
13	43.07	-	36.89	-
14	50.79	-	50.71	-
15	34.45	2.12 (m)	33.3	1.63 (m)
16	47.65	2.35 (m)	43.97	1.78 (m)
17	52.31	1.53 (m)	52.35	1.49 (m)
18	21.63	0.78 (s)	21.38	0.77 (s)
19	21.15	1.09 (s)	26.77	0.93 (s)
20	33.09	1.87 (m)	24.99	2.02 (m)
		1.73 (m)		1.93 (d, J=7.3 Hz)
21	18.05	0.89 (m)	17.76	0.89 (m)
22	35.24	1.56 (m)	34.2	1.11 (m)
		1.16 (m)		-
23	25.93	2.57 (m)	26.21	2.56 (m)
		2.41 (m)		2.44 (dt, J=15.2, 6.9 Hz)
24	141.83	6.08 (dd, J=7.4, 1.1 Hz)	143.16	6.08 (dd, J=7.3, 6.4 Hz)
25	127.26	-	126.47	-
26	20.66	2.09 (m)	20.38	2.02 (m)
27	169.02	-	169.89	-
28	24.45	0.93 (s)	21.36	0.84 (s)
29	12.38	0.81 (s)	12.51	0.77 (s)
30	27.23	0.97 (s)	27.39	0.94 (s)

Adicionalmente, a los compuestos tritérpenicos se les realizó difracción de rayos X de monocristal con el programa ORTEP esto con la finalidad de conocer las estructuras (Figura 17 y 19) y el empaquetamiento de las moléculas en la red cristalina (Figura 18 y 20) 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 (Soriano García, 1987).

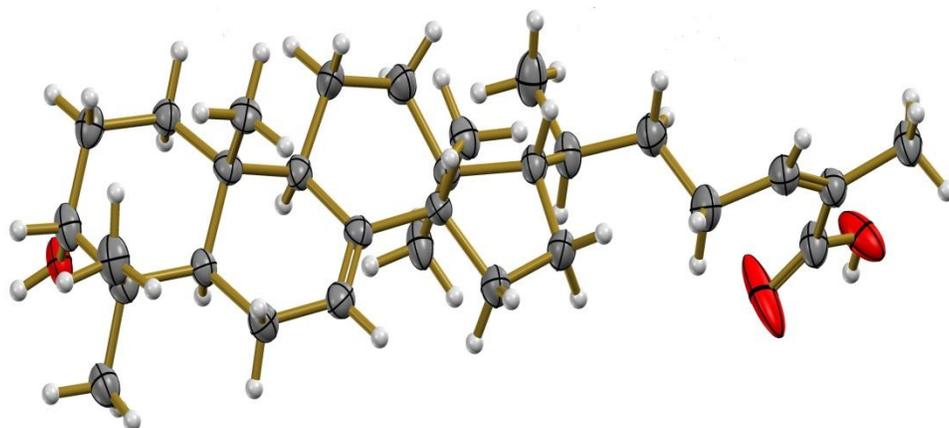


Figura 17. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido 3 α -hidroximasticadienónico que muestra su conformación molecular. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

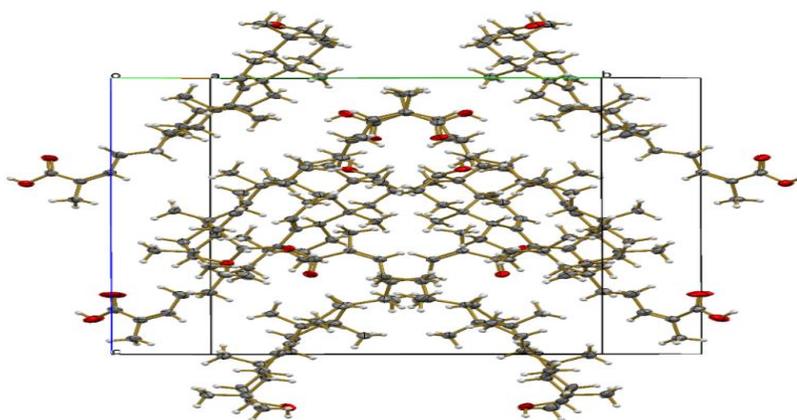


Figura 18. Perspectiva del empaqueo de moléculas del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en la celda unitaria. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

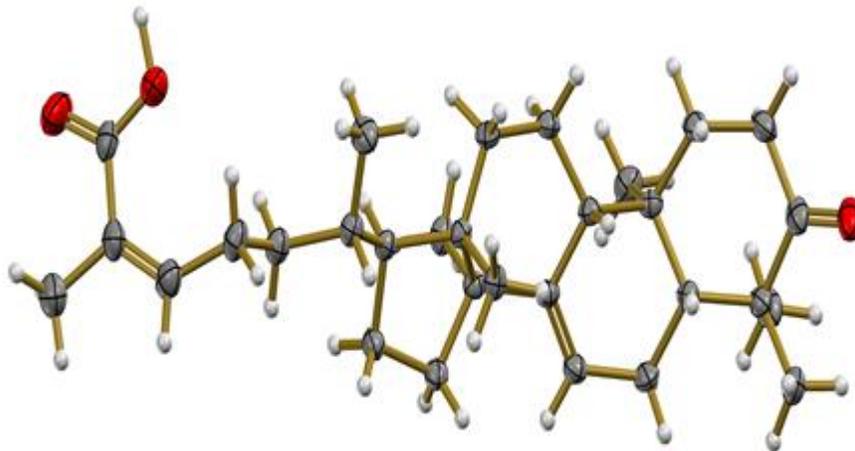


Figura 19. Diagrama ORTEP de los cristales de ácido masticadienónico que muestra su conformación molecular. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

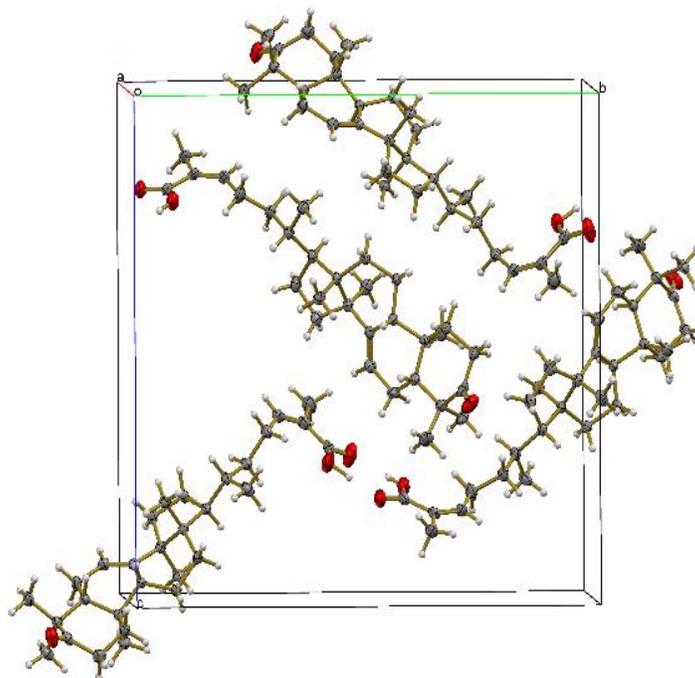


Figura 20. Perspectiva del empaqueo de moléculas del ácido masticadienónico en la celda unitaria. Los átomos son identificados como O: óvalos rojos, C: óvalos grises, H: óvalos blancos.

18.3 Pruebas antibacterianas

18.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas para cada tratamiento se resumen en la Tabla 17. Se observa que los ácidos anacárdicos y el aceite de ajo presentan mayor efecto con menor CMI frente a *S. mutans*, *S. aureus* y *E. coli*. Con respecto a los demás compuestos evaluados, las CMI son elevadas respecto a los compuestos de referencia (cloruro de benzalconio, ampicilina y digluconato de clorhexidina al 0.12%).

Tabla 17. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/mL}$ del extracto hidroalcohólico 70% de cuachalalate, ácido 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico, ácidos anacárdicos, aceite de ajo, cloruro de benzalconio, ampicilina y digluconato de clorhexidina al 0.12%.

Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	EHA	Ácido 3 α	Mastic	Ácidos anacárdicos	Aceite de ajo	Cloruro de benzalconio	AMP	CHX
<i>Streptococcus mutans</i>	2000	>500	>500	125	25	1.56	5.0	1.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4000	>500	>500	125	50	0.78	64.0	1.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4000	>500	>500	>500	>100	50	>512	NP
<i>Escherichia coli</i>	1000	>500	>500	250	50	1.56	16	1.2

EHA: extracto hidroalcohólico 70%; CHX: digluconato de clorhexidina 0.12%; Ácido 3 α : ácido 3 α -hidroximasticadienónico; Mastic: ácido masticadienónico; AMP: Ampicilina y NP: No probada.

Con los resultados obtenidos se corrobora lo reportado en la literatura, donde se ha demostrado que los compuestos del cuachalalate, en este caso los ácidos anacárdicos, y por otra parte el ajo, poseen actividad antimicrobiana contra algunos patógenos importantes del ser humano (Hollands et al., 2016; Jesus et al., 2015; Kyung, 2012).

18.4 Evaluación de la herida y porcentaje de cierre

Se evaluó macroscópicamente la evolución del cierre de la herida durante los 15 días de tratamiento con los compuestos. En la Figura 21 se muestran las fotografías representativas de las heridas y la manera en que disminuyó el área de lesión. Al día 12 (fase de remodelación) la herida se encontraba cicatrizada para los diferentes grupos por lo que las fotografías representativas se muestran a este punto.

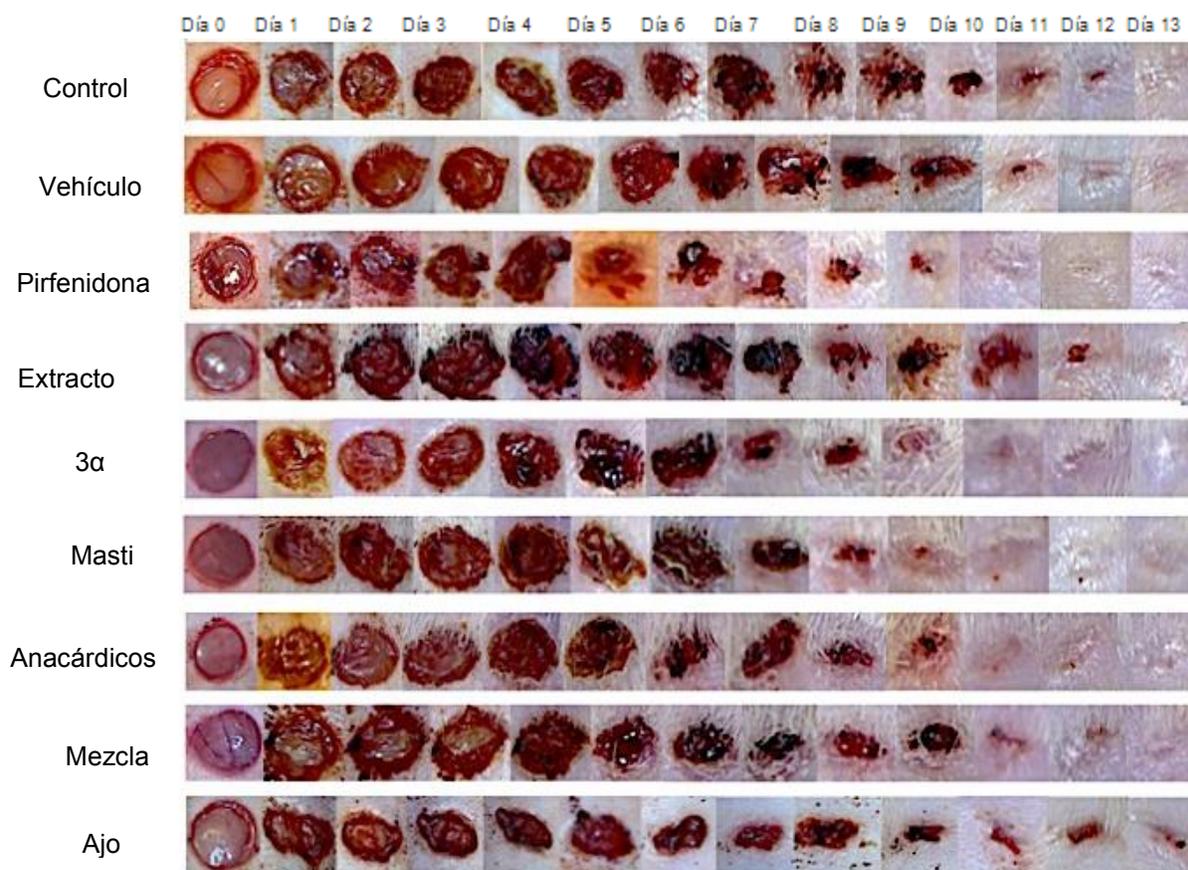
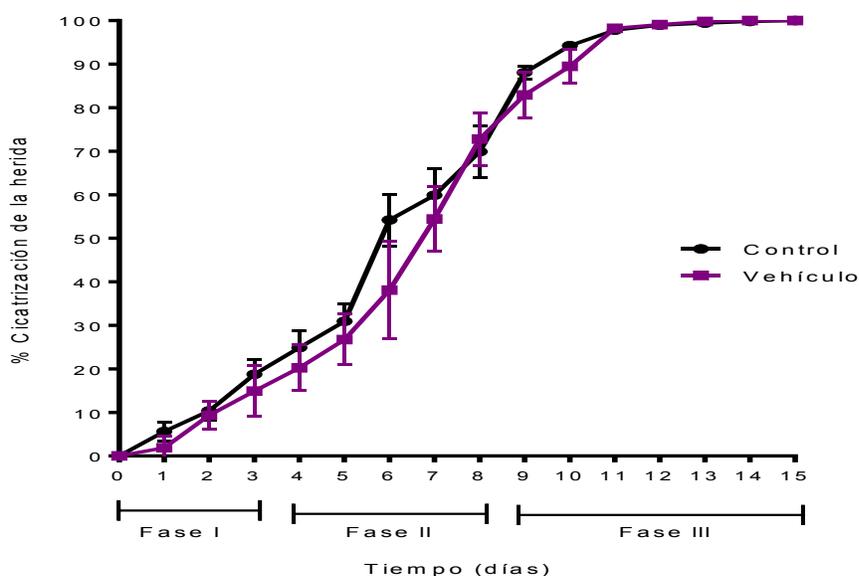


Figura 21. Imágenes fotográficas representativas de la evolución del cierre de la herida de los diferentes grupos tratados: control, vehículo, pirfenidona, extracto (extracto hidroalcohólico de *A. adstringens*), 3 α (ácido 3 α -hidroximasticadienónico), masti (ácido masticadienónico), anacárdicos (ácidos anacárdicos), mezcla (mezcla de los ácidos), ajo (mezcla aceite de ajo-extracto hidroalcohólico de cuachalalate 0.016%)

La determinación se expresó como porcentaje de cierre (contracción de la herida) para los 15 días de evaluación de los compuestos, abarcando las tres fases de la cicatrización: fase I-hemostasia/inflamatoria (días 0-3), fase II-proliferativa (días 4-8) y fase III-remodelación (días 9-15).

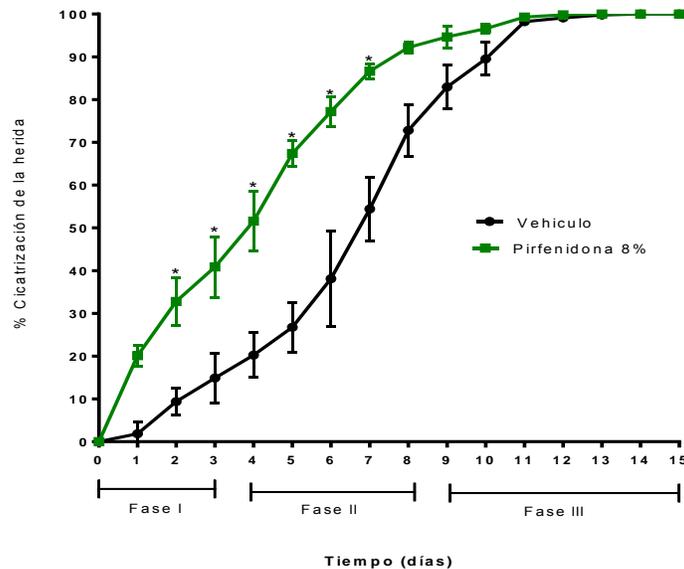
Los porcentajes de cierre de la herida durante los 15 días de tratamiento del grupo control (cicatrización normal, sin la influencia de algún agente externo) y vehículo se presentan en la Gráfica 1. Se observa que para el grupo control y el vehículo no existe diferencia significativa en ninguno de los días ($p > 0.05$), lo que indica que el vehículo utilizado no influye en el proceso natural de cicatrización, y que los resultados obtenidos se deberán exclusivamente al efecto de los compuestos evaluados.



Gráfica 1. Porcentaje de cierre de la herida del grupo control y el grupo vehículo. Cada punto representa la media \pm EEM n=6

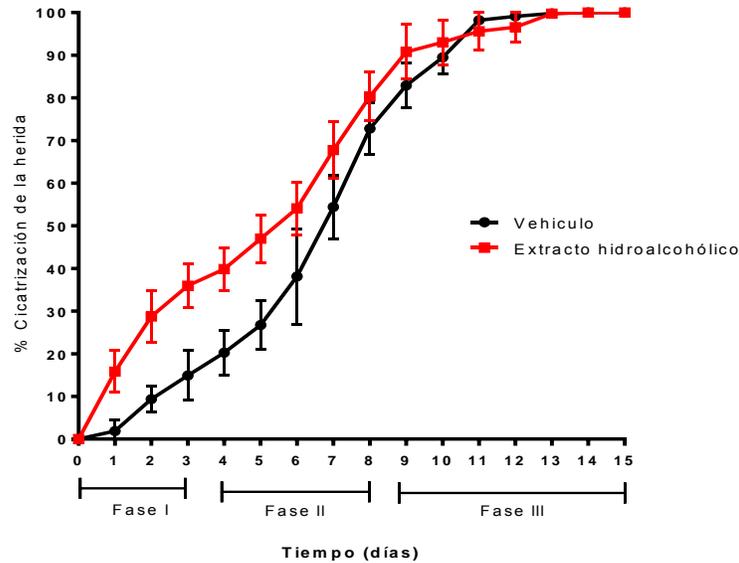
De la gráfica 2 a 8 se muestra el efecto en el porcentaje en cierre que tuvieron los distintos tratamientos evaluados en comparación con el vehículo, asimismo se representan las diferencias significativas encontradas al realizar el respectivo análisis estadístico.

Con la pirfenidona se encontró diferencia significativa en los días 2 a 7 (Gráfica 2), abarcando la fase inflamatoria y proliferativa de la cicatrización. Los porcentajes de cierre para la pirfenidona fueron 32.8 %, 40.8 %, 51.58 %, 67.40 %, 77.21 % y 86.63%, y para el vehículo fueron de 9.36 %, 14.9 %, 20.25 %, 26.75 %, 38.12 % y 54.41 % para los mismos días.



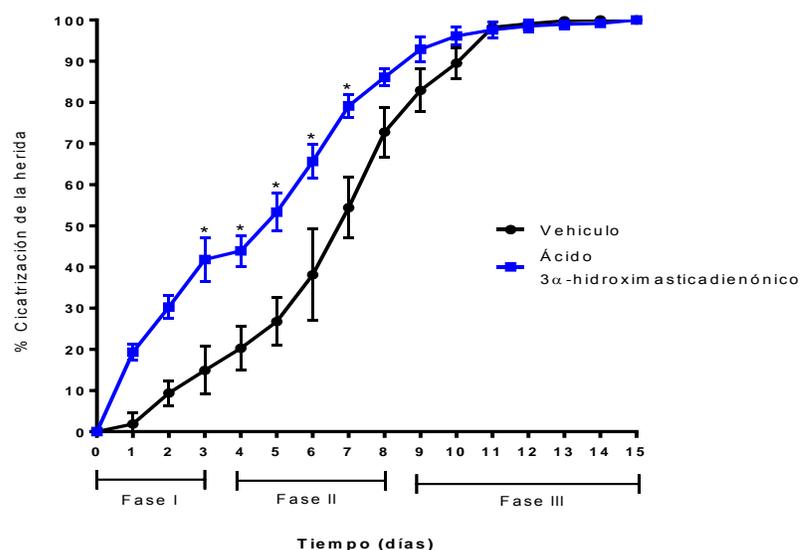
Gráfica 2. Porcentaje de cierre de la herida del grupo pirfenidona 8% y control (vehículo). Cada punto representa la media \pm EEM $n=6$ $*p<0.05$, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una comparación entre el Control y el tratamiento en el mismo día, utilizando una prueba post-hoc de Dunnet.

En la Gráfica 3 se observa que existe una tendencia en el porcentaje de cierre de la herida en los primeros 5 días de tratamiento (extracto hidroalcohólico de cuachalalate 70%) sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencia significativa con respecto al vehículo.



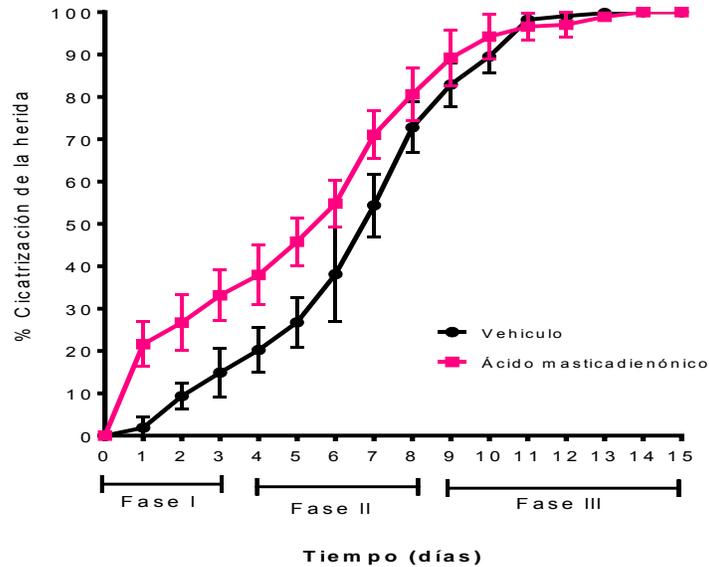
Gráfica 3. Porcentaje de cierre de la herida del grupo extracto hidroalcohólico al 70% de cuachalalate y el control (vehículo). Cada punto representa la media \pm EEM n=6.

La Gráfica 4 muestra el porcentaje de cierre de la herida del ácido 3 α -hidroximasticadienónico comparado con el vehículo, se observa diferencia significativa del día 3 hasta el día 7 ($p < 0.05$), lo que corresponde al último día de la fase inflamatoria y el penúltimo día de la fase proliferativa, respectivamente. Los porcentajes de cicatrización para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico fueron 41.81%, 43.94 %, 53.34 %, 65.64 % y 79.13 %, y para el vehículo de 14.90 %, 20.25%, 26.75 %, 38.12 % y 54.42 %.



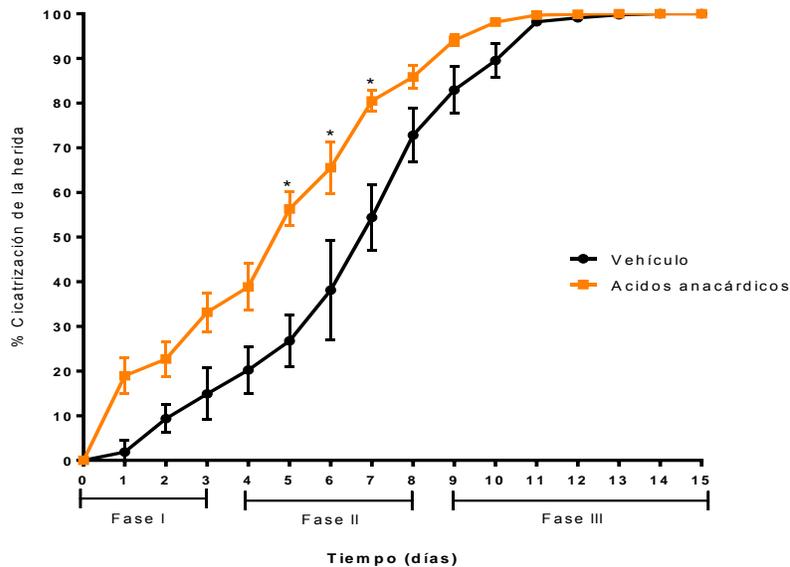
Gráfica 4. Porcentaje de cierre de la herida del grupo ácido 3α-hidroximasticadienónico y el control (vehículo). Cada punto representa la media ± EEM n=6 *p<0.05, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una comparación entre el Control y el tratamiento en el mismo día, utilizando una prueba post-hoc de Dunnet.

En la Gráfica 5 se presentan los resultados para el cierre de la herida por el ácido masticadienónico y el vehículo para los 15 días de tratamiento. Al realizar el análisis estadístico no se observó diferencia significativa en ningún día evaluado, por lo que el ácido masticadienónico no favorece la velocidad de cierre de la herida en el proceso de cicatrización.



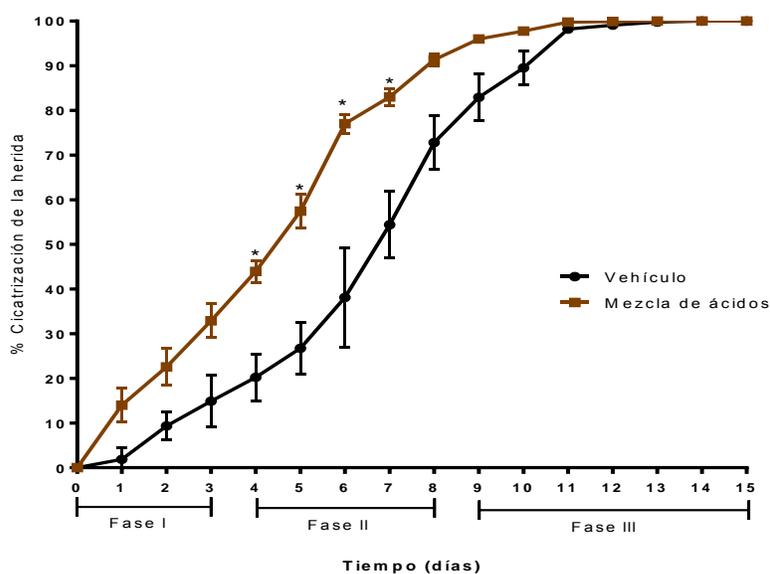
Gráfica 5. Porcentaje de cierre de la herida del grupo ácido masticadienónico y el control (vehículo). Cada punto representa la media \pm EEM n=6.

Para el grupo de ácidos anacárdicos se encontró diferencia significativa con respecto al vehículo en los días 5 al 7 (Gráfica 6), lo que corresponde a la fase II de la cicatrización, con un porcentaje en cierre de la herida de 56.31 %, 65.55 % y 80.49% para los ácidos anacárdicos y 26.75 %, 38.12 %, 54.41 % para el vehículo.



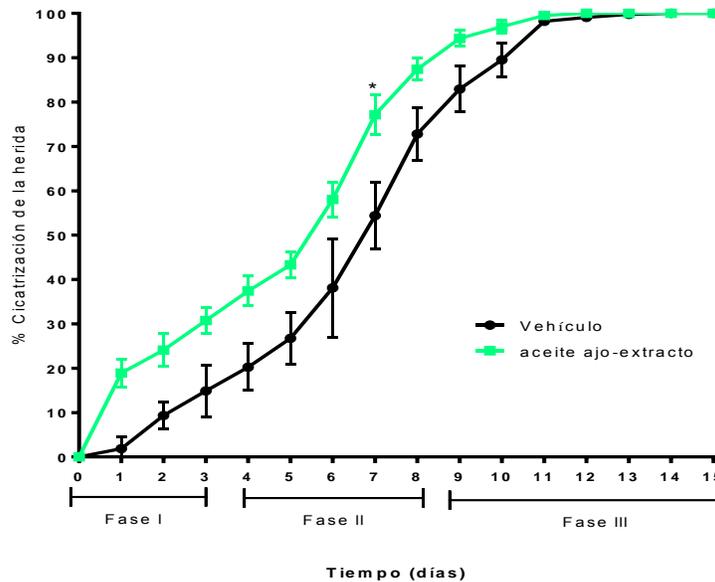
Gráfica 6. Porcentaje de cierre de la herida del grupo ácidos anacárdicos y el control (vehículo). Cada punto representa la media \pm EEM n=6 *p<0.05, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una comparación entre el Control y el tratamiento en el mismo día, utilizando una prueba post-hoc de Dunnet.

En la Gráfica 7 se muestran los resultados del cierre de la herida de la mezcla de ácidos (ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y ácidos anacárdicos, proporción 1:1:1), al hacer el análisis estadístico se observó diferencia significativa en los días 4 a 7 (fase proliferativa de la cicatrización) con un porcentaje en cierre para la mezcla de 43.94 %, 57.46 %, 77.03 % y 83.03 % y 20.25 %, 26.75%, 38.12 % y 54.41 % para el vehículo.



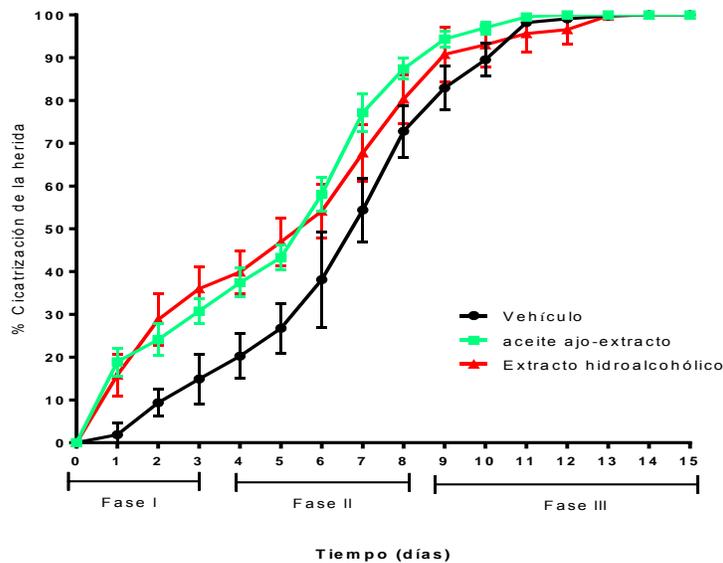
Gráfica 7. Porcentaje de cierre de la herida de la mezcla de ácidos y el control (vehículo). Cada punto representa la media \pm EEM $n=6$ * $p<0.05$, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una comparación entre el Control y el tratamiento en el mismo día, utilizando una prueba post-hoc de Dunnet.

Finalmente, se evaluó la capacidad cicatrizante de una combinación de dos productos naturales; el cuachalalate y el ajo (extracto hidroalcohólico 70 % de cuachalalate y aceite de ajo), sólo se observó diferencia significativa en el día 7 (fase proliferativa de la cicatrización) con un porcentaje en cierre de 77.14 % para el ajo-extracto 0.016% y de 54.41 % para el vehículo, como se observa en la Gráfica 8.



Gráfica 8. Porcentaje de cierre de la herida de la mezcla aceite de ajo-extracto hidroalcohólico de cuachalalate 0.016% y el vehículo. Cada punto representa la media \pm EEM n=6 *p<0.05, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una comparación entre el Control y el tratamiento en el mismo día, utilizando una prueba post-hoc de Dunnet.

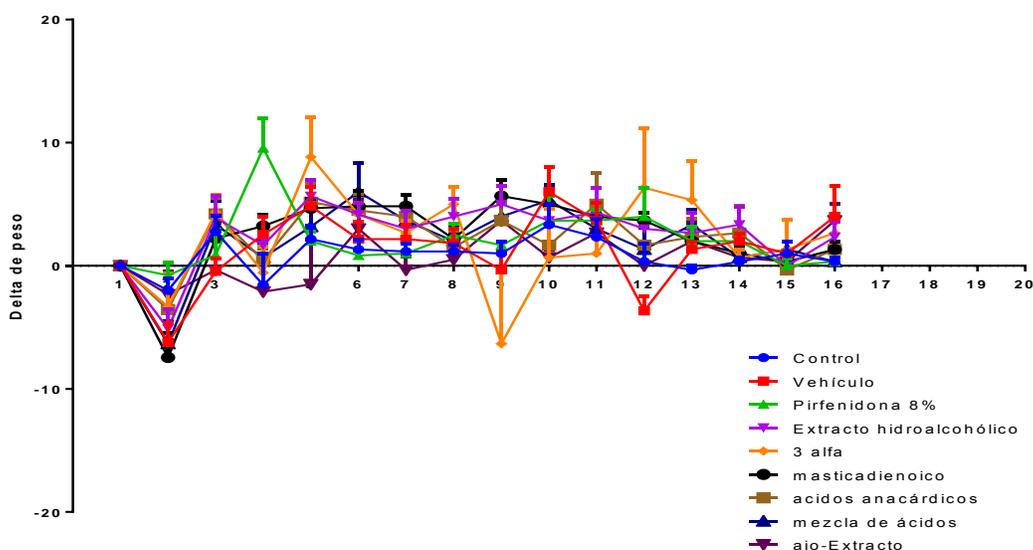
No se encontró diferencia estadísticamente significativa con respecto al extracto hidroalcohólico 70% solo, lo cual indica que el aceite de ajo no favorece a la velocidad de cierre del extracto de cuachalalate (Gráfica 9).



Gráfica 9. Porcentaje de cierre de la herida de la mezcla aceite de ajo-extracto hidroalcohólico de cuachalalate 0.016%, vehículo y el extracto hidroalcohólico de cuachalalate. Cada punto representa la media \pm EEM n=6.

18.5 Peso de los animales

Se observó que hay un porcentaje de variación del 10 % respecto al peso original (día 0) en todos los grupos (Gráfica 10), con una disminución en los primeros días que puede ser atribuible al malestar general como dolor generado por la manipulación y el procedimiento de escisión, sin embargo de acuerdo con los parámetros de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, no se considera que esa pérdida de peso sea indicativo de alguna patología.



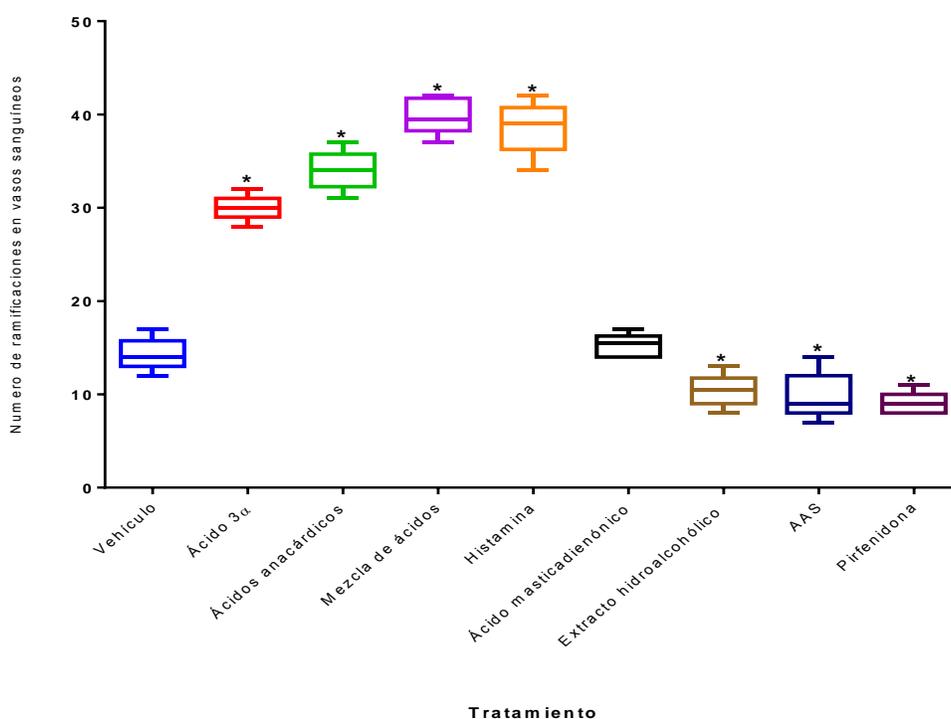
Gráfica 10. Cambio de peso de los animales empleados durante 15 días de tratamiento

18.7 Modelo CAM para evaluación de la angiénesis

Se evaluaron los distintos tratamientos a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$. Se encontró que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, los ácidos anacárdicos y la mezcla de los 3 ácidos (ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y ácidos anacárdicos en proporción (1:1:1) poseen propiedades proangiogénicas, de forma opuesta al extracto hidroalcohólico al 70% que posee propiedades antiangiogénicas. Finalmente, con él ácido masticadienónico no se observaron propiedades angiogénicas o antiangiogénicas, al no mostrar diferencia significativa en el número de ramificaciones en vasos sanguíneos. Como era de esperarse se

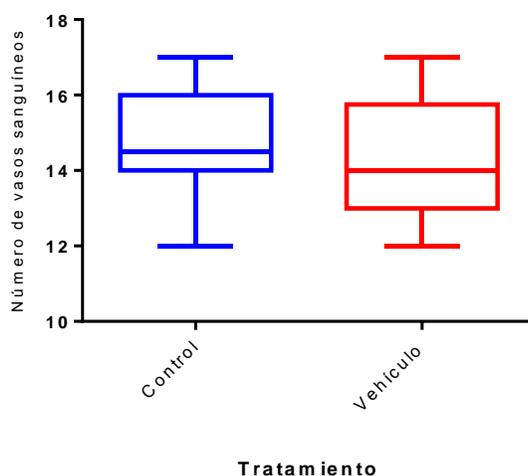
observaron las propiedades antiangiogénicas de la pirfenidona y el ácido acetilsalicílico y proangiogénicas de la histamina.

En la Gráfica 11 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 hidroalcohólico de cuachalalate presentó una mediana de 10.5, siendo estadísticamente diferente del control, lo cual indica una 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.



Gráfica 11. Número de ramificaciones de vasos sanguíneos en el modelo de 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.

La Gráfica 12 muestra los resultados del grupo control y vehículo, con medianas de 14.5 y 14, respectivamente. Al no haber diferencia significativa entre estos grupos se corrobora que el disco de metilcelulosa y el disolvente empleado (DMSO 0.1%) no desencadenan respuestas sobre la angiogénesis, y los resultados obtenidos se deberán únicamente a las propiedades de los compuestos evaluados.



Gráfica 12. Número de vasos sanguíneos en el modelo de CAM de embrión de pollo para el grupo control y el vehículo. 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

En la Figura 22 se muestran fotografías representativas para los distintos tratamientos aplicados en la CAM a una concentración de 30 µg/mL. Los resultados muestran que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, los ácidos anacárdicos y la mezcla de ácidos poseen propiedades proangiogénicas (Figura 22 E,G,H). Un dato interesante fue que el extracto hidroalcohólico (Figura 22 I) posee propiedades antiangiogénicas, finalmente el que careció de alguna propiedad angiogénica o antiangiogénica fue el ácido masticadienónico (Figura F) ya que no mostró diferencia significativa en el número de ramificaciones en vasos sanguíneos. La pifrenidona y ácido acetilsalicílico (Figura 22 J y D) como testigos antigangiogénicos y la histamina (Figura 22 C) como testigo proangiogénico corroboran los resultados y dan un indicativo que la experimentación se llevó de forma adecuada.

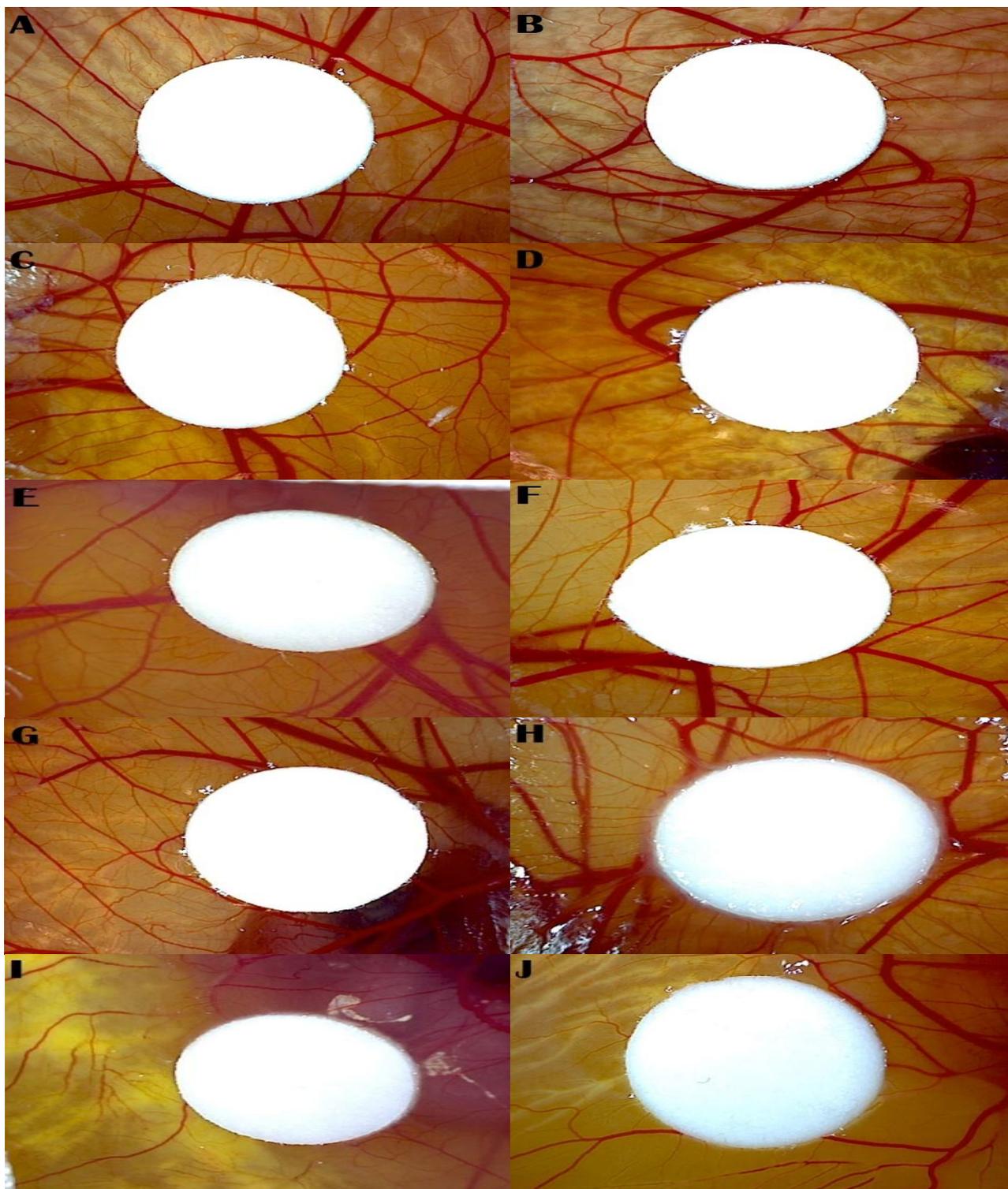


Figura 22. Fotografías representativas de la CAM para los distintos tratamientos; A) vehículo, B) control, C) histamina, D) ácido acetilsalicílico, E) ácido 3 α -hidroximasticadienónico, F) ácido masticadienónico, G) ácidos anacárdicos, H) mezcla de ácidos, I) extracto hidroalcohólico 70% cuachalalate, J) pirfenidona.

En la Tabla 18, se resume si los diferentes tratamientos presentan propiedad proangiogénica o antiangiogénica.

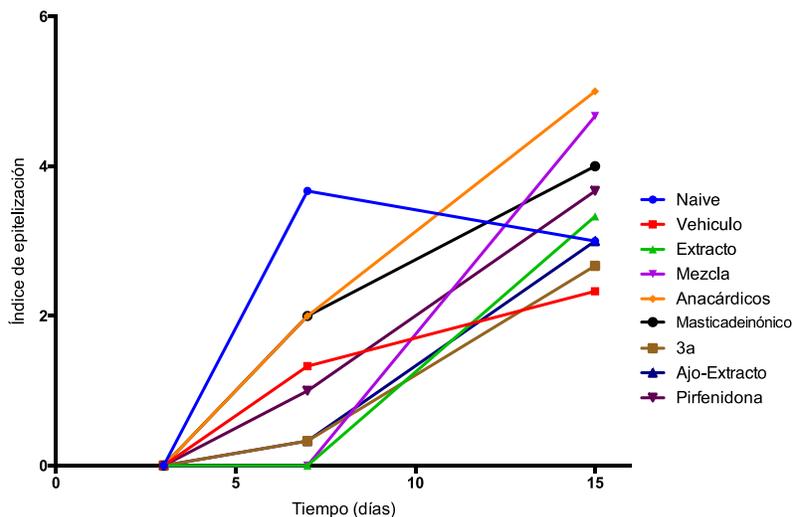
Tabla 18. Tratamiento evaluado y propiedad respecto a la angiogénesis

Tratamiento	Mediana	Actividad
Vehículo	14	---
Ácido 3 α -hidroximasticadienónico	30	Proangiogénica
Ácidos anacárdicos	34	Proangiogénica
Mezcla de ácidos	39	Proangiogénica
Histamina	39.5	Proangiogénica
Ácido masticadienónico	15.5	---
Extracto hidroalcohólico cuachalalate	10.5	Antiangiogénica
Ácido acetilsalicílico	9	Antiangiogénica
Pirfenidona	9	Antiangiogénica

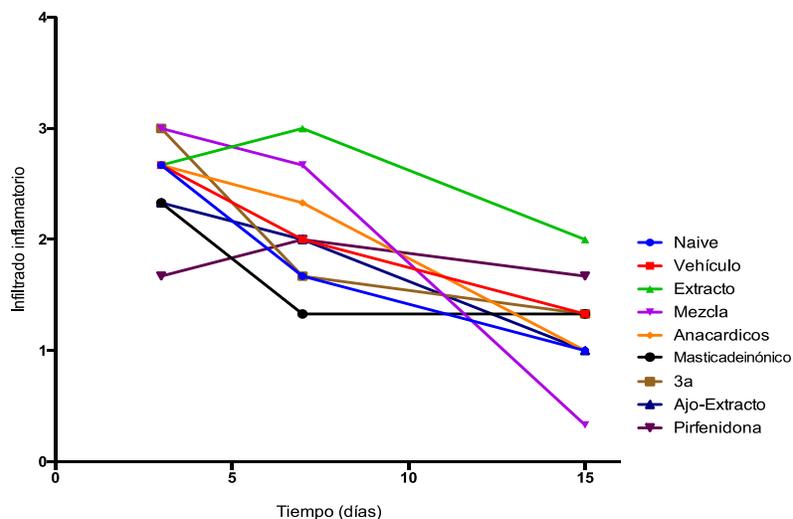
18.8 Análisis histológico

Los tejidos tratados con el extracto hidroalcohólico 70% de cuachalalate, la mezcla o el vehículo mostraron mayor reacción inflamatoria en la zona de la herida al día 7 cuando se les comparó con el control; este efecto se asoció con un menor índice de epitelización para el mismo tiempo (Gráfica 13). Morfológicamente los tejidos se caracterizaron por presentar un epitelio discontinuo e inmaduro a los 7 días que incrementó su índice de epitelización para el día 15, igualando al control. Para las lesiones de los animales tratados con la mezcla de los ácidos anacárdicos, ácido masticadienónico y ácido 3 α -hidroximasticadienónico, sólo las expuestas al primero presentaron aumento en el infiltrado inflamatorio a los 7 días post tratamiento, pero como en el caso del extracto hidroalcohólico de cuachalalate y la mezcla de los ácidos, igualaron las características del control al día 15. No obstante, los efectos de los compuestos por separado sí se reflejaron en el índice de epitelización donde el ácido 3 α -hidroximasticadienónico mostró la mayor inmadurez epidérmica durante todo el experimento (Gráfica 13). Finalmente, los tejidos derivados de los animales tratados en la zona de la herida con pirfenidona 8% y la combinación aceite de ajo-

extracto hidroalcohólico de cuachalalate no mostraron algún cambio con el infiltrado inflamatorio respecto al control, pero sí reflejaron una menor madurez epitelial al día 7 que se recuperó hasta el nivel del control para el día 15. En la Tabla 19 se mencionan las características del infiltrado celular respecto al tratamiento y el tiempo.



Gráfica 13. Gráfica de índice de epitelización de los diferentes tratamientos comparados contra el control durante los 15 días de evaluación.



Gráfica 14. Gráfica de infiltrado inflamatorio de los diferentes tratamientos comparados contra el control durante los 15 días de evaluación.

Tabla 19. Evaluación histomorfológica del infiltrado celular en la zona de la lesión en relación con el tratamiento y el tiempo.

<i>Tratamiento</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 15</i>
<i>Control</i>	Abundante en la zona papilar y sin epitelio	Escaso en la zona de la herida y epitelio discontinuo sin papilas dérmicas	Escaso en la zona de la herida y epitelio maduro con papilas dérmicas
<i>Vehículo</i>	Abundante en la zona papilar y sin epitelio	Escaso en la zona de la herida y epitelio discontinuo sin papilas dérmicas	Escaso en la zona de la herida y epitelio inmaduro sin papilas dérmicas
<i>Extracto hidroalcohólico 70% cuachalalate</i>	Abundante en la zona papilar por debajo de la costra sin epitelio	Abundante en la zona de la herida por debajo de la costra sin epitelio	Moderado en la zona de la herida con epitelio delgado e inmaduro y papilas dérmicas
Mezcla de ácidos	Abundante en la zona papilar por debajo de la costra	Abundante en la zona papilar por debajo de la costra sin epitelio	Escaso en la zona de la herida con epitelio maduro y papilas dérmicas
<i>Ácido 3α-hidroximasticadienónico</i>	Abundante en la zona de la herida sin epitelio	Moderado en la zona de la herida y epitelio discontinuo e inmaduro	Escaso en la zona de la herida con epitelio inmaduro y escasas papilas dérmicas
<i>Ácido masticadienónico</i>	Moderado en la zona de la herida sin epitelio	Moderado en la zona de la herida y epitelio discontinuo e inmaduro	Escaso en la zona de la herida con epitelio maduro y papilas dérmicas
<i>Mezcla ácidos anacárdicos</i>	Abundante en la zona papilar por debajo de la costra	Abundante en la zona papilar y epitelio discontinuo con papilas dérmicas	Escaso en la zona de la herida con epitelio maduro y papilas dérmicas
<i>Pirfenidona 8%</i>	Moderado en la zona de la herida por debajo de la costra	Moderado en la zona de la herida con epitelio discontinuo e inmaduro	Moderado en la zona de la herida con epitelio delgado e inmaduro sin papilas dérmicas
<i>Aceite de ajo-extracto cuachalalate</i>	Abundante en la zona papilar sin epitelio	Moderado en la zona de la herida con epitelio discontinuo e inmaduro	Escaso en la zona de la herida con epitelio inmaduro sin papilas dérmicas

Mezcla de ácidos: ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y mezcla de ácidos anacárdicos, (proporción 1:1:1); aceite de ajo-extracto cuachalalate: combinación aceite de ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate 0.016%.

En las Figuras 23-26 se muestran las fotomicrografías de la tinción de hematoxilina-eosina, donde se aprecia el infiltrado celular, la reepitelización y la formación del tejido de granulación de los diferentes tratamientos a los días 3, 7 y 15 post-tratamiento.

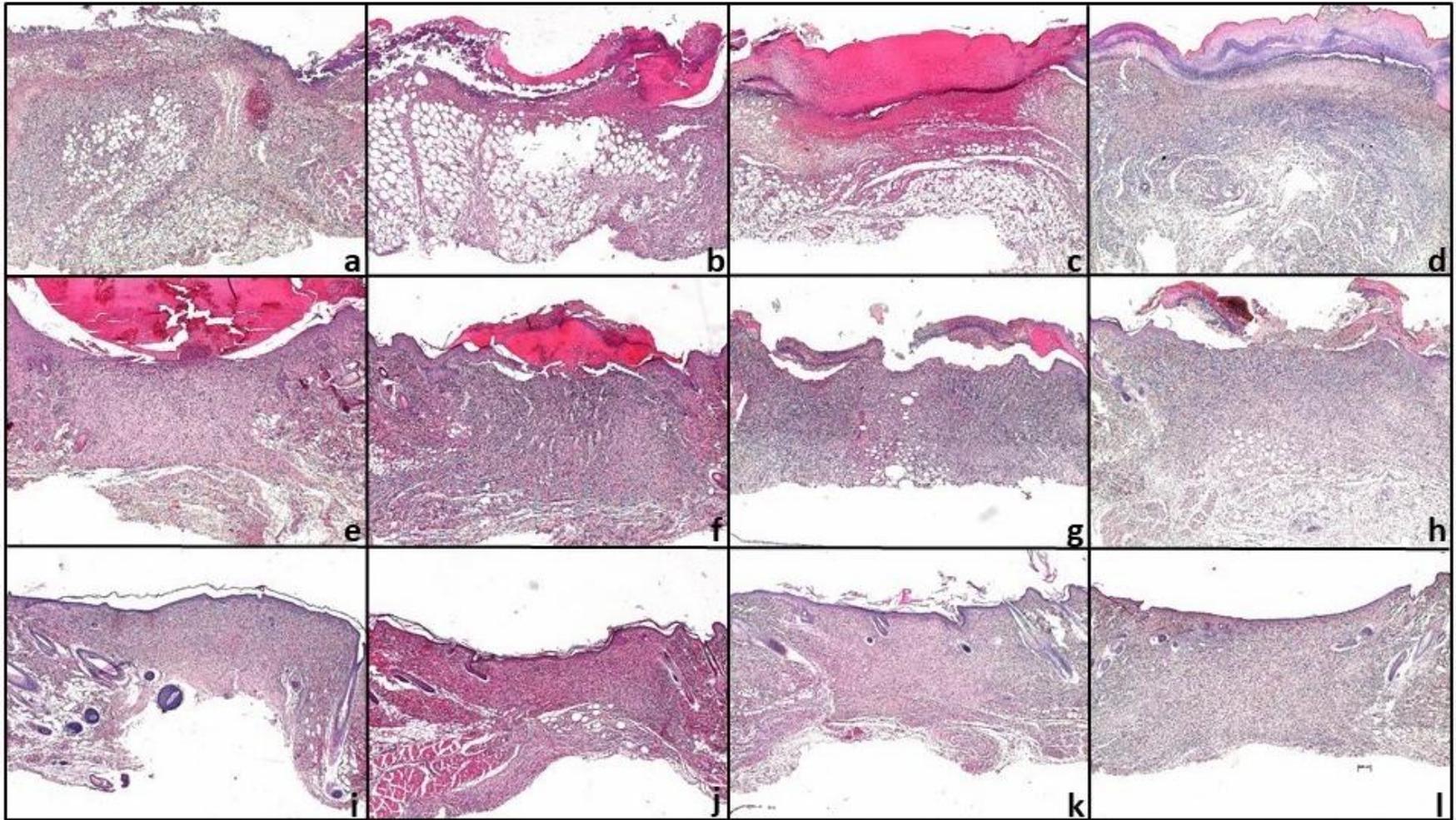


Figura 23. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos(a,e,i) corresponden al grupo control, (b,f,j) grupo vehículo, (c,g,k) grupo mezcla y (d,h,l) al grupo extracto de cuachalalate, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

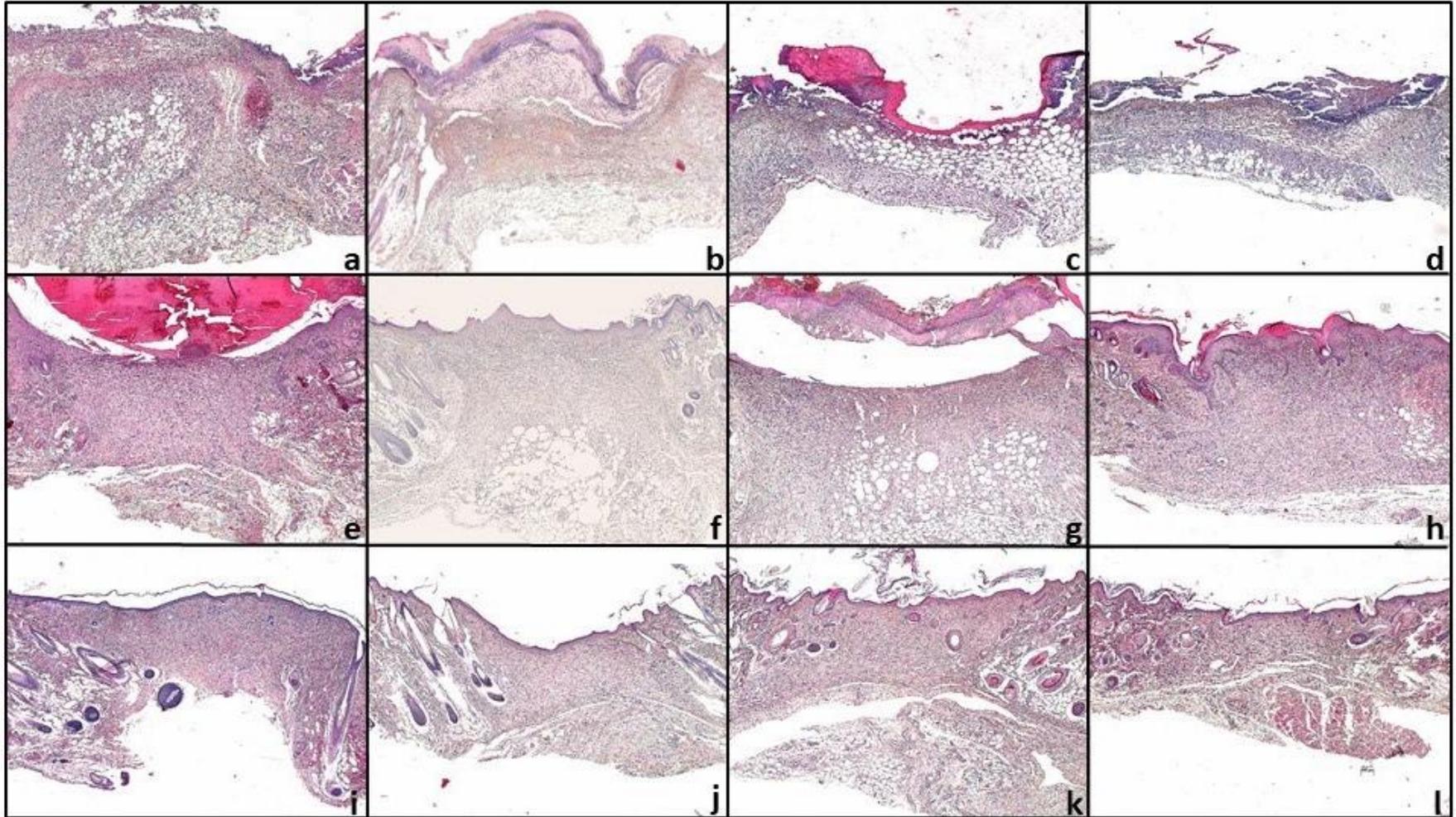


Figura 24. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos (a,e,i) corresponden al grupo control, (b,f,j) ácido masticadienónico, (c,g,k) ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (d,h,l) ácidos anacárdicos, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

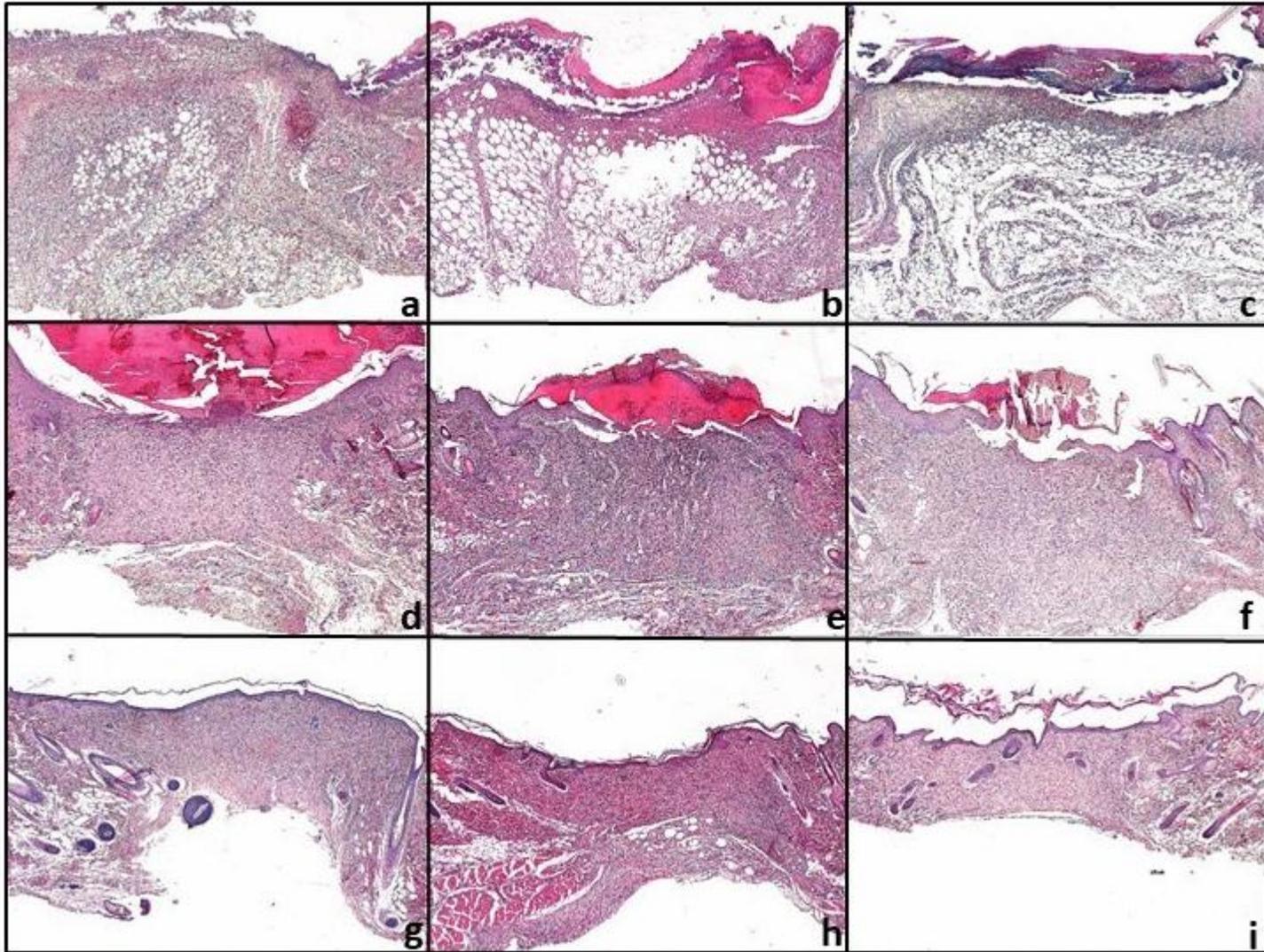


Figura 25. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos (a,d,g) corresponden al grupo control, (b,e,h) grupo vehículo, (c,f,i) Pirfenidona, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

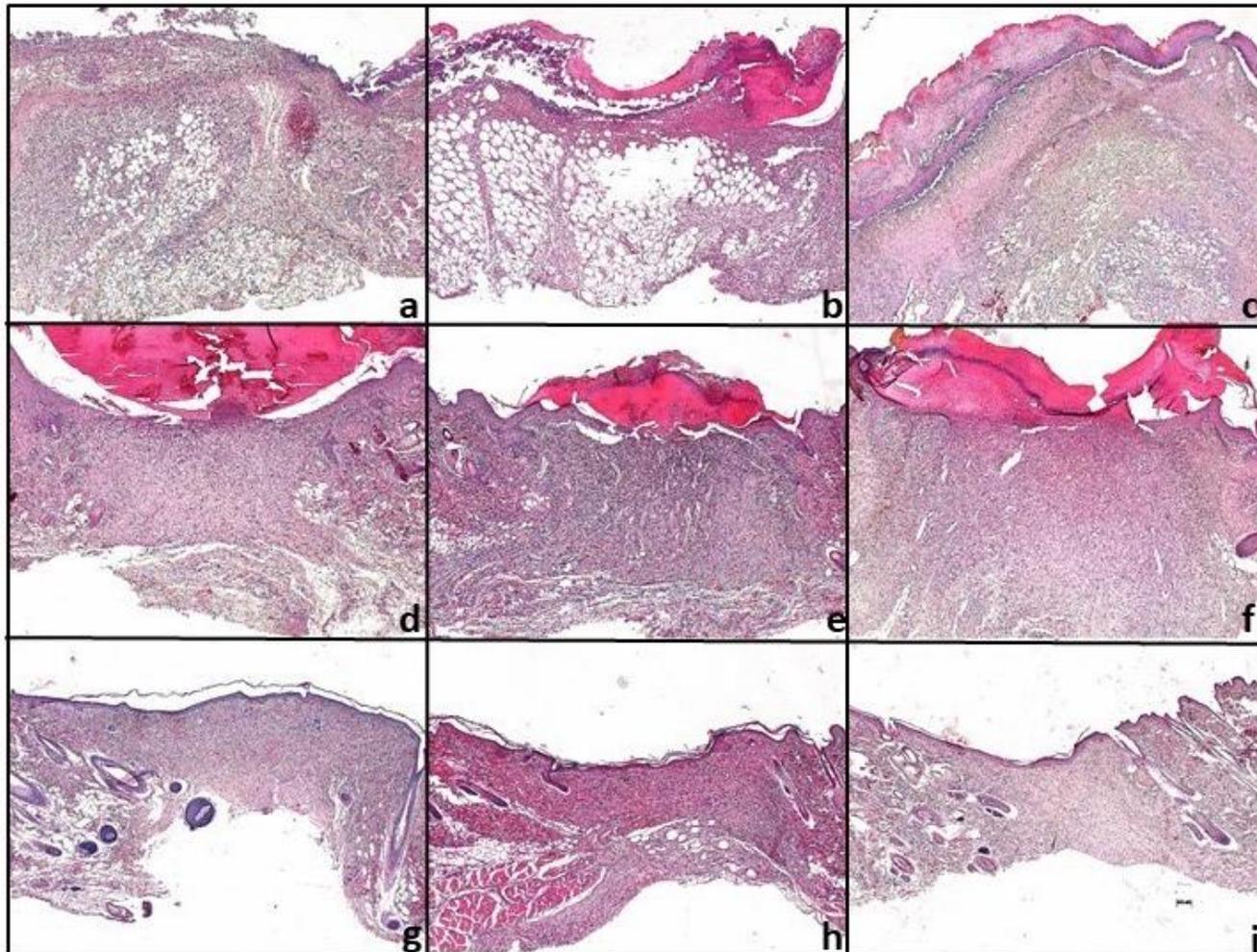
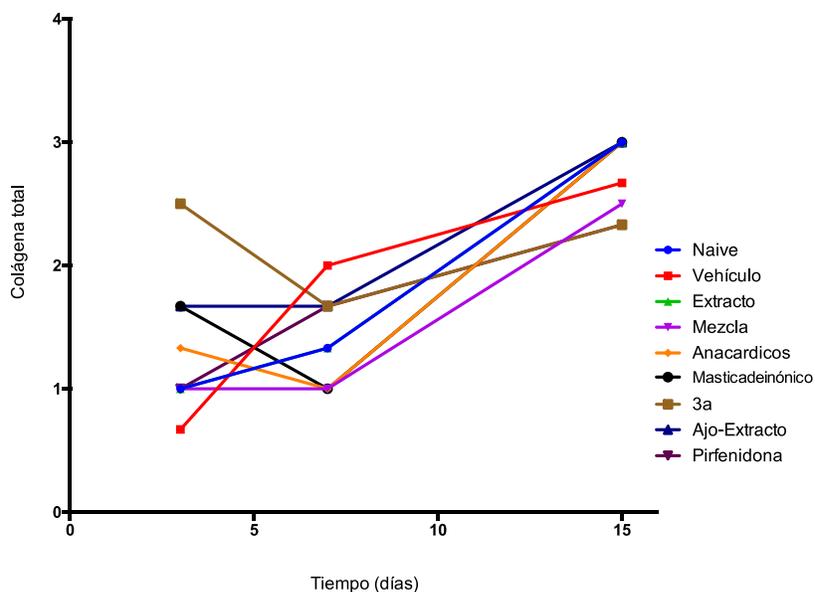


Figura 26. Tinción de H&E. Fotomicrografías de los tejidos (a,d,g) corresponden al grupo control, (b,e,h) grupo vehículo, (c,f,i) aceite ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

A través de la tinción tricrómica de Masson se valoró la proporción y distribución de las fibras de colágena total (azul en fotomicrografías 27-30). Comparados con el control, solamente la zona de lesión de los tejidos derivados de los animales tratados con la fracción del ácido 3 α -hidroximasticadienónico o el vehículo presentaron un incremento en la proporción de colágena a los días 3 y 7 post-lesión, respectivamente, donde los tratamientos con el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y el masticadienónico evidenciaron un empaquetamiento semejante al control a los 15 días post-lesión (Gráfica 15); todos los demás tratamientos exhibieron fibras de regulares a delgadas, lo que podría indicar que aún se encontraban en un estado de remodelación temprana. En la Tabla 20 se mencionan características de la arquitectura de la matriz colagénica en la zona de la lesión de los diferentes tratamientos y a los diferentes tiempos.



Gráfica 15. Gráficos de colágena total de los diferentes tratamientos comparados contra el control durante los 15 días de evaluación.

Tabla 20. Evaluación histomorfológica de la arquitectura de la matriz colagénica en la zona de la lesión en relación con el tratamiento y el tiempo.

<i>Tratamiento</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 7</i>	<i>Día 15</i>
<i>Control</i>	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras delgadas en dermis papilar y fibras gruesas en dermis reticular profunda	Fibras gruesas en toda la zona de la herida
<i>Vehículo</i>	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras delgadas en dermis papilar y fibras gruesas en dermis reticular profunda	Fibras delgadas y gruesas en la zona de la herida
<i>Extracto hidroalcohólico 70% cuachalalate</i>	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras regulares en toda la zona de la herida
<i>Mezcla de ácidos</i>	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras regulares en toda la zona de la herida
<i>Ácido 3α-hidroximasticadienónico</i>	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras gruesas en toda la zona de la herida
<i>Ácido masticadienónico</i>	Fibras regulares en dermis papilar	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras gruesas en toda la zona de la herida
<i>Mezcla ácidos anacárdicos</i>	Fibras regulares en dermis papilar y centro de la herida	Fibras delgadas en dermis papilar y fibras regulares en dermis reticular profunda	Fibras regulares en toda la zona de la herida
<i>Pirfenidona 8%</i>	Fibras regulares en toda la zona de la herida	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras regulares en toda la zona de la herida
<i>Aceite de ajo-extracto cuachalalate</i>	Fibras delgadas en toda la zona de la herida	Fibras delgadas principalmente en la zona de dermis papilar	Fibras delgadas en toda la zona de la herida

Mezcla de ácidos: ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y mezcla de ácidos anacárdicos, (proporción 1:1:1); aceite de ajo-extracto cuachalalate: combinación aceite de ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate 0.016%.

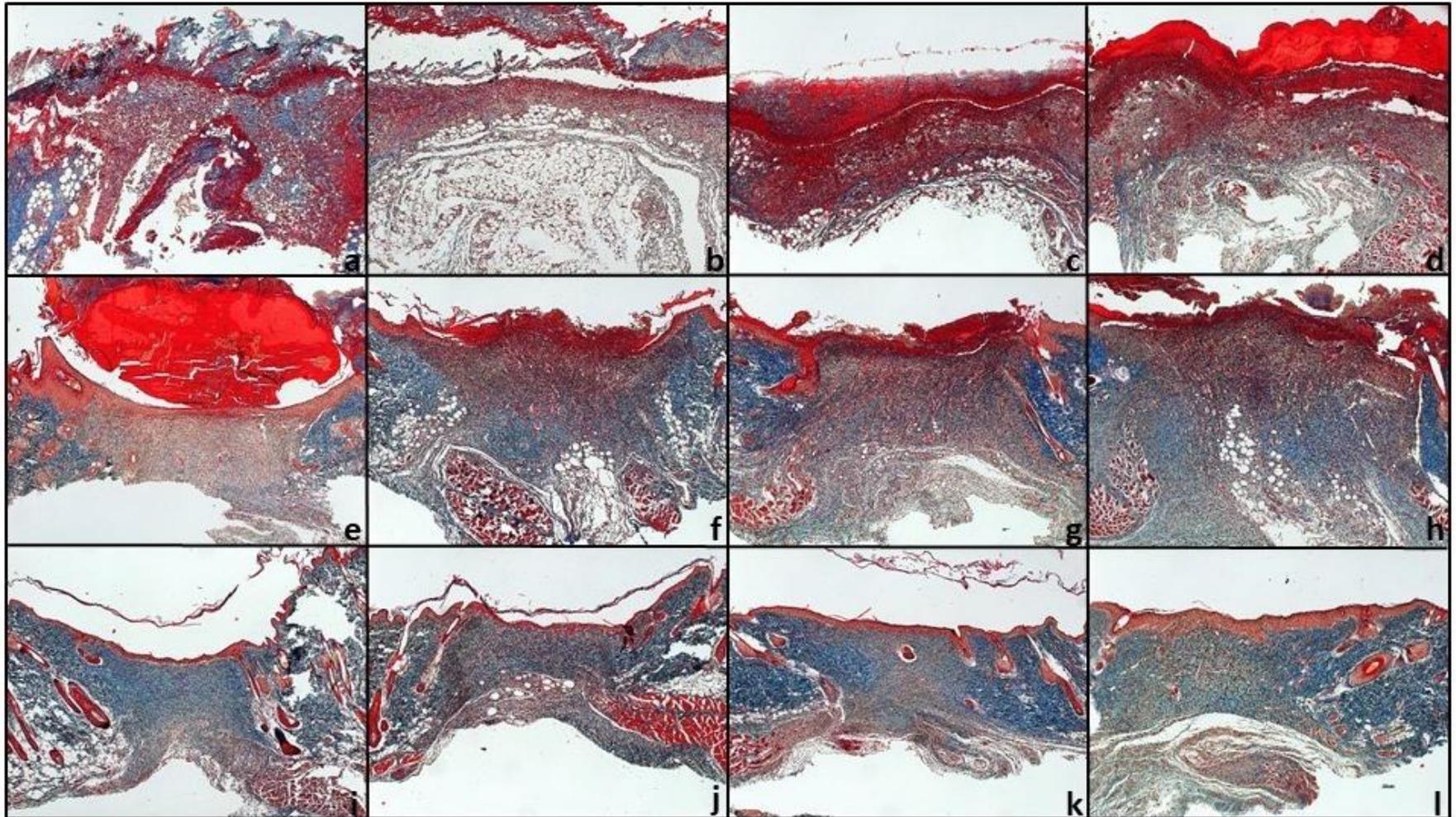


Figura 27. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos (a,e,i) corresponden al grupo control, (b,f,j) grupo vehículo, (c,g,k) mezcla y (d,h,l) extracto de cuachalalate, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

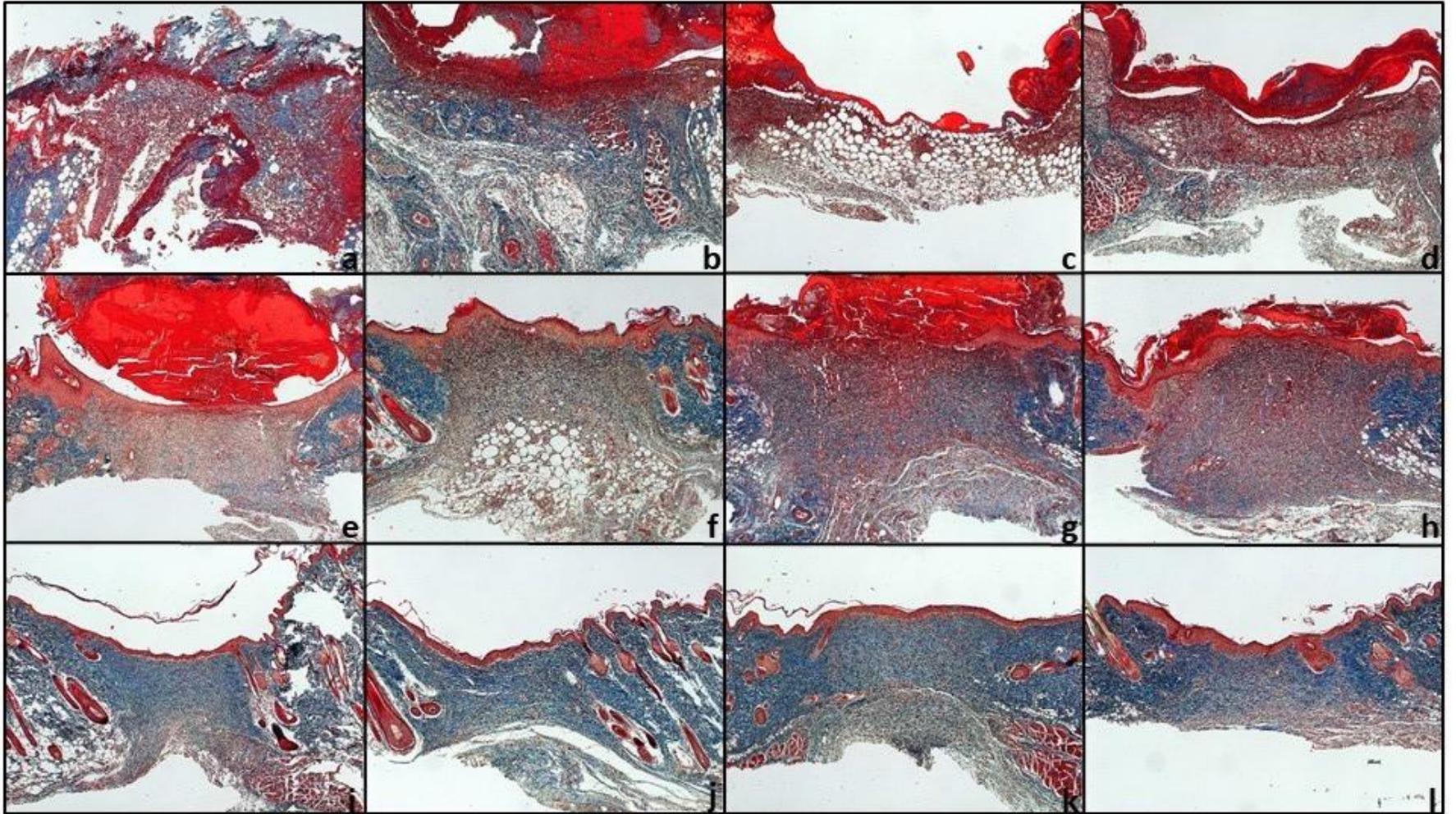


Figura 28. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos (a,e,i) corresponden al grupo control, (b,f,j) ácido masticadienónico, (c,g,k) ácido 3 α -hidroximasticadienónico y (d,h,l) ácidos anacárdicos, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

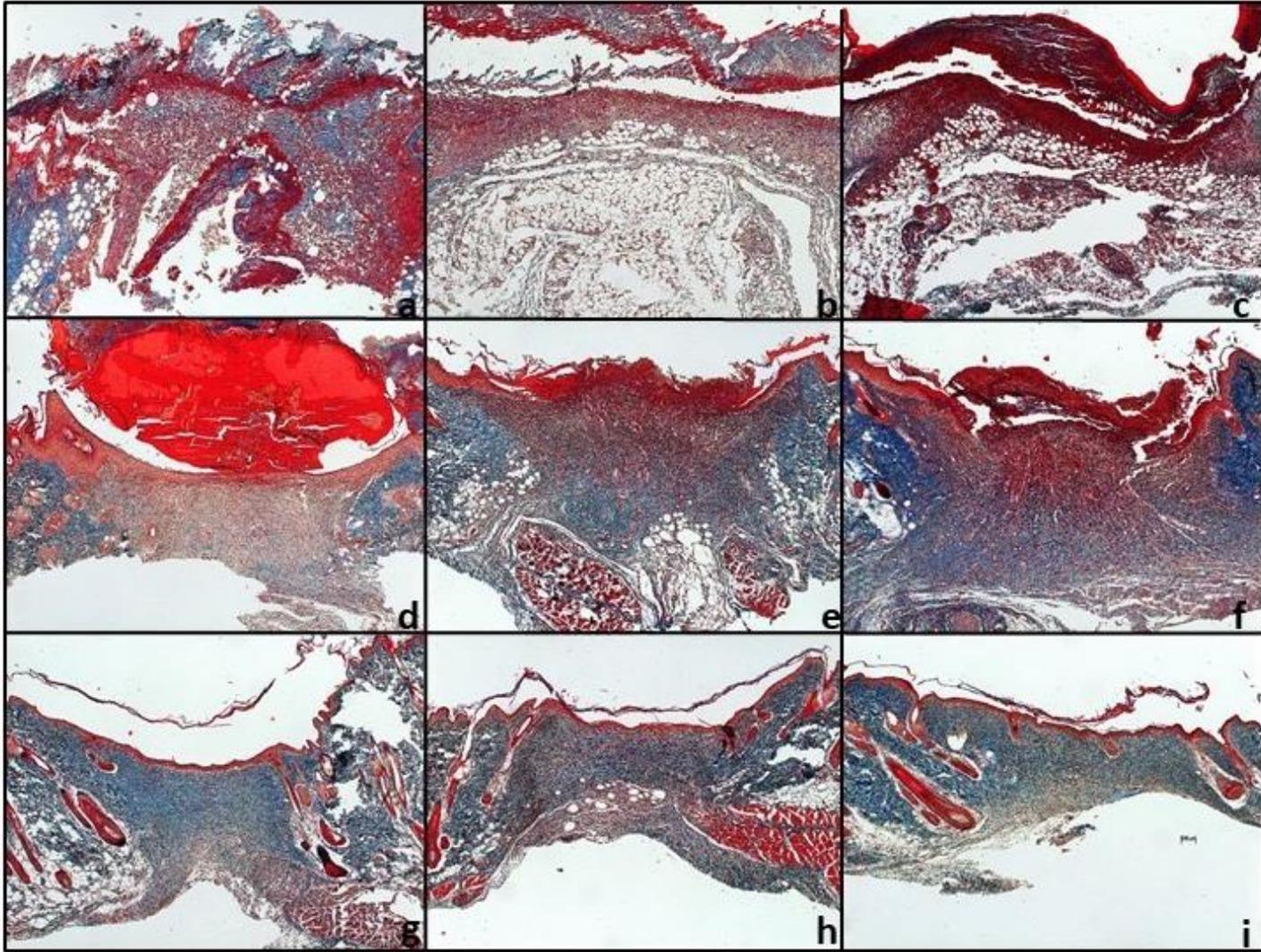


Figura 29. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos (a,d,g) corresponden al grupo control, (b,e,h) grupo vehículo, (c,f,i) Pirfenidona, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

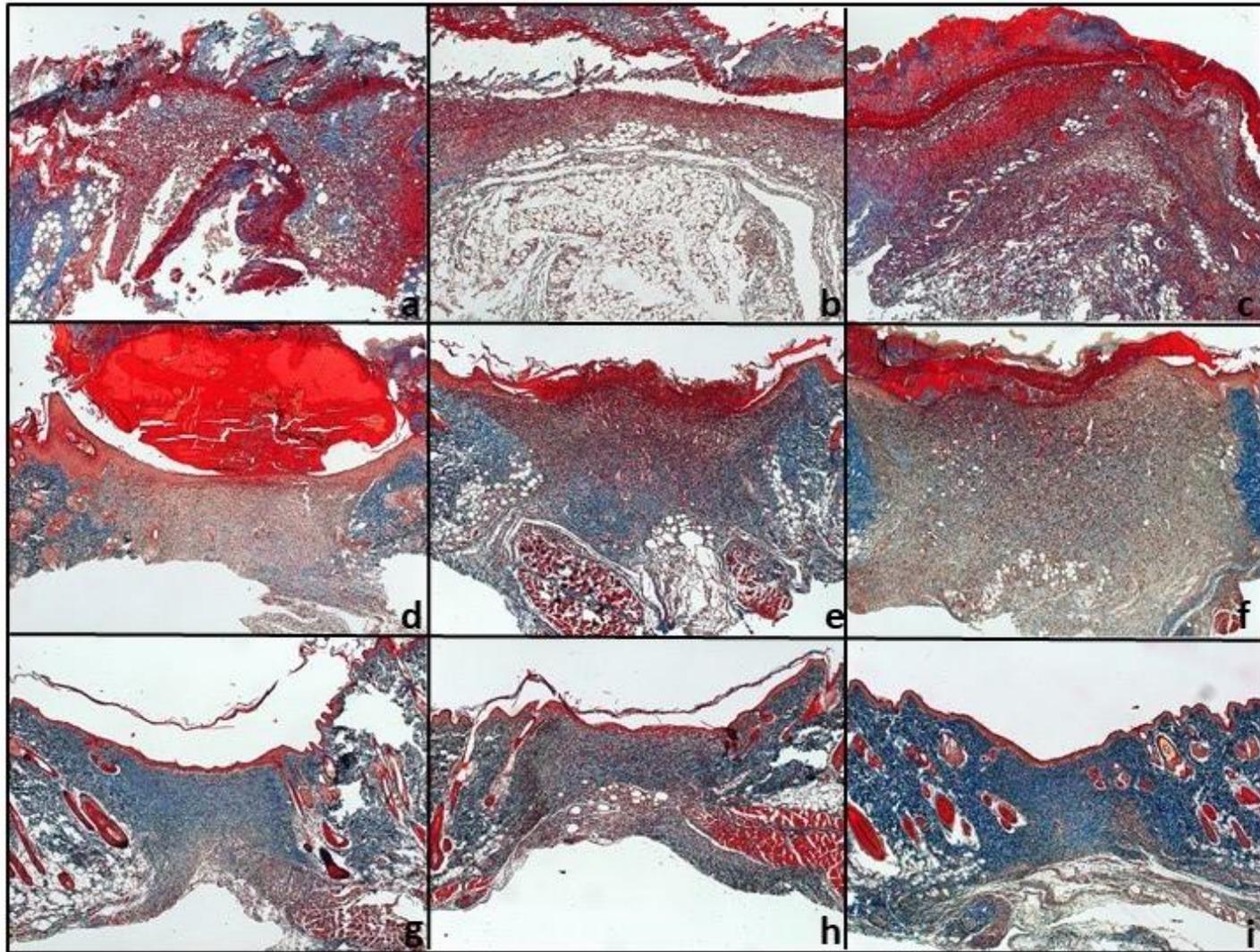
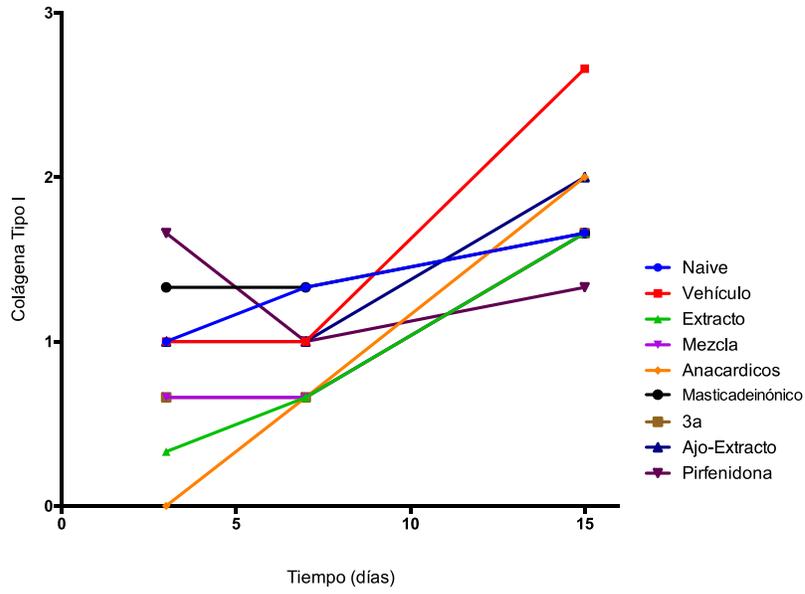
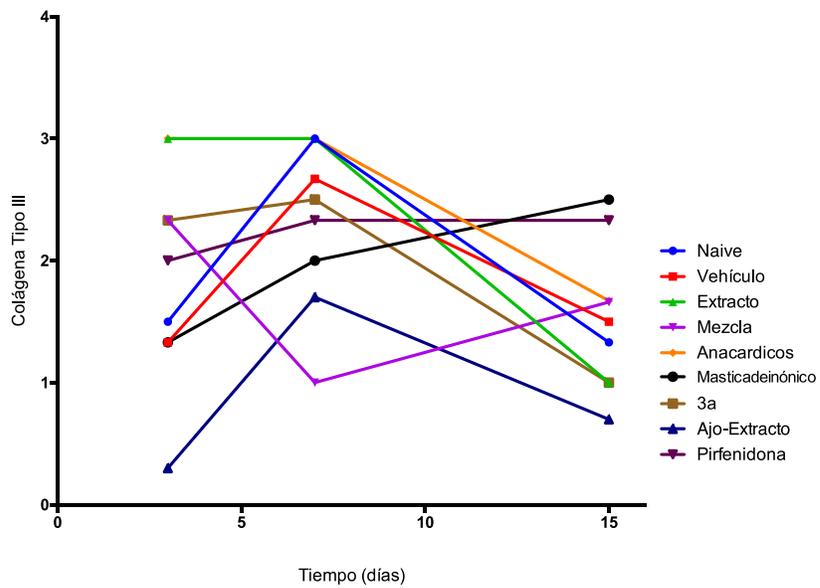


Figura 30. Tinción de Masson. Fotomicrografías de los tejidos (a,d,g) corresponden al grupo control, (b,e,h) grupo vehículo, (c,f,i) aceite ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

Con el objeto de diferenciar el tipo de colágena presente en la zona de la herida durante el tiempo de cicatrización evaluado empleando la tinción de Herovici (Figuras 31-34), se pudo observar que los tejidos tratados con el vehículo incrementaron la proporción de colágena tipo I por encima de todos los demás tratamientos que no presentaron diferencias importantes, con excepción de los tejidos tratados con los ácidos anacárdicos que prácticamente no mostraron ese tipo de colágena a los 3 días, aunque semejaron a los controles hacia los 7 y 15 días posteriores (Gráfica 16). El comportamiento biológico de una lesión presenta de manera inversa la expresión de colágena tipo I y III, siendo más abundante la tipo III en los estadios tempranos y luego disminuye para ser sustituida por la tipo I. Al respecto, la mayoría de los tejidos estudiados mantuvieron ese comportamiento excepto por los derivados de animales tratados con la mezcla que cayó hacia el día 7, mientras que los tejidos de los animales tratados con todas las demás estrategias subían. Por su parte el tratamiento con el extracto de ajo solo difiere del control por su baja proporción de colágena tipo III depositada en la zona de la herida durante todo el tiempo de análisis, mientras que el tratamiento con pirfenidona muestra un patrón totalmente atípico para la expresión de las colágenas tipo I y III (Gráfica 17). Con pirfenidona solo se pudo observar un incremento discreto durante los 15 días de evaluación, donde ambos tipos de colágena presentaron una relación de expresión y proporción directa. En la Tabla 21 se muestran la distribución y proporción de las colágenas I y III en la zona de la lesión en relación con el tratamiento y el tiempo.



Gráfica 16. Gráfica de colágena tipo I de los diferentes tratamientos comparados contra el control durante los 15 días de evaluación.



Gráfica 17. Gráfica de colágena tipo III de los diferentes tratamientos comparados contra el control durante los 15 días de evaluación.

Tabla 21. Evaluación histomorfológica de la distribución y proporción de las colágenas I y III en la zona de la lesión en relación con el tratamiento y el tiempo.

<i>Tratamiento</i>	<i>Día 3</i>		<i>Día 7</i>		<i>Día 15</i>	
	<i>Clg I</i>	<i>Clg III</i>	<i>Clg I</i>	<i>Clg III</i>	<i>Clg I</i>	<i>Clg III</i>
<i>Control</i>	Escasa en la zona de la herida	Escasa en la zona de la herida	Escasa en la zona de la herida	Abundante en la zona de la herida	Moderada en la zona reticular	Moderada en la zona papilar
<i>Vehículo</i>	Escasa en la zona reticular	Moderada en la zona de la herida	Escasa en la zona reticular	Abundante en la zona de la herida	Abundante en la zona de la herida	Escasa en la zona papilar
<i>Extracto hidroalcohólico 70% cuachalalate</i>	Nula en la zona de la herida	Abundante en la zona de la herida	Escasa en la zona reticular	Abundante en la zona de la herida	Escasa en la zona de la herida	Moderada en la zona de la herida
<i>Mezcla de ácidos</i>	Escasa en la zona de la herida	Moderada en la zona de la herida	Escasa en la zona de la herida	Moderada en la zona de la herida	Moderada en la zona reticular	Abundante en la zona de la herida
<i>Ácido 3α-hidroximástica-dienónico</i>	Escasa en la zona de la herida	moderada en la zona de la herida	Escasa en la zona reticular	Moderada en la zona de la herida	moderada en la zona de la herida	Escasa en la zona de la herida
<i>Ácido masticadienónico</i>	Escasa en la zona papilar	Escasa en la zona reticular	Escasa en la zona de la herida	Moderada en la zona de la herida	Moderada en la zona reticular	Moderada en la zona de la herida
<i>Mezcla ácidos anacárdicos</i>	Nula en la zona de la herida	Abundante en la zona de la herida	escasa en zona reticular	Abundante en la zona de la herida	Moderada en la zona reticular	Moderada en la zona de la herida
<i>Pirfenidona 8%</i>	Moderada en toda la zona de la herida	Moderada en toda la zona de la herida	escasa en toda la zona de la herida	Moderada en toda la zona de la herida	Moderada en toda la zona de la herida	Abundante en zona papilar
<i>Aceite de ajo-extracto cuachalalate</i>	Escasa en la zona de la herida	Nula en la zona de la herida	Escasa en la zona de la herida	Moderada en la zona de la herida	Moderada en la zona de la herida	Escasa en la zona papilar

Mezcla de ácidos: ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico y mezcla de ácidos anacárdicos, (proporción 1:1:1); aceite de ajo-extracto cuachalalate: combinación aceite de ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate 0.016%; Clg I: colágena tipo I; Clg III: colágena tipo III.

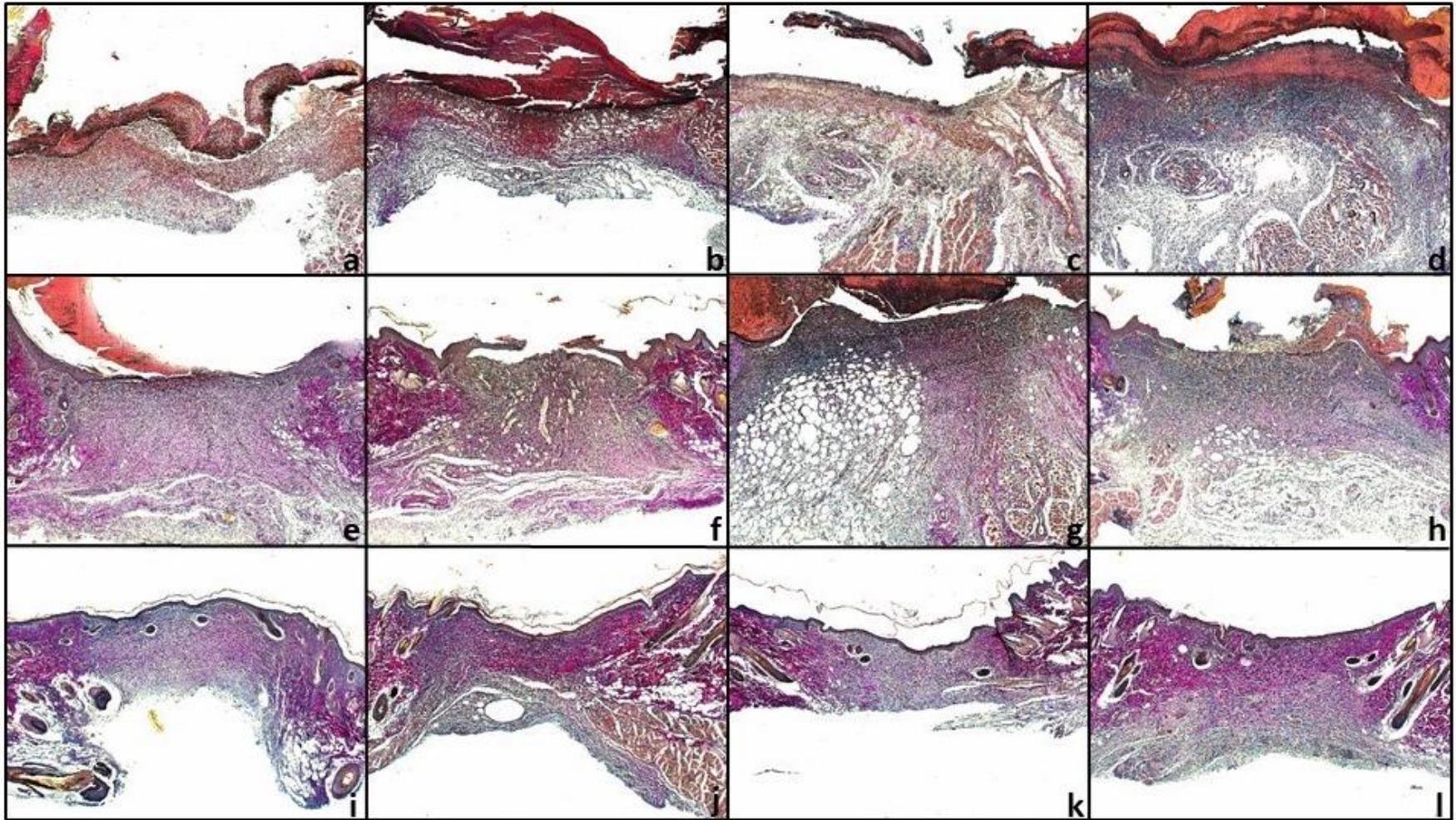


Figura 31. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos (a,e,i) corresponden al grupo control, (b,f,j) grupo vehículo, (c,g,k) mezcla y (d,h,l) extracto de cuachalalate, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

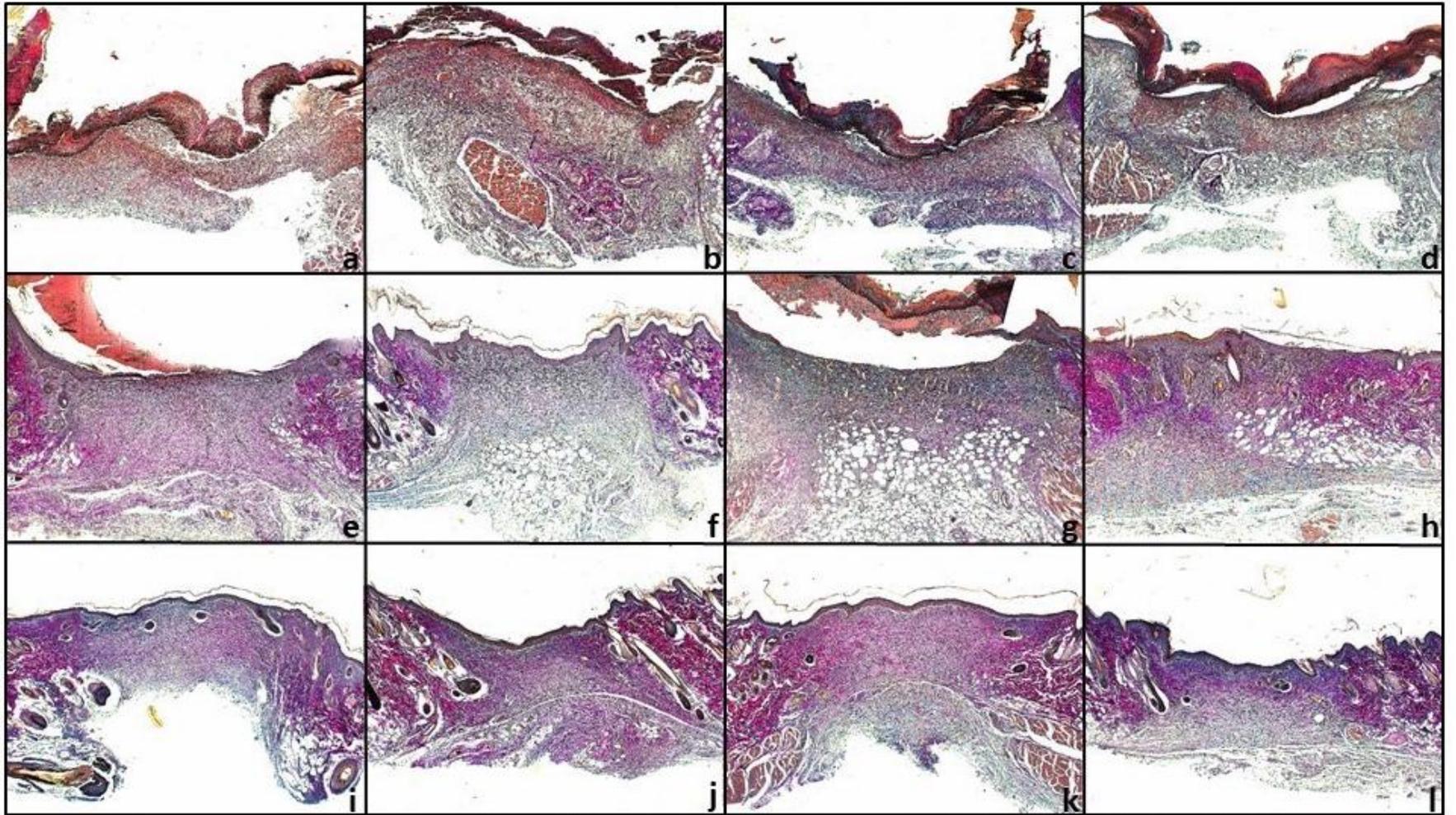


Figura 32. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos (a,e,i) corresponden al grupo control, (b,f,j) ácido masticadienónico, (c,g,k) ácido 3 α -hidroximasticadienónico y (d,h,l) ácidos anacárdicos, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

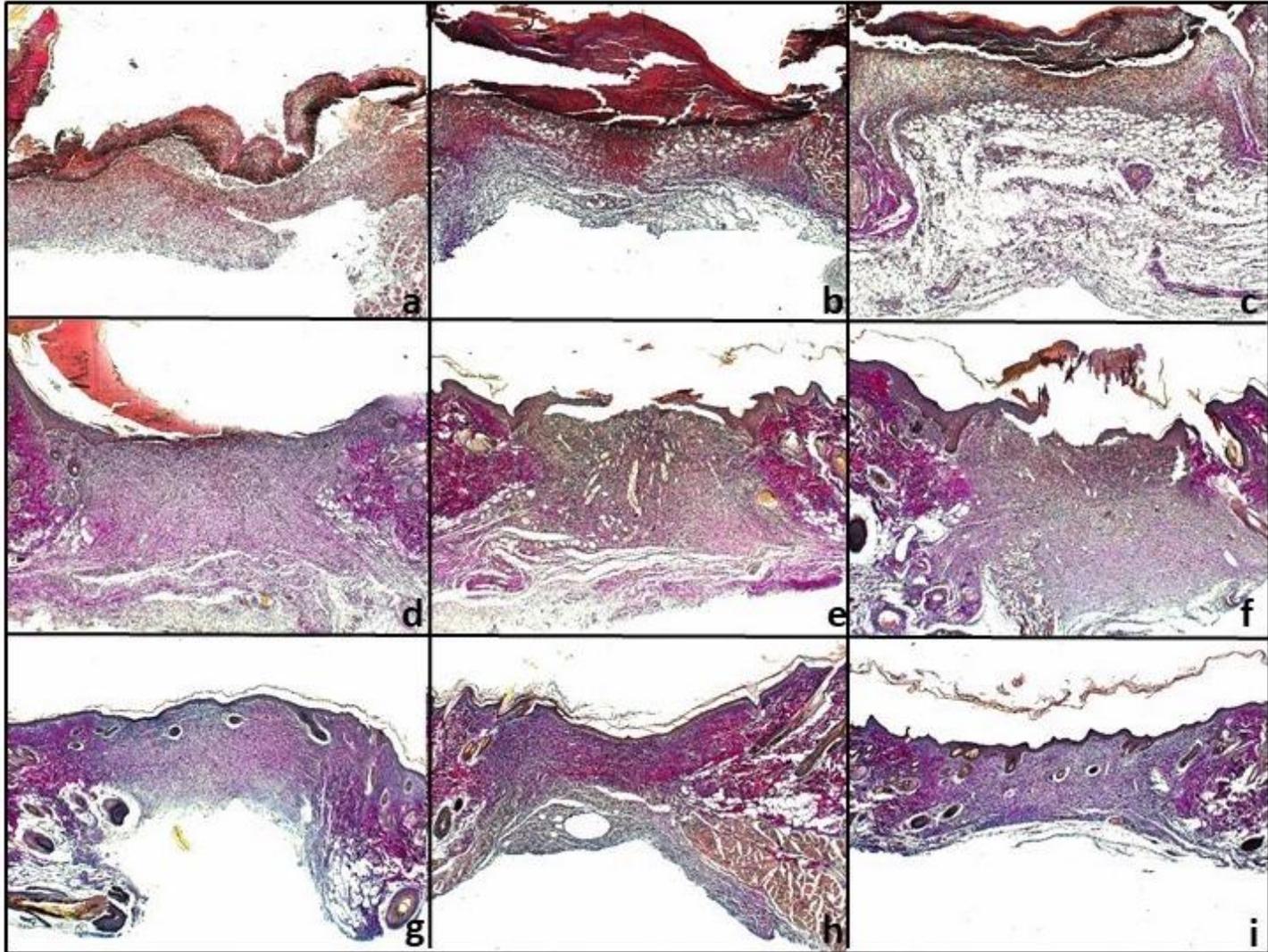


Figura 33. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos (a,d,g) corresponde al grupo control, (b,e,h) grupo vehículo, (c,f,i) pirfenidona, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

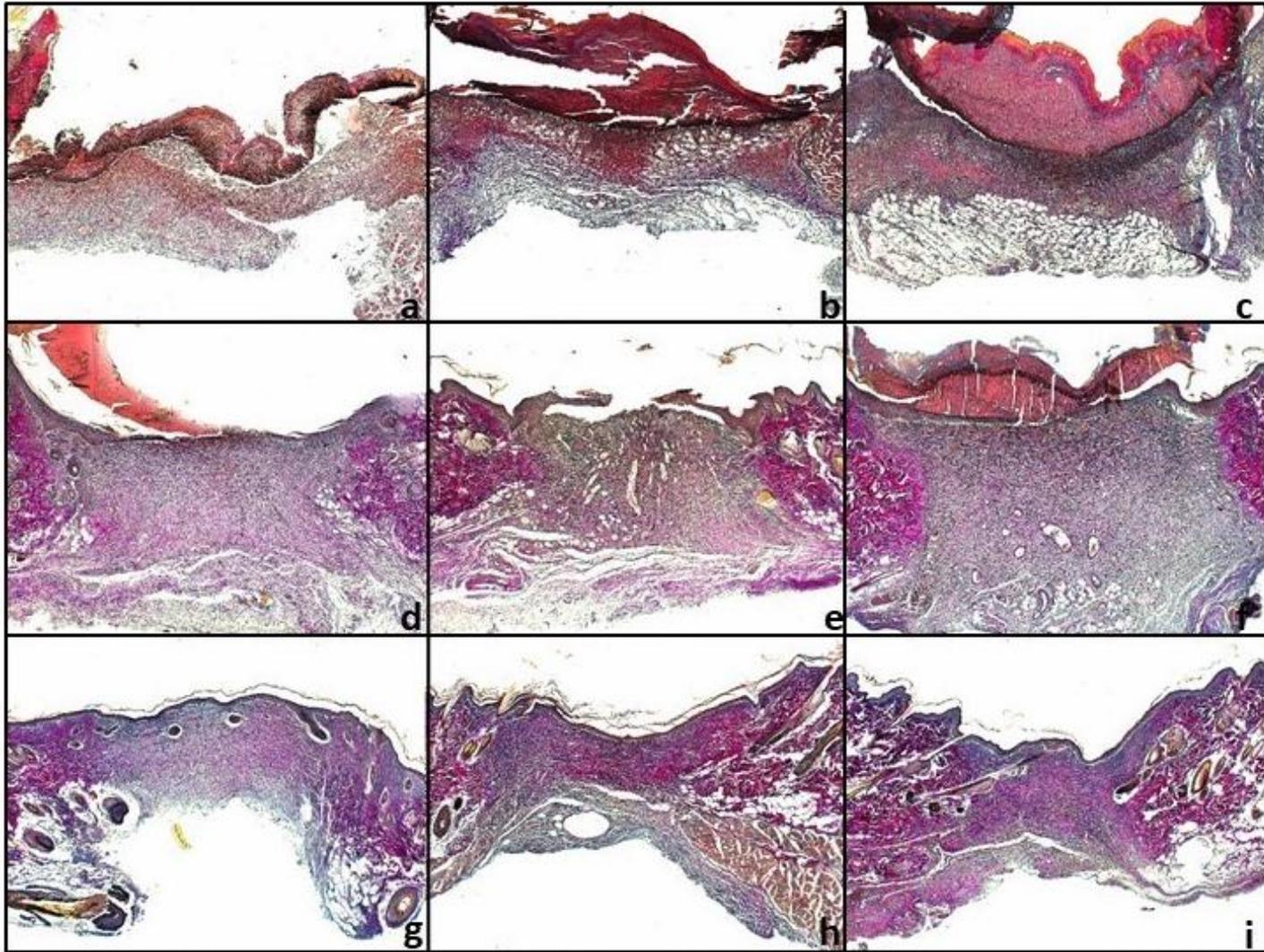
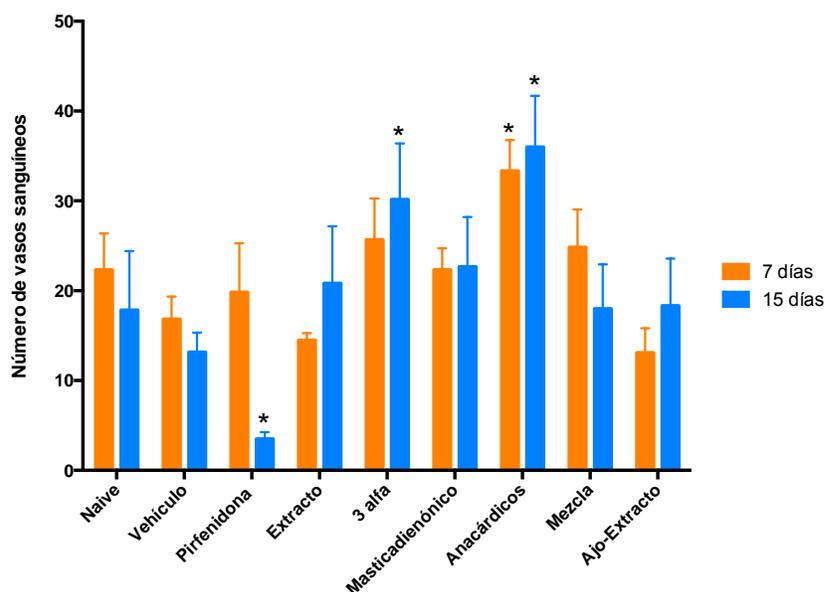


Figura 34. Tinción de Herovici. Fotomicrografías de los tejidos (a,d,g) corresponde al grupo control, (b,e,h) grupo vehículo, (c,f,i) aceite ajo-extracto hidroalcohólico cuachalalate, el panel superior corresponde a los 3 días post-tratamiento, el panel de en medio a los 7 días post-tratamiento y el panel inferior a los 15 días post-tratamiento.

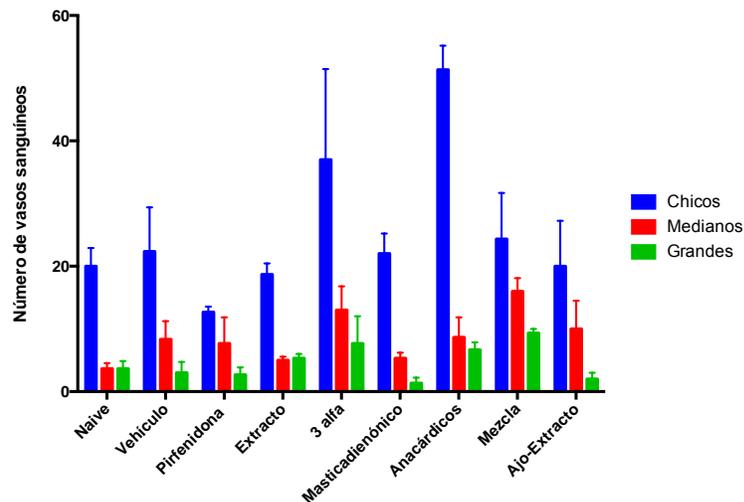
Los hallazgos en este estudio muestran que para el control y vehículo existe una adecuada irrigación sanguínea evidenciada por la presencia de hipervascularización temprana, sin embargo encontramos que a los 7 y 15 días las muestras derivadas de los animales tratados con los ácidos anacárdicos presentaron un incremento de casi el doble de vasos del observado para el control sin disminución al día 15, mientras que en los tratados con pirfenidona para el final de la evaluación los vasos habían disminuido drásticamente (Gráfica 18).



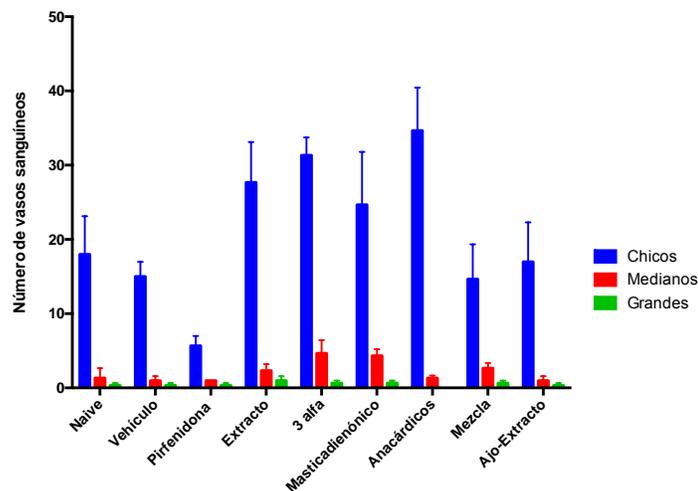
Gráfica 18. Gráfica del contenido de vasos sanguíneos de los diferentes tratamientos a los 7 y 15 días de evaluación. Cada barra representa la media \pm EEM $n=6$ * $p<0.05$, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Dunnett comparando el vehículo contra el tratamiento en el mismo día.

Con el objeto de conocer si la proporción de la vasculatura estaba relacionada con el tamaño de los capilares, se realizó un análisis cuantitativo con respecto a su tamaño y al tiempo 7 y 15 días. La cantidad de vasos sanguíneos clasificados como pequeños, medianos o grandes fue variable en relación con los tratamientos empleados; los ácidos anacárdicos presentaron la mayor proporción de vasos pequeños en comparación con el control y todos los demás tratamientos. En general la proporción de capilares de mayor calibre (medianos y grandes) estuvo incrementada a los 7 días post tratamiento y fueron los que sufrieron la mayor disminución para el día 15 (Gráfica 19). Los tejidos tratados con la mezcla no solo no

limitaron la cantidad de vasos del menor calibre como sucedió con el control, sino que se incrementaron para el día 15. Interesantemente los tejidos de los animales tratados con pirfenidona presentaron la menor proporción de vasos de todos los calibres y para el día 15 solo se apreció una pequeña cantidad de las estructuras pequeñas (Gráfica 20 y 21).



Gráfica 19. Gráfica del contenido de vasos sanguíneos de acuerdo al calibre de los mismos de los diferentes tratamientos a los 7 días de evaluación. Cada barra representa la media \pm EEM $n=6$ * $p<0.05$, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Dunnett comparando el vehículo contra el tratamiento con el mismo calibre de vasos sanguíneos.



Gráfica 20. Gráfica del contenido de vasos sanguíneos de acuerdo al calibre de los mismos de los diferentes tratamientos a los 15 días de evaluación. Cada barra representa la media \pm EEM $n=6$ * $p<0.05$, aplicando ANOVA de dos vías, posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Dunnett comparando el vehículo contra el tratamiento con el mismo calibre de vasos sanguíneos.

Discusión

Los resultados del modelo de herida por escisión de espesor total en rata Wistar, muestran que no existe diferencia significativa en el porcentaje de cierre de la herida de los animales tratados con el vehículo y el grupo control, por lo que las diferencias encontradas se deberán únicamente al efecto de los tratamientos evaluados. El ácido 3 α -hidroximasticadienónico, la mezcla de ácidos anacárdicos, la mezcla de los 3 ácidos en proporción (1:1:1) y la pirfenidona, en las concentraciones anteriormente descritas, exponen un porcentaje de cierre mayor al vehículo, encontrándose diferencias significativas sobre todo en la fase II de la cicatrización (Figura 21 y Gráficas 4, 6 y 7). De la misma manera, se evaluó una combinación de dos productos naturales, extracto hidroalcohólico de cuachalalate y aceite de ajo. Un punto importante a considerar es el prevenir infecciones por microorganismos y de esta manera favorecer la velocidad de cierre de la herida. Debido a las propiedades antisépticas y a los efectos reportados que ejerce el ajo sobre la mejora del colágeno y angiogénesis, se esperaba un efecto sinergista entre ambos tratamientos, incrementando el porcentaje de cierre de la herida. Sin embargo, aunque se observó un aumento en la velocidad de cierre, esta fue menor a lo esperado, ya que hubo muy poca variación respecto al extracto solo (Gráfica 9) y no se encontró diferencia significativa entre éstos tratamientos.

Para el caso de los ácidos anacárdicos existen estudios que muestran su actividad antimicrobiana y antiparasitarias (Himejima et al., 1991; Rivero-Cruz et al., 2005), lo que favorecería la reducción del tiempo de cierre de la herida al evitar la infección e inflamación sustancial, ya que es el factor que más a menudo altera el equilibrio en el proceso de cicatrización. Dentro de los resultados obtenidos, los ácidos anacárdicos presentaron una actividad considerable sobre bacterias Gram positivas (Tabla 17), lo cual es congruente con lo reportado anteriormente, donde se describe que los compuestos aislados de plantas tienen una mayor actividad contra bacterias Gram positivas (López et al., 2015; Rodríguez-García et al., 2015). En ensayos previos (Castillo-Juárez et al., 2013) se ha reportado que los ácidos anacárdicos inhiben la inducción de piocianina, ramnolípidos y elastasa, factores de virulencia de *P. aeruginosa*, que están relacionados directamente con su patogenicidad, aunque

los resultados mostraron una pobre actividad sobre su crecimiento. Es importante destacar que los valores de CMI para el crecimiento de *P. aeruginosa*, tanto para los ácidos anacárdicos como para el aceite de ajo, son similares a los obtenidos para la ampicilina, lo cual sugiere su potencial antimicrobiano. El aceite de ajo tuvo buena actividad sobre el crecimiento de todas las bacterias seleccionadas, gracias a su ya conocido potencial antimicrobiano (Elizabeth, 2001). Las CMIs obtenidas son similares a las descritas previamente (Mohsenipour, 2015), utilizando como modelos a las bacterias *S. aureus*, *B. cereus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Morfológicamente todos los tejidos se caracterizaron por presentar un epitelio discontinuo e inmaduro a los 7 días que incrementó su índice de epitelización para el día 15, igualando al control. Se observó que tanto los ácidos anacárdicos como la mezcla de los 3 ácidos (1:1:1) presentaron un menor grado de infiltrado inflamatorio y un mayor índice de epitelización (Gráficas 13 y 14, Tabla 19, Figuras 23 y 24), lo cual es congruente con los resultados obtenidos respecto al porcentaje de cierre de la herida, ya que éstos tratamientos presentaron diferencia significativa en la fase proliferativa de la cicatrización. El ácido masticadienónico también mostró menor proporción de infiltrado inflamatorio y un buen índice de epitelización durante la evaluación (Figura 24). Por otro lado, tanto el extracto como la pirfenidona fueron las condiciones que estimularon la mayor proporción de infiltrado inflamatorio y menor madurez epitelial (Gráfica 13 y 14, Tabla 19, Figuras 23 y 25). Sin embargo, en otros modelos inflamatorios se ha podido evidenciar que el extracto de cuachalalate reduce el edema en oído y la pata de rata generados por carragenina (Oviedo-Chávez et al., 2004). Otro efecto demostrado para el extracto es su capacidad de disminuir el infiltrado inflamatorio en colitis ulcerativa en ratones (Rodríguez-Canales et al., 2016), lo que hace suponer que de aplicarse en lesiones cutáneas podría estimular la cicatrización por control inflamatorio. Si bien en éste modelo, parece que el extracto de cuachalalate no disminuye el infiltrado inflamatorio, al combinarse con el aceite de ajo se mejora su actividad antiinflamatoria y una mejor estructura de la cicatriz, debido a la presencia de anexos (Tabla 19, Figuras 23 y 26).

Los tejidos derivados de los animales tratados con el ácido 3 α -hidroximasticadienónico presentaron un incremento en la proporción de colágena total a los días 3 y 7 post-lesión, continuando así hasta el final de los 15 días de evaluación donde se evidenció un empaquetamiento de distribución normal, de igual forma que el ácido masticadienónico. Todos los demás tratamientos exhibieron fibras de regulares a delgadas, lo que indica que aún se encontraban en un estado de remodelación temprana (Gráfica 15, Tabla 20 y Figuras 27-30).

El comportamiento biológico de una lesión presenta de manera inversa la expresión de colágena tipo I y III, siendo más abundante la tipo III en los estadios tempranos y luego disminuye para ser sustituida por la tipo I. Con el objeto de diferenciar el tipo de colágena presente en la zona de la herida durante el tiempo de cicatrización evaluado, se realizó la tinción de Herovici, donde se pudo observar que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico presentó una mayor proporción de colágena tipo I al día 15, lo que sugiere una mejor estructura de la cicatriz. Por otro lado, también se pudo evidenciar que la combinación de aceite de ajo-extracto favorece el intercambio de colágena tipo III por tipo I en comparación con el extracto solo (Gráficas 16 y 17, Tabla 21, Figuras 31-34). El intercambio de colágenas en la mezcla de los 3 ácidos cayó hacia el día 7, mientras que los tejidos de los animales con todos los demás tratamientos subían. A pesar que tanto los la mezcla de los 3 ácidos (1:1:1) como los ácidos anacárdicos tuvieron una velocidad de cierre mayor a los otros tratamientos, éstos no presentaron una mejor estructura celular en la cicatriz, en comparación con la combinación de aceite de ajo con extracto de cuachalalate. Es de suma importancia favorecer una correcta arquitectura tisular durante el proceso de cicatrización, ya que de ello depende la funcionalidad de la piel nueva, evitando así daños del medio externo.

Es muy interesante el efecto que ejerció la pirfenidona sobre la expresión de colágenas tipo I y III durante el proceso. El tratamiento con pirfenidona influye de manera importante en el recambio de colágena de una forma completamente atípica para estas dos especies de la proteína (Xiang et al., 2015), y además pareciera que

su mecanismo de acción se relaciona con un efecto antiangiogénico que eventualmente podría relacionarse con la modulación de algunas citocinas proinflamatorias y que comparten efectos angiogénicos (Oku et al., 2002).

La oxigenación, nutrición y regulación endócrina de una herida en remodelación requiere de una apropiada irrigación sanguínea, por lo que regularmente una lesión se hipervasculariza tempranamente para después quedar con los vasos sanguíneos suficientes para mantener la viabilidad del tejido en reparación.

La evaluación de la angiogénesis de los tratamientos se realizó mediante el recuento de vasos sanguíneos en los tejidos y se observó que, los ácidos anacárdicos sobrestimularon la formación de vasos sanguíneos desde el día 7 post tratamiento (Gráfica 18). El ácido 3 α -hidroximasticadienónico presentó propiedades angiogénicas al día 15 de evaluación (Gráfica 18), sin embargo su forma oxidada (ácido masticadienónico) no presentó aumento de la angiogénesis, estudios previos muestran una relación estructura-actividad debida al grupo hidroxilo en el carbono 3 del triterpeno. Estudios previos, demuestran que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico muestra efecto gastroprotector, debido al hidroxilo en el carbono 3, lo cual podría estar relacionado con su actividad cicatrizante y angiogénica (Navarrete et al., 2002; Rivero-Cruz et al., 2005). Además, en el modelo CAM de embrión de pollo, los ácidos anacárdicos y el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, también presentaron un efecto proangiogénico (Tabla 18).

El extracto hidroalcohólico de cuachalalate presentó propiedades antiangiogénicas en el modelo CAM, a pesar de que contiene a los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos, lo que supone que contiene además otros compuestos que antagonizan su efecto angiogénico (Tabla 18). Lo cual es congruente con los resultados obtenidos en el porcentaje de cierre de la herida.

Con el objeto de conocer si la proporción de la vasculatura estaba relacionada con el tamaño de los capilares, se realizó un análisis cuantitativo con respecto a su tamaño y al tiempo (7 y 15 días). La cantidad de vasos sanguíneos clasificados como

pequeños, medianos o grandes fue variable en relación con los tratamientos empleados; los ácidos anacárdicos presentaron la mayor proporción de vasos pequeños en comparación con el control y todos los demás tratamientos al día 7. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual actúan los ácidos anacárdicos, se encuentra relacionado con la angiogénesis en la fase proliferativa. En general la proporción de capilares de mayor calibre (medianos y grandes) estuvo incrementada a los 7 días postratamiento y sufrieron una disminución para el día 15.

De manera interesante los tejidos de los animales tratados con pirfenidona presentaron la menor proporción de vasos de todos los calibres y para el día 15 solo se apreció una pequeña cantidad de los vasos sanguíneos de menor calibre (Gráfica 20), lo cual concuerda con su actividad antiangiogénica previamente reportada (Oku et al., 2002).

Con los resultados obtenidos se puede observar que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico actuó como agente angiogénico, antiinflamatorio y mostró una buena resolución de la cicatriz, al igual que los ácidos anacárdicos, los cuales, además exhibieron propiedades antimicrobianas. Estos mecanismos intervienen en la fase II (proliferativa) de la cicatrización, lo cual se relaciona con que ambos tratamientos presentaron un incremento en el porcentaje de cierre de la herida durante esta fase.

El extracto de cuachalalate no mostró a nivel histomorfológico cambios que demuestren que su aplicación en tejidos cutáneos lesionados se pueda asociar con menor inflamación o mejor arquitectura tisular durante la cicatrización. Sin embargo, en combinación con el aceite de ajo la actividad antiinflamatoria mejora, así como la madurez epidérmica.

Conclusiones

- Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian la actividad antimicrobiana de los ácidos anacárdicos del cuachalalate, además demuestran sus propiedades como coadyuvantes en el proceso de cicatrización mediante el aumento del porcentaje de cierre de la herida, como agente antimicrobiano, angiogénico y antiinflamatorio.
- El extracto de cuachalalate no mostró a nivel histomorfológico cambios que demuestren que su aplicación en tejidos cutáneos lesionados se pueda asociar con menor inflamación o mejor arquitectura tisular durante la cicatrización. Sin embargo, en combinación con el aceite de ajo la actividad antiinflamatoria mejora, así como la madurez epidérmica.
- Los metabolitos del cuachalalate como son el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, la mezcla de ácidos anacárdicos y la mezcla de los 3 ácidos, actúan como agentes proangiogénicos en el modelo CAM de embrión de pollo.
- Mediante el análisis histomorfológico sólo se encontró un efecto angiogénico con el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y la mezcla de ácidos anacárdicos, demostrando que probablemente su mecanismo de acción sea la vascularización (angiogénesis), característica de gran relevancia ya que la actividad de los fibroblastos y de las células epiteliales requiere oxígeno, la angiogénesis es imperativa para la cicatrización.
- Se obtuvo evidencia del efecto antiangiogénico de la pirfenidona en el modelo de herida por escisión y en el modelo CAM. Además de mostrar gran cantidad de infiltrado inflamatorio y una arquitectura tisular inmadura.

Perspectivas

- Evaluar otros extractos del cuachalalate como acetónico y metanólico, así como la infusión, para analizar su potencial cicatrizante.
- Evaluar las diferencias en el tiempo de cicatrización de la herida entre la administración tópica de los compuestos empleando otros vehículos, este estudio se erige como una prueba de concepto, cuyos resultados favorables observables apuntan a garantizar estudios adicionales que diluciden la efectividad de los compuestos sistémicamente en cicatrización de la herida.
- Estudiar los posibles efectos adversos de la administración tópica y sistémica de los compuestos.
- Comparar los compuestos frente a otros apósitos disponibles y analizar si acelera el tiempo de cicatrización.
- Realizar otros estudios en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* para complementar la información disponible.
- Evaluar la presencia de algunos factores de crecimiento y el papel que juegan en el proceso de cicatrización utilizando modelos y extractos de cuachalalate diversos.
- Evaluar la combinación de aceite de ajo-extracto de cuachalalate los primeros días y después únicamente el extracto solo, o disminuir la concentración del ajo en la combinación para observar el efecto que tiene sobre la inflamación.
- Utilizar los metabolitos aislados de cuachalalate, así como la infusión u otros extractos para investigación y desarrollo de nuevos productos basados en estos compuestos, ya sea incorporándolos o realizando modelados y modificaciones sintéticas a estos compuestos de origen natural.
- De igual manera, el extracto podría emplearse como agente anticancerígeno gracias a sus propiedades antiangiogénicas y de esta manera ser una alternativa terapéutica para la población, sus efectos anticancerígenos se encuentran ya reportados (Navarrete et al., 2009).

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo APROBADO Mediante el Comité de ética de la Facultad de Química (CICUAL) 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

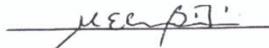
Constatando que realizó las correcciones solicitadas, se emite el dictamen de:

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 embriones de pollo de la especie Bovanswhite de tres días de desarrollo. CEIEPAV.
OFICIO FMVZ001



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

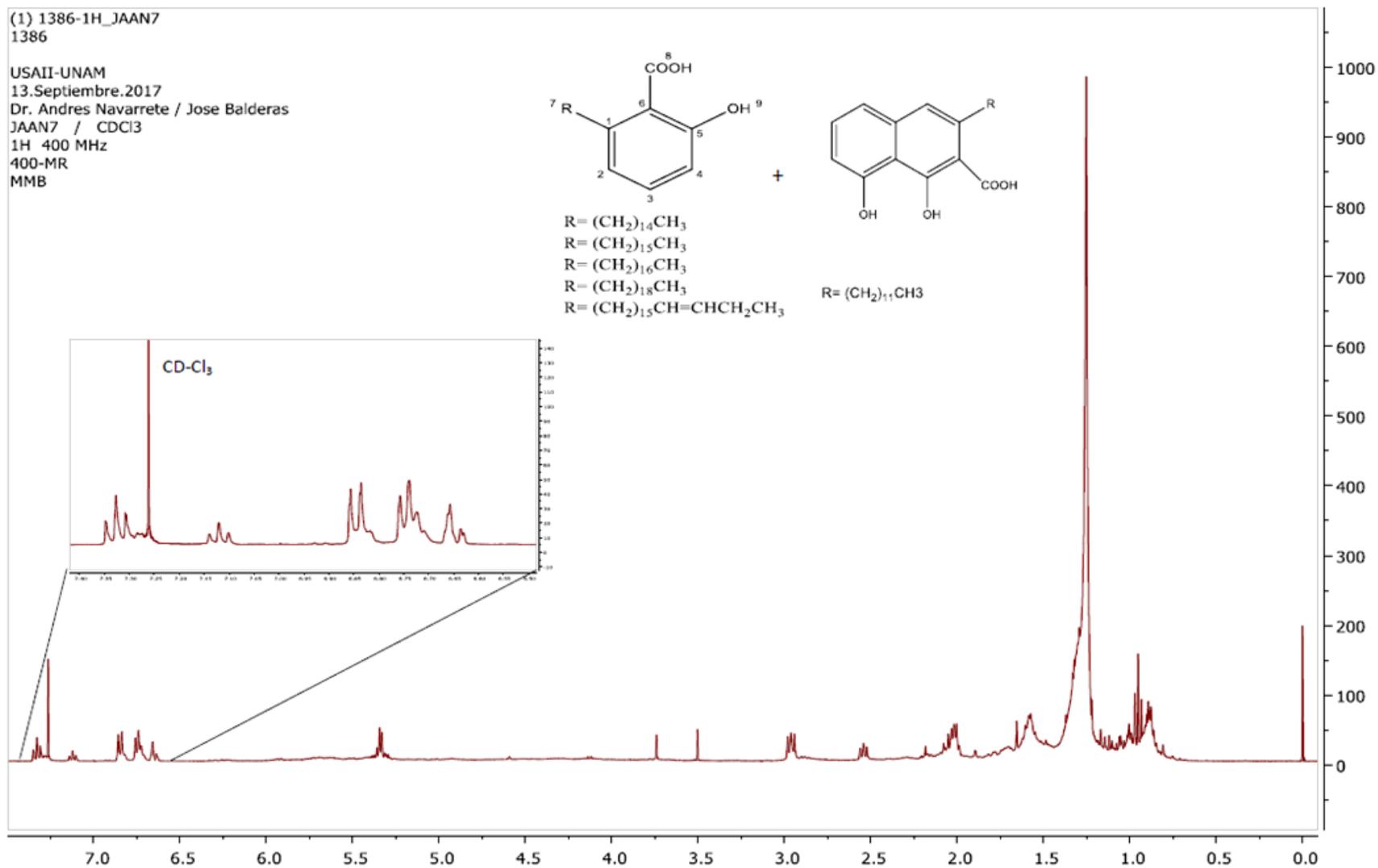
FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA



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

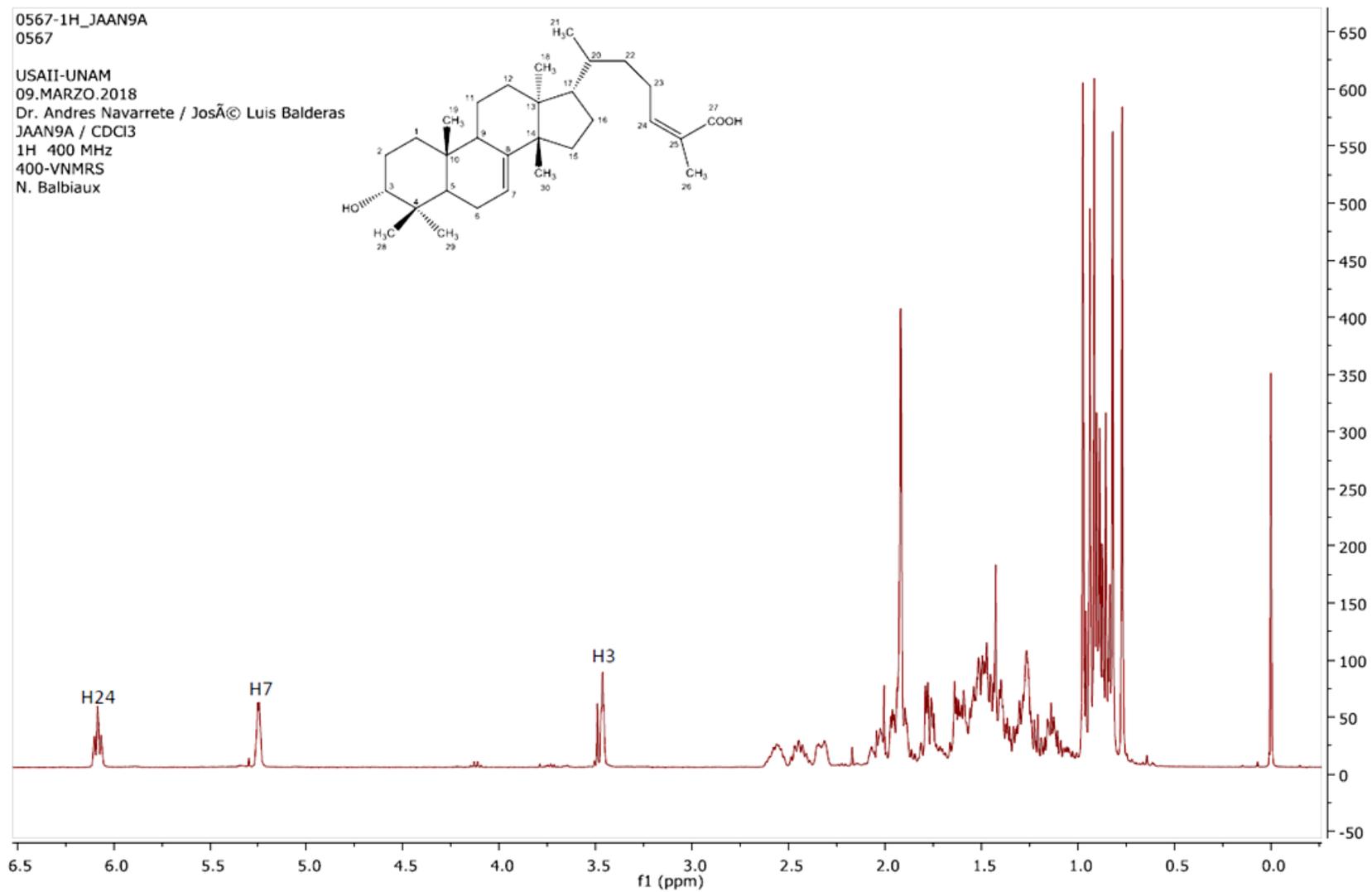
ANEXO 3

Espectro de RMN ^1H para la mezcla de ácidos anacárdicos



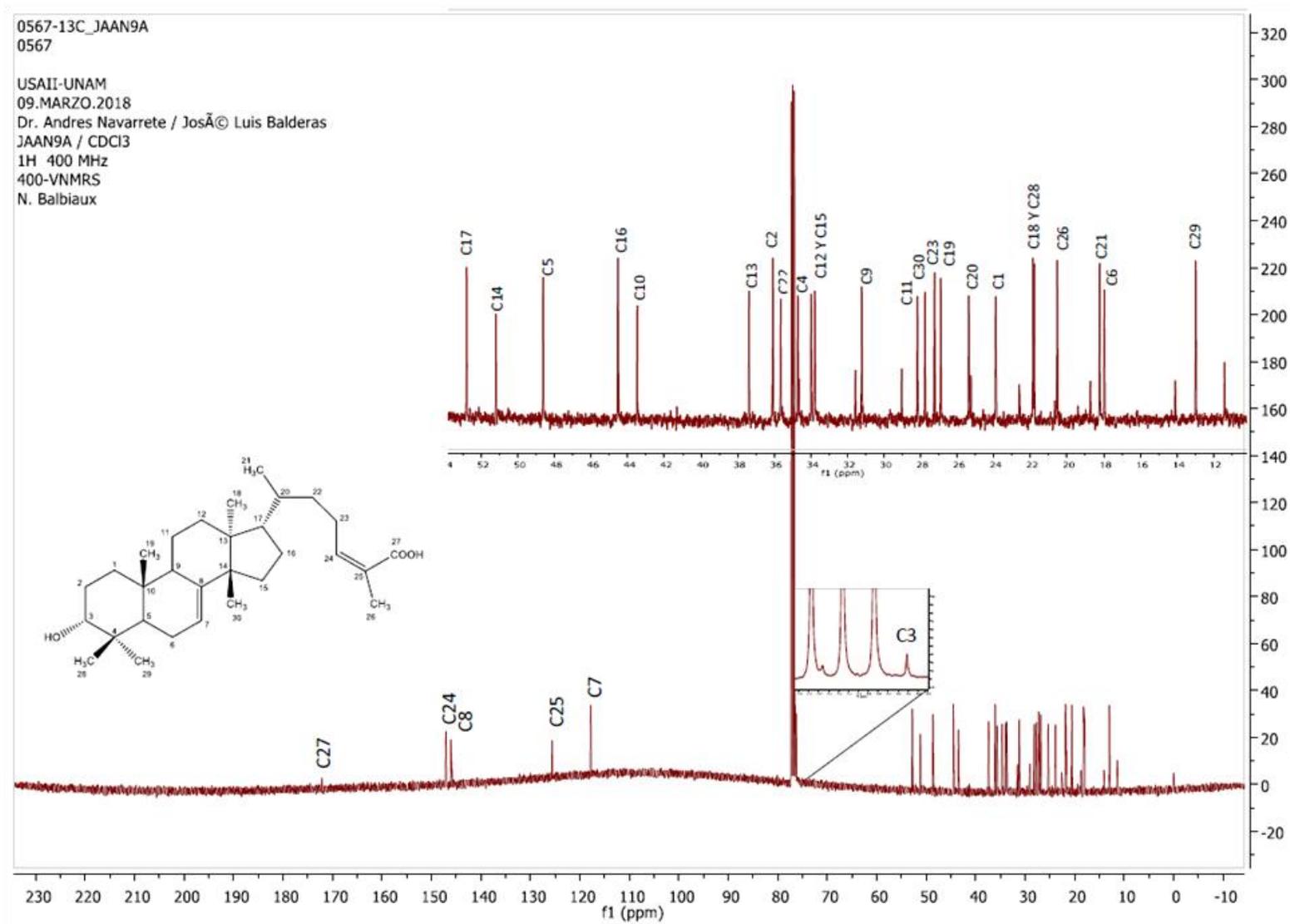
ANEXO 4

Espectro de RMN ^1H del ácido 3 α -hidroximasticadienónico



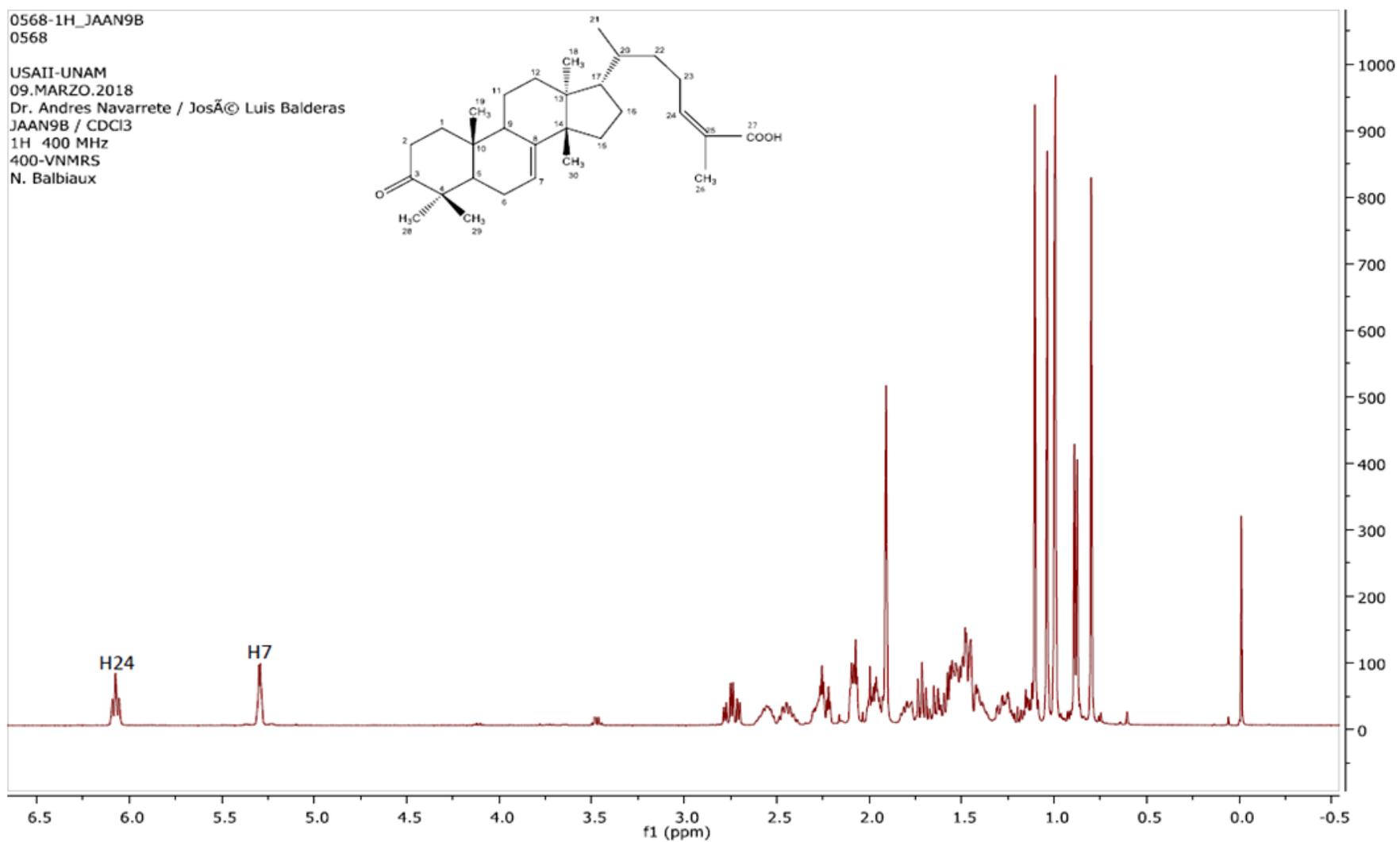
ANEXO 5

Espectro de RMN ^{13}C del ácido 3 α -hidroximasticadienónico



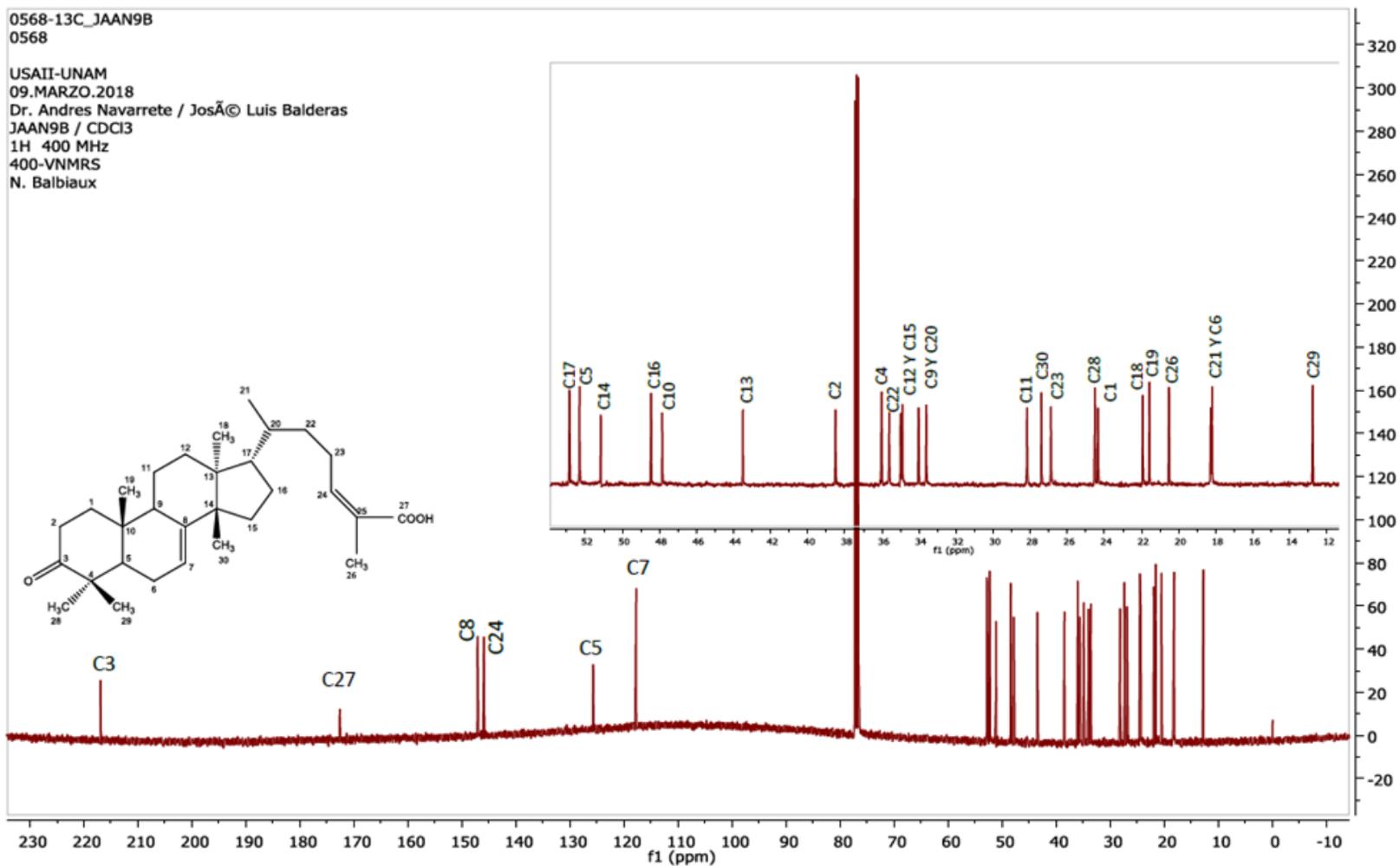
ANEXO 6

Espectro de RMN ^1H del ácido masticadienónico



ANEXO 7

Espectro 5: Espectro de RMN ^{13}C del ácido masticadienónico



REFERENCIAS:

- Abarca-Buis, RF, Munguía, NM, Gonzalez, JM, Solís-Arrieta, L, Osorio, LS, Kröttsch, E. (2014). Silver from polyurethane dressing is delivered by gradient to exudate, tissue, and serum of patients undergoing negative-pressure wound treatment. *Adv Skin Wound Care*. 2014; 27:156–62. doi: 10.1097/01.ASW.0000444849.71374.bc
- Agra, L. C., Ferro, J. N. S., Barbosa, F. T., & Barreto, E. (2015). Triterpenes with healing activity: A systematic review. *Journal of Dermatological Treatment*, 26(5), 465–470. <https://doi.org/10.3109/09546634.2015.1021663>
- Ajo (*Allium sativum*). (n.d.). Retrieved from <http://www.todomografias.com/agronomia/cultivo-del-ajo>
- Akelere, O. (1993). Medicina tradicional. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la salud*, 14, 390-395.
- Seth, Akhil K., Geringer, Matthew R., Hong, Seok J., Leung, Kai P., Mustoe, Thomas A., & Galiano, Robert D. *In vivo* modeling of biofilm-infected wounds: A review *Journal of Surgical Research*, Volume 178, Issue 1, 2012, pp. 330-338
- Alhashim, M., & Lombardo, J. (2018). Mechanism of Action of Topical Garlic on Wound Healing. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]*, 44(5), 630–634. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001382>
- AlMalki WH, Shahid I, Mehdi AY, H. M. (2014). Assessment methods for angiogenesis and current approaches for its quantification. *Indian Journal Pharmacology*, 3(46), 251–256.
- Amado, S. (2001). *Lecciones de Dermatología*. (E. Méndez, Ed.) (14th ed.).
- Avilés-Reyes A., Miller H. James & Abranches J. (2017). The collagen binding proteins of *Streptococcus mutans* and related *Streptococci*. *Mol Oral Microbiol*, 32(2), 89–106. doi:10.1111/omi.12158.
- Ayello E. A. & Cuddigan JE: Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Adv Skin Wound Care* 2004; 17:66
- Barnhill, R. L., & Ryan, T. J. (1983). Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Journal of Investigative Dermatology*, 81(6), 485–488. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12522728>
- Becker, K. (2018). *Pathogenesis of Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00002-4>
- Boyko, T. V., Longaker, M. T., & Yang, G. P. (2017). Laboratory Models for the Study of Normal and Pathologic Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 139(3), 654–662.
- Brandenburg, KS., Calderon, DF., Kierski, PR., Czuprynski, CJ., & McAnulty, JF. (2018) Novel murine model for delayed wound healing using a biological wound dressing with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Pathog*. 122:30-38
- Calixto, J. B. (2000). Efficacy, safety, quality Control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,

- 33(2), 179–189. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000200004>
- Carrico, T. J., Mehrhof, A. I., & Cohen, I. K. (1984). Biology of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 64(4), 721–733. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(16\)43388-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(16)43388-8)
- Castillo-Juárez, I., García-Contreras, R., Velázquez-Guadarrama, N., Soto-Hernández, M., & Martínez-Vázquez, M. (2013). *Amphypterygium adstringens* anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-Controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Medical Research*, 44(7), 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.004>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61(1), 28–40. Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx
- Clinmicrorevs, M., Bowler, P., & Armstrong, D. G. (2016). 2001 . Bowler et al . Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound, 14(April), 244–269. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244>
- Cuachalalate (*Amphypterygium adstringens*). (n.d.). Retrieved from <https://www.plantas-medicinales.org/amphypterygium-adstringens-cuachalalate/>
- 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(08), 21–41. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02802-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02802-4)
- Dolatabadi, S., Moghadam, H. N., & Mahdavi-Ourtakand, M. (2018). Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 118(November 2017), 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.055>
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova L., Urban M., & Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*, 23(3), 394–411. <https://doi.org/10.1039/b515312n>
- Ejaz, S., Chekarova, I., Cho, J. W., Lee, S. Y., Ashraf, S., & Lim, C. W. (2009). Effect of aged garlic extract on wound healing: A new frontier in wound management. *Drug and Chemical Toxicology*, 32(3), 191–203. <https://doi.org/10.1080/01480540902862236>
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Neurology*, 4 JAN(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- Elizabeth, K. M. (2001). Antimicrobial activity of *Allium sativum* on some pathogenic bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 41(4), 321–323.
- Esteva, Estilita Farmacéutica. (2006). El tratamiento de las heridas, Educación sanitaria. 25(8). Retrieved from <http://sobenfee.org.br/site/download/artigos/El-tratamiento-de-las-heridas.pdf>
- Farahpour, M. R., Hesaraki, S., Faraji, D., Zeinalpour, R., & Aghaei, M. (2017). Hydroethanolic *Allium*

- sativum extract accelerates excision wound healing: Evidence for roles of mast-cell infiltration and intracytoplasmic carbohydrate ratio. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(1). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000115079>
- FHEUM. (2008). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* (2a ed.). México.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 4986–4988. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Gottrup, F., Ågren, M. S., & Karlsmark, T. (2000). Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration*, 8(2), 83–96. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2000.00083.x>
- Bojs G., Svnsson A. (1988). Contact allergy to garlic used for wound healing, 179–181.
- Hallel-Halevy, D., Zlotogorski, A., Grunwald, M. H., & Halevy, S. (1997). Multifaceted dermatitis artefacta caused by garlic. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 9(2), 185–187. [https://doi.org/10.1016/S0926-9959\(97\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0926-9959(97)00109-8)
- Hilberg, O., Simonsen, U., du Bois, R., & Bendstrup, E. (2012). Pirfenidone: Significant treatment effects in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical Respiratory Journal*, 6(3), 131–143. <https://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2012.00302.x>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf00002a039>
- Hollands, A., Corriden, R., Gysler, G., Dahesh, S., Olson, J., Raza, Ali S., Kunkel, MT., Lin, AE., Newton, Ac., Kumar, GB., Nair, BG., Perry, JJ., & Nizet, V. (2016). Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. *Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 13964–13973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.695866>
- Howell-Jones, R. S., Wilson, M. J., Hill, K. E., Howard, A. J., Price, P. E., & Thomas, D. W. (2005). A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(2), 143–149. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh513>
- Izadi, K., & Ganchi, P. (2005). Chronic wounds. *Clinics in Plastic Surgery*, 32(2), 209–222. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.11.011>
- Janka-Zires, M., Almeda-Valdes, P., Uribe-Wiechers, A. C., Juárez-Comboni, S. C., López-Gutiérrez, J., Escobar-Jiménez, J. J., & Gómez-Pérez, F. J. (2016). Topical Administration of Pirfenidone Increases Healing of Chronic Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Crossover Study. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/7340641>
- Jesus, J. A., Lago, J. H. G., Laurenti, M. D., Yamamoto, E. S., & Passero, L. F. D. (2015). Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2015/620472>
- Nithya R. John, Viraj C. Gala, & Chhaya S. Sawant, C. S. (2013). Inhibitory effects of plant extracts on

- multi-species dental biofilm formation In-vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), 0–4. <https://doi.org/10.17795/iji.38199.Research>
- Karsten Becker, C. von E. (2011). Manual of Clinical Microbiology. In *Clinical Microbiology* (10th ed., pp. 308–309). <https://doi.org/10.1128/9781555816728>
- Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., & Skalniak, A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(4), 499–515. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>
- Kuete, V. (2017). Medicinal Spices and Vegetables from Africa. In *Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* (pp. 363–377).
- Kyung, K. H. (2012). Antimicrobial properties of allium species. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.004>
- Leonard, A. K., Loughran, E. A., Klymenko, Y., Liu, Y., Kim, O., Asem, M., McAbee, K., & Stack, M. S. (2018). *Methods for the visualization and analysis of extracellular matrix protein structure and degradation. Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 143). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.08.005>
- Lillie, R. D., Tracy, R. E., Pizzolato, P., Donaldson, P. T., & Reynolds, C. (1980). Differential staining of collagen types in paraffin sections: A color change in degraded forms. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology*, 386(2), 153–159. <https://doi.org/10.1007/BF00427227>
- 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. <https://doi.org/10.1089/jop.2017.0007>
- López, Z., Villarruel-muñoz, J., Rico, J., & Terrazas, T. (2015). Journal of Chemical , Biological and Physical Sciences Cytotoxic effects and antimicrobial activity of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) extracts as used in a traditional way, 5(2), 1555–1565.
- Manzanares, W., Langlois, P. L., & Heyland, D. K. (2015). Pharmaconutrition with selenium in critically ill patients: What do we know? *Nutrition in Clinical Practice*, 30(1), 34–43. <https://doi.org/10.1177/0884533614561794>
- Marks, J. G., Miller, J. J., Marks, J. G., & Miller, J. J. (2019). 2 – Structure and Function of the Skin. *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology*, 2–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43040-1.00002-6>
- Martínez-Ezquerro, J.D., Herrera, L.A. (2006). Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Revista de cancerología*, 1: 83-96
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., & Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2–3), 147–154. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90032-9)
- Mecott-Rivera, G. Á., Aguilar-Baqueiro, J. A., Bracho, S., Miranda-Maldonado, I., Franco-Márquez, R., Castro-Govea, Y., Dorsey-Trevino E., & García-Pérez, M. M. (2018). Pirfenidone increases the epithelialization rate of skin graft donor sites. *Burns*, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.07.007>

- Mohsenipour, Z. (2015). The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(8). <https://doi.org/10.5812/jjm.18971v2>
- Mohd W. Azam, & Asad U. Khan. (2018). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- Morales Martínez , E. (2011). Estudios de absorción in vitro de los ácidos 3\03B1-hidroxicasticadienónico y casticadienónico aislados de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). México.
- Navarrete, A. (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.
- Navarrete, A., & Mata, R. (2009). *Plantas medicinales de México*. (S. giratorio EDICIONES, Ed.). México.
- Navarrete, A., Sánchez-Mendoza, M. E., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L., Oliva, I., & Castañeda-Hernández, G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(12), 1629–1636. <https://doi.org/10.1211/jpp.57.12.0013>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00414-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00414-7)
- Neri, T., Lombardi, S., Faïta, F., Petrini, S., Balia, C., Scalise, V., Pedrinelli R., Paggiaro P. & Celi, A. (2016). Pirfenidone inhibits p38-mediated generation of procoagulant microparticles by human alveolar epithelial cells. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 39, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.05.003>
- Neuman, R. E., & Logan, M. A. (1950). THE DETERMINATION OF COLLAGEN AND ELASTIN IN TISSUES. *J. Biol. Chem.*, 186, 549–556. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/186/2/549.citation>
- Ojeda-garc, J. C., Oviedo-garc, E., & Andr, L. (2013). Streptococcus mutans and dental caries Streptococcus mutans y caries dental Revisiones Te m a Revisiones Te m a. *Revista CES Odontología*, 26(1), 44–56. <https://doi.org/10.21615/2684>
- Oku, H., Nakazato, H., Horikawa, T., Tsuruta, Y., & Suzuki, R. (2002). Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha, enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock. *European Journal of Pharmacology*, 446(1–3), 167–176. <https://doi.org/12098599>
- Olivera Ortega, A. G., Soto Hernández, M., Martínez Vázquez, M., Terrazas Salgado, T., & Solares Arenas, F. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), 109–113. <https://doi.org/10.1016/S0378->

8741(99)00047-1

- Oosthuizen, C. B., Reid, A.-M., & Lall, N. (2018). Garlic (*Allium sativum*) and Its Associated Molecules, as Medicine. Medicinal Plants for Holistic Health and Well-Being. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812475-8.00009-3>
- Ortega-Peña, S., Hidalgo-González, C., Robson MC. & Krötzsch, E. (2016) In vitro microbicidal, anti-biofilm and cytotoxic effects of different commercial antiseptics. *International Wound Journal*; 14: 470–9.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., & Martínez-Vázquez, M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 11(5), 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.05.003>
- Pazyar, N., Yaghoobi, R., Rafiee, E., Mehrabian, A., & Feily, A. (2014). Skin wound healing and phytomedicine: A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(6), 303–310. <https://doi.org/10.1159/000357477>
- Poolman, J. T. (2016). *Escherichia coli*. *International Encyclopedia of Public Health* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00504-X>
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 17(12): 1063-1072.
- Ramírez-Hernández, G. A. (2010). Fisiología de la cicatrización cutánea. *Revista Facultad de Salud*, 2(2), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(08\)70356-X](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(08)70356-X)
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Reller, L. Barth., Weinstein, Melvin., Jorgensen, James H., & Ferraro, Mary Jane. (2009) Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 11, 1 December 2009, Pages 1749–1755, <https://doi.org/10.1086/647952>
- Ribatti, D. (2008). Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis. *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 270). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01405-6](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01405-6)
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., & Resta, M. (2006). The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nature Protocols*, 1(1), 85–91.
- Ribeiro, M. P., Espiga, A., Silva, D., Baptista, P., Henriques, J., Ferreira, C., Silva, JC., Borges, JP., Pires, E., Chavez, P., & Correia, I. J. (2009). Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair and Regeneration*, 17(6), 817–824. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00538.x>
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J. A., Martínez, S., Pereda-Miranda, R., Mata, R., ... Timmermann, B. N. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(9), 1117–1126. <https://doi.org/10.1211/jpp.57.9.0007>

- Rivero-Cruz, J., Rosas-Piñon, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M., & Sánchez-Nieto, S. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane. *Journal of Ethnopharmacology*, 127-149.
- Robyt, J., & White, B. (1987). *Biochemical Techniques. Theory and practice*. USA: Brooks Cole Publishing Company.
- Rodriguez-Canales, M., Jimenez-Rivas, R., Canales-Martinez, M. M., Garcia-Lopez, A. J., Rivera-Yañez, N., Nieto-Yañez, O., Ledesma-Soto, Y., Sanchez-Torres, LE., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, LI., & Rodriguez-Monroy, M. A. (2016). Protective effect of amphipterygium adstringens extract on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8543561>
- Rodriguez-Garcia, A., Peixoto, I. T. A., Verde-Star, M. J., De La Torre-Zavala, S., Aviles-Arnaut, H., & Ruiz, A. L. T. G. (2015). In Vitro Antimicrobial and Antiproliferative Activity of Amphipterygium adstringens. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 100–110. <https://doi.org/10.1155/2015/175497>
- Ruiz-Bustos, E., Velázquez, C., Garibay-Escobar, A., García, Z., Plascencia-Jatomea, M., Cortez-Rocha, M. O., Hernandez-Martínez, J., & Robles-Zepeda, R. E. (2009). Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *Journal of Medicinal Food*, 12(6), 1398–1402. <https://doi.org/10.1089=jmf.2008.0205>
- Salgado, R. M., Bravo, L., García, M., Melchor, J. M., & Krötzsch, E. (2014). Histomorphometric analysis of early epithelialization and dermal changes in mid-partial-thickness burn wounds in humans treated with porcine small intestinal submucosa and silver-containing hydrofiber. *Journal of Burn Care and Research*, 35(5), e330–e337. <https://doi.org/10.1097/BCR.000000000000015>
- Santhosha, S. G., Jamuna, P., & Prabhavathi, S. N. (2013). Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Bioscience*, 3, 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.07.001>
- Santos, C. (2011). *Contribución al establecimiento de un modelo de estudio de imprinting y reprogramación basado en el cultivo de células haploides y transferencia nuclear en pez cebra*. Resumen.
- Senet, P. (2008). Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología*, 42(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(08\)70356-X](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(08)70356-X)
- Soriano García, M. R. A. T. B. O. A. N. R. S. H. B. F. Y. (1987). 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.
- Summerfield, A., Meurens, F., & Ricklin, M. E. (2015). The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*, 66(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.10.023>
- Taniguchi, H., Ebina, M., Kondoh, Y., Ogura, T., Azuma, A., Suga, M., Taguchi, H., Takahashi, K., Nakata, A., Sato, A., Takeuchi, M., Raghu, G., Kudoh, S., & Nukiwa, T. (2010). Pirfenidone in

- idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 35(4), 821–829. <https://doi.org/10.1183/09031936.00005209>
- UNAM. (2009). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Retrieved from <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Amphipterygium adstringens&id=7945>
- Valencia, C. (2010). CICATRIZACIÓN: PROCESO DE REPARACIÓN TISULAR. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS. *INVESTACIONES ANDINA*, 12, 85–98.
- Vargas-Vargas, R. A., & Vargas-Vargas, R. A. (2017). Anestesia en México. *Anestesia En México*, 29(1), 86–96. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-87712017000400086&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Velnar T, Bailey T, & Smrkolj V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*, 37(5), 1528–1542.
- Visner, G. A., Liu, F., Bizargity, P., Liu, H., Liu, K., Yang, J., Wang L. & Hancock, W. W. (2009). Pirfenidone inhibits T-cell activation, proliferation, cytokine and chemokine production, and host alloresponses. *Transplantation*, 88(3), 330–338. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181ae3392>
- Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C., & Chen, Y. J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Woesser, J. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 440–447.
- Xiang, X. H., Jiang, T. P., Zhang, S., Song, J., Li, X., Yang, J. Y., & Zhou, S. (2015). Pirfenidone inhibits proliferation, arrests the cell cycle, and downregulates heat shock protein-47 and collagen type i in rat hepatic stellate cells in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 309–314. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3403>
- Yun, H. M., Ban, J. O., Park, K. R., Lee, C. K., Jeong, H. S., Han, S. B., & Hong, J. T. (2014). Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacology and Therapeutics*, 142(2), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.005>
- Zeng, R., Lin, C., Lin, Z., Chen, H., Lu, W., Lin, C., & Li, H. (2018). Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions. *Cell and Tissue Research*, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2830-1>
- Zielins, E. R., Brett, E. A., Luan, A., Hu, M. S., Walmsley, G. G., Paik, K., & Longaker, M. T. (2015). Emerging drugs for the treatment of wound healing. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 20(2), 235–246. <https://doi.org/10.1517/14728214.2015.1018176>