



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE UN PROPÓLEO DE *Apis mellifera* L. DE MICHOCÁN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

BRENDA GARCÍA ZAPATA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México,
2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

A mi director de tesis, **Dra. Ana Bertha Hernández Hernández** por la dedicación que aportó para lograr este trabajo y que además de brindarme su tiempo y enseñanzas, me brindó su amistad.

A los miembros del jurado:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Dr. César Mateo Flores Ortiz.

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla.

Por su colaboración y valiosos consejos en la realización de esta investigación.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos, perteneciente a la División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM y financiado por el proyecto **PAPIIT-UNAM IN212317**.

DEDICATORIAS

A mis padres, quienes siempre me han brindado su apoyo y amor incondicional, les agradezco infinitamente sus enseñanzas y todos los esfuerzos que han hecho para llegar hasta aquí, son mi ejemplo de perseverancia y constancia y mi más grande inspiración, estoy orgullosa de ustedes y de la persona que formaron en mí y en mi hermano. Este logro también es suyo. ¡Los amo y admiro!

A mi hermano, George, porque sin duda es la mejor compañía que puedo tener. Siempre tendrás mi apoyo, lucha por tus sueños. Te deseo una vida llena de éxitos.

A mi abuelo, le agradezco el haberme dejado recuerdos tan bonitos, sus historias y enseñanzas. Sé que usted estaría muy orgulloso de mí en estos momentos.

Siempre te llevo en mi corazón.

A Gabriel, a quien desde que lo conocí me brindo su amistad y momentos muy buenos. Gracias por apoyarme en cumplir mis sueños, por impulsarme a lograr mis metas y por estar siempre presente. Tu amor me ha dado la fuerza para continuar y confiar en mí. ¡Te amo!

A mi gran familia, tíos, tías, primos y primas porque también han estado presentes a lo largo de este camino, y he recibido incondicionalmente su apoyo, consejos y su cariño. Gracias por formar parte de este logro.

A mi tía Chela y mi prima Arlett les agradezco la confianza que me dieron, sus atenciones y cuidados. Sin ustedes este camino hubiese sido más difícil.

A mis amigas que conocí en esta facultad, Aremi, Katia, Mariana y Karlita siempre recibí su apoyo y aliento para continuar, gracias por todos los buenos momentos, conocerlas fue de las cosas más bonitas que viví en esta etapa. Las quiero mucho.

A la Dra. Margarita le agradezco por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por la confianza, la paciencia y por compartir sus conocimientos haciendo de nosotros mejores alumnos y personas.

Al Dr. Marco, le agradezco por recibirme en su laboratorio y siempre brindarme las herramientas y los mejores consejos para la realización de este trabajo.

A Ana, gracias por dirigir este trabajo y por dar más de lo que te correspondía, brindándome tu divertida amistad. Te quiero, amiga.

Al equipo del Laboratorio de Farmacognosia, Karla, Hatziri, Uriel y Tavo les dedico este trabajo, porque desde que llegué me dieron la confianza para integrarme con ustedes y siempre recibí su apoyo para la realización de diversos ensayos. Son unas personitas muy lindas e inteligentes.

A mis compañeros del laboratorio Mari, Lucero, Yatsiri, Lalo y Juan Pi que al igual que yo, están culminando este camino, les deseo lo mejor amigos. Agradezco el haberlos conocido, su compañía es realmente genial. Éxito a todos.

Al equipo del Laboratorio de Inmunobiología, por recibirme y hacerme sentir parte de ustedes desde el primer momento. Gracias a Almita, Pili, Mario, Judith y Gus por todo el apoyo que me brindaron para sacar adelante este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Obtención del propóleo	11
Caracterización química del propóleo de Michoacán	11
Determinación de fenoles totales.....	12
Determinación de flavonoides totales por el método de Dowd.....	12
Análisis del propóleo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).	13
Análisis del propóleo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	13
Análisis del propóleo por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC- MS)	13
Evaluación de la capacidad antioxidante.	14
Fuerza de cierre	15
Organismos.....	15
Método tensiométrico de Vaisberg, 1989.	15
Evaluación de la eficacia cicatrizante a nivel histológico	16
Conteo de fibroblastos	17

RESULTADOS	18
Caracterización química del propóleo de Michoacán	18
Cuantificación de fenoles y flavonoides	18
Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).....	19
Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	20
Análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC- MS).....	22
Evaluación de la capacidad antioxidante	25
Fuerza de cierre	26
DISCUSIÓN	34
APÉNDICES	44
APÉNDICE 1. La piel.....	44
APÉNDICE 2. El propóleo.	48
APÉNDICE 3. Método Tensiométrico.....	50
APÉNDICE 4. Técnica histológica.....	51
APÉNDICE 5. Tinción con Hematoxilina – Eosina	54
APÉNDICE 6. Fibroblastos	56
LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Compuestos fenólicos identificados mediante HPLC-DAD en el extracto metanólico del propóleo de Michoacán.....	19
Figura 2. Compuestos fenólicos identificados mediante HPLC-DAD en el extracto clorofórmico del propóleo de Michoacán.	20
Figura 3. Cromatograma del análisis CG-EM del extracto hexánico del propóleo de Michoacán.	21
Figura 4. Cromatograma mediante HPLC-MS del extracto metanólico del propóleo de Michoacán.	22
Figura 5. Cromatograma mediante HPLC-MS del extracto clorofórmico del propóleo de Michoacán.....	23
Figura 6. Cromatograma mediante HPLC-MS del extracto hexánico del propóleo de Michoacán.	24
Figura 7. Fotografías de los ratones para la evaluación de la eficacia cicatrizante al día 1, 5 y 10 de los distintos grupos experimentales.....	27
Figura 8. Eficacia de cicatrización de los extractos de propóleo de Michoacán por el método tensiométrico.....	28
Figura 9. Microfotografías del área lesionada. Aumento x100.....	29.
Figura 10. Microfotografías del área lesionada. Aumento x400..	30
Figura 11. Longitud de la herida de los cortes histológicos.....	31
Figura 12. Grosor de la epidermis de los cortes histológicos..	32
Figura 13. Grosor de la epidermis a la hipodermis.	33
Figura 14. Promedio del número de fibroblastos de cada grupo experimental.....	34
Figura 15. Organización morfológica de la piel.	48
Figura 16. Fibroblastos activos.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de fenoles y flavonoides de los extractos del propóleo de Michoacán	19
Cuadro 2. Compuestos identificados en el extracto hexánico del propóleo de Michoacán por CG-EM.....	20
Cuadro 3. Compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico del propóleo de Michoacán detectados por HPLC-MS.	22
Cuadro 4. Compuestos fenólicos presentes en el extracto clorofórmico del propóleo de Michoacán detectados por HPLC-MS.....	23
Cuadro 5. Compuestos fenólicos identificados en el extracto hexánico del propóleo de Michoacán por HPLC-MS.....	23
Cuadro 6. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados mediante HPLC-DAD y HPLC-MS.....	24
Cuadro 7. CA ₅₀ de los extractos del propóleo de Michoacán.....	26

RESUMEN

La cicatrización es un proceso complejo que se ocupa de recuperar la integridad del tejido cuando hay alguna lesión o una herida; este proceso se lleva a cabo mediante 3 fases que son inflamatoria, proliferativa y de remodelación, las cuales en algún momento ocurren de manera simultánea, sin embargo, en cada una de ellas participan distintos elementos celulares. Aunque ya existen medicamentos que favorecen y ayudan a la cicatrización, estos suelen ser costosos, presentan efectos secundarios y no ser eficaces. Por lo anterior, se han buscado alternativas que ayuden de una manera eficaz al proceso de cicatrización, una de ellas son los productos naturales. En particular, al propóleo se le atribuyen diversas propiedades biomédicas, entre las que destacan la antibacteriana, antioxidante y antiinflamatoria, pero estas suelen variar dependiendo de su origen botánico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad cicatrizante de tres diferentes extractos (metanólico, clorofórmico y hexánico) de un propóleo de Michoacán en un modelo murino, para lo cual se hizo la caracterización química que incluyó la cuantificación de fenoles y flavonoides totales y el análisis mediante HPLC-DAD, HPLC-MS Y CG-EM. Posteriormente se hizo la evaluación de la capacidad antioxidante y la evaluación de la eficacia cicatrizante, la cual se complementó con la evaluación histológica. Los resultados mostraron un mayor contenido de fenoles y flavonoides para el extracto metanólico (620 mgEAG/g y 10.64 mgEQ/g respectivamente), en el análisis en HPLC-DAD se identificó pinocembrina, camferol y acacetina, en el análisis en HPLC-MS se encontró la presencia de los mismos compuestos, además de crisina y naringenina, los cuales se sabe poseen propiedades como actividad antibacteriana, antioxidante y antiinflamatoria. El extracto hexánico fue el único que se sometió al análisis mediante CG-EM, se encontraron 3 compuestos, siendo el más abundante el eicosano, seguido del

hexacosano y heptacosano. En la evaluación de la capacidad antioxidante, se obtuvo una CA₅₀ de 13 µg/mL para el extracto metanólico. Por último, se evaluó la eficacia cicatrizante de los extractos metanólico y clorofórmico, se encontró que el extracto metanólico presentó la mayor eficacia cicatrizante (33%), incluso superó a la del control positivo (Recoverón). Por lo anterior se realizó la evaluación histológica del área lesionada, donde, se comprobó que el extracto metanólico del propóleo le brinda más resistencia a la herida.

El extracto metanólico del propóleo es un buen candidato para su uso como cicatrizante, ya que brinda mayor fuerza y resistencia a la cicatriz, lo que probablemente se asocia a su composición química, ya que los compuestos identificados poseen propiedades biomédicas, como actividad antibacteriana, antioxidante y antiinflamatoria.

Palabras clave: *cicatrización, propóleo, fenoles, flavonoides, antioxidantes.*

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo, el cual representa del 6-7 % del peso corporal, está conformada por 3 capas: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis cubre la totalidad de la superficie corporal, además es la capa de la piel con mayor número de células; la dermis proporciona resistencia y elasticidad pues está formada básicamente de tejido conectivo fibroelástico y constituye la mayor masa de piel; la hipodermis se integra con la dermis, está formada de tejido conectivo laxo y muchas de sus fibras se fijan a las de la dermis, formando franjas de anclaje (Castrillón y col., 2008; Pérez y Noriega, 2011) (APÉNDICE 1).

La piel, además de ser un órgano de percepción, termorregulación y evaporación, es la barrera entre el medio interno y externo contra agresiones (físicas, químicas y microbiológicas). Un tipo de agresión que puede sufrir la piel son las heridas (Castrillón y col., 2008).

Una herida es la región anatómica donde queda interrumpida la continuidad celular a causa de la exposición a agresiones del entorno que provocan que la piel sea susceptible a alguna lesión, la cual afecta al organismo en diversas formas, incluyendo pérdida local de fluidos, dolor por estímulos neurales y liberación de productos celulares a la circulación (Falanga, 2004; Bradley y col., 1999)

A este estímulo, la piel reacciona emitiendo señales bio-eléctricas y activando grupos celulares cuyo objetivo es la remodelación continua del tejido, así, mediante procesos químicos y mecánicos se lleva a cabo la cicatrización, un proceso complejo que se ocupa de recuperar la integridad del tejido, permitiendo su regeneración y restaurando sus funciones (Watson, 2009).

De acuerdo al tipo de herida, que puede ser aguda o crónica, se lleva a cabo el proceso de reparación; en las agudas, la cicatrización se presenta de manera natural, permitiendo un buen resultado en el establecimiento de la integridad del tejido, sin embargo, en las heridas crónicas, se observa una nula o escasa reparación del tejido de manera espontánea, por ejemplo, las úlceras, así que para poderse llevar a cabo el proceso de cicatrización en estas heridas, es necesario transformarla en aguda (Martín, 2005).

La cicatrización se realiza mediante 3 etapas que son: inflamación, proliferación y remodelación, las cuales se presentan en forma secuencial con la participación de diversos tejidos y linajes celulares (Ramírez, 2010).

Inflamación

Tiene una duración promedio entre 24 a 48 horas (Benavides, 2008). Comienza con la hemostasia, la cual inicia inmediatamente después de presentarse la lesión y tiene una duración de hasta 15 minutos. Su objetivo principal es evitar la pérdida de fluido sanguíneo mediante el cese de la hemorragia y la formación del coágulo, protegiendo así al sistema vascular y la función de los órganos vitales. El coágulo formado tiene funciones específicas, tanto de activación celular como de mediación y andamiaje para las células que promueven la fase de inflamación y regeneración del tejido (Velnar y col., 2009).

La fase inflamatoria tiene su inicio hacia el minuto 16, se presenta como respuesta protectora e intenta destruir o aislar aquellos agentes que puedan ser patógenos para el tejido. Se presenta la migración de neutrófilos a la herida, atraídos por factores quimiotácticos específicos, como el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), la calicreína y los fibrinopéptidos. Una vez que los neutrófilos migran al intersticio, se dan las interacciones "célula-célula" y

“célula-matriz” favorecidas por las integrinas iniciando así la función de fagocitosis de bacterias y proteínas de la matriz por medio de liberación de enzimas específicas (hidrolasas, proteasas y lisozimas) y radicales libres de oxígeno (Ramírez, 2010; Guarín-Corredor y col., 2013).

Proliferación

Inicia 24 horas posteriores a la herida, se conforma por tres fases: granulación, reepitelización y contracción de la herida. La granulación inicia hacia el tercer día y dura aproximadamente de 15 a 20 días, el objetivo de esta fase es generar una barrera protectora, con el fin de aumentar los procesos regenerativos como la producción de nuevos vasos sanguíneos y evitar el ingreso de agentes nocivos; se caracteriza por la activación de dos grandes procesos: angiogénesis y migración de fibroblastos, los cuales facilitan la formación de una matriz extracelular (MEC) provisional, que proporciona un andamiaje para la migración celular y la síntesis de una MEC madura (Guarín-Corredor y col., 2013).

En la reepitelización, los queratinocitos deben migrar desde los bordes de la herida con el fin de restablecer la barrera cutánea, este ciclo de activación del queratinocito comienza con la interleucina 1 (IL-1), que lo transforma en célula hiperproliferativa y migratoria, dicha actividad la realiza sobre una matriz rica en fibronectina y mediada por receptores de superficie como las integrinas ($\alpha 5$ - $\beta 1$) y el factor de crecimiento transformante (TGF β). Luego, la migración es sobre la matriz definitiva rica en colágeno, mediada por receptores de superficie colagénicos ($\alpha 2$ - $\beta 1$) y la liberación de TGF α /EGF; para que se realice este proceso, en la membrana basal desaparecen la laminina y el colágeno de tipo IV (Ramírez, 2010).

Remodelación

Ocurre durante todo el proceso de reparación, se presentan cambios en la composición de la matriz extracelular, ya que el coágulo de fibrina se reemplaza por tejido de granulación rico en colágeno tipo III y subsecuentemente por colágeno tipo I, después de un año o más, la dermis retorna gradualmente al fenotipo existente previo a la lesión (Li y col., 2007; Agaiby y Dyson, 1999).

Las heridas en México y en el mundo representan un problema de salud pública que afecta directamente la calidad de vida de las personas que las padecen y sus familias, ya que estas heridas pueden conducir períodos prolongados de discapacidad, dolor e incomodidad (Secretaría de Salud, 2018); además, el costo económico de las heridas es de miles de millones de pesos, la hospitalización es el mayor inductor de costos para el sistema. En México, un día cama en hospitalización está valuado en \$5,684 MXN y los pacientes no pueden ser dados de alta hasta que la herida tenga buen avance en su cicatrización, por lo que cualquier retraso en la cicatrización de la herida tiene un impacto significativo en los días de hospitalización y en otros recursos del sistema de salud (DOF, 2011).

Es importante mencionar que en nuestro país, no toda la población tiene acceso a algún servicio médico y los medicamentos que se utilizan actualmente para el tratamiento de las heridas tienen costos elevados (\$300-5000 MXN) siendo inaccesibles para una parte de la población, además, dichos medicamentos suelen presentar sólo una actividad biológica, ya sea como antibacteriano, antiinflamatorio, analgésico o que acelere el proceso de cicatrización, por tal motivo se necesitan de varios medicamentos para un tratamiento integral, sin mencionar los efectos secundarios que estos pueden provocar. Por lo tanto, en México la medicina tradicional representa la única alternativa médica para más de

40 millones de mexicanos que no tienen acceso a los diferentes centros de salud (Simental, 2014).

Dentro de esta medicina tradicional, el propóleo ha sido utilizado por muchos años, ya que se le atribuyen diversas propiedades biomédicas como antibacteriana, antifúngica, antivirales, anestésica, antiulcerosas, inmunoestimulantes, hipotensivas, citostáticas, antioxidante, fitoinhedoras, anticariogénicas y regeneradoras o cicatrizantes (Chaillou y col., 2004).

Las abejas utilizan el propóleo para cubrir el interior de la colmena (incluidos los panales) con fines desinfectantes, cerrar grietas, reducir vías de acceso y consolidar los componentes estructurales. También es utilizado para recubrir los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena (escarabajos, roedores, lagartijas, etc.), que quedan embalsamados evitando su descomposición (Bedascarrasbure y col., 2001) (APÉNDICE 2).

Lo anterior es posible gracias a su contenido, el cual consiste en una mezcla de polifenoles, incluyendo flavonoides aglicanos, ácidos fenólicos, aldehídos fenólicos y cetonas. Actualmente, en el propóleo se han identificado más de 300 compuestos, de los cuales un alto porcentaje son ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas y flavonoides (Kumar y col., 2008), sin embargo, investigaciones sobre propóleos en diferentes áreas geográficas han mostrado grandes diferencias en su composición química (Ledón y col., 1997) y es evidente que su actividad biomédica se debe a la combinación y sinergia de los diferentes compuestos que contiene (Delgado y col., 2015).

ANTECEDENTES

Londoño y col. (2008), reportaron la actividad antifúngica del extracto etanólico de un propóleo procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, el cual mostró actividad inhibitoria sobre los hongos levaduriformes *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*.

Quintero-Mora y col. (2008), evaluaron la actividad antifúngica de ocho extractos etanólicos de propóleos provenientes de diferentes regiones de México frente a cepas de *Candida albicans*, una de referencia (ATCC 10231) y 36 cepas de origen clínico, resultando que los propóleos provenientes de Cuautitlán Izcalli y Amatepec, Estado de México, fueron los que presentaron mayor actividad antifúngica, ya que inhibieron 34 de las 36 cepas y 35 de las 36 cepas, respectivamente.

Benavides y col. (2016), evaluaron la actividad cicatrizante del extracto etanólico del propóleo de *Apis mellifera scutellata* en cabra. Compararon dos concentraciones de propóleo, al 30% y 50%, midieron longitud, ancho y tiempo de cicatrización en la herida del dorso de la cabra. Reportaron que la concentración del 50% presentó el mayor efecto, ya que la longitud de la herida fue menor en comparación con los demás tratamientos y también esta concentración fue la única que presentó la cicatrización completa del tejido a los 28 días.

Vargas (2017), evaluó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de un propóleo de Chihuahua, reportó actividad inhibitoria en bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* las cepas más susceptibles. De la misma forma se evaluó la actividad antifúngica sobre

tres hongos filamentosos: *Fusarium moniliforme*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger*, los cuales fueron sensibles al propóleo presentando una inhibición del crecimiento mayor al 50%.

Chávez (2017), evaluó la actividad cicatrizante de un extracto etanólico de un propóleo de Chihuahua (concentración del 10%) reportando que esta concentración obtuvo el 100% de eficacia cicatrizante, mientras que el control positivo solo alcanzó el 87%, también reporta que, en el conteo de fibroblastos, el extracto del propóleo y el control positivo no presentaron diferencias significativas. Nava (2018), evaluó la propiedad antibacteriana de un extracto etanólico de un propóleo de Chihuahua. Reportó que *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* fueron sensibles al extracto. También evaluó su actividad antiinflamatoria, cicatrizante y su toxicidad probando dos concentraciones: 10% y al 50%, donde encontró que la concentración del 10% fue el mejor cicatrizante ya que proporcionó fuerza a la cicatriz y aceleró el cierre de heridas.

Robles (2018), realizó la caracterización química de 59 muestras de propóleo de diferentes zonas de México. El contenido de fenoles se encontró en un rango de 8.8 a 270 mg EAG/g de muestra y el de flavonoides desde cantidades no detectables hasta 193.4 mg EQ/g de muestra. Finalmente, en el análisis en HPLC-DAD, la acacetina fue el compuesto más frecuente, ya que se encontró en todas la muestras, seguido de la apigenina en 34 muestras y la pinocembrina en 28 muestras.

JUSTIFICACIÓN

Debido a las propiedades biomédicas antes mencionadas y a su uso dentro de la medicina tradicional, el propóleo es una alternativa de tratamiento para la curación de heridas cutáneas, actuando de una manera integral promoviendo el proceso de cicatrización, ya que los medicamentos utilizados en la actualidad están diseñados para el tratamiento en particular de una de las fases o componentes del proceso de cicatrización, lo que hace necesaria la adquisición de varios medicamentos para un tratamiento integral, haciéndolos inaccesibles para la mayoría de la población debido a su alto costo.

PROBLEMA

¿El propóleo de Michoacán tendrá actividad cicatrizante?

HIPÓTESIS

Si se ha reportado que los propóleos están constituidos principalmente por compuestos fenólicos y si a este tipo de compuestos se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antioxidantes y antifúngicas, entre otras, entonces es muy probable que el propóleo de Michoacán contenga este tipo de compuestos y que por tal motivo tenga propiedades similares que ayuden o favorezcan el proceso de cicatrización.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad cicatrizante de un propóleo de *Apis mellifera* de Michoacán.

OBJETIVOS PARTICULARES

Del propóleo de *Apis mellifera* de Michoacán:

- Caracterizar la composición química.
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro*.
- Evaluar la fuerza de cierre en un modelo murino.
- Determinar a nivel histológico la actividad cicatrizante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del propóleo

Los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico del propóleo de Michoacán fueron donados por la Dra. Margarita Canales M. del Laboratorio de Farmacognosia, UBIPRO, los cuales se obtuvieron por la técnica de maceración.

El mayor rendimiento registrado fue para el extracto clorofórmico con 57.65%, seguido del extracto hexánico con 17.64% y el extracto metanólico tuvo un rendimiento de 14.24%.

- **Caracterización química del propóleo de Michoacán**

Primeramente, se realizó una prueba cualitativa para determinar la presencia de fenoles en los extractos, la cual consistió en agregar unas gotas de cloruro férrico (FeCl_3) al 1% en una solución del extracto con su respectivo solvente, es decir, el extracto metanólico y clorofórmico se disolvió en etanol y el extracto hexánico en cloroformo. Si hay reacción se observa un viraje de color a azul.

En el caso de flavonoides también se inició con la prueba cualitativa, en este caso se agregaron gotas de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% a la solución del extracto con su respectivo solvente ya antes mencionado. Si hay reacción se observa un viraje de color a amarillo.

Determinación de fenoles totales por el método modificado de Singleton y Rosi (1965).

Se determinó por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando el reactivo de Follin-Ciocalteu como agente oxidante. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico (0.2 mg/mL). Se tomaron alícuotas seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.012, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agregó el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas.. Se tomó 1mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y propóleo) y se transfirió a un tubo de ensayo con 7 mL de agua destilada, después se adicionaron 500 μL de reactivo Folin-Ciocalteu, transcurridos cinco minutos se agregó 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L). Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 760 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico por gramo de propóleo (EAG/g).

Determinación de flavonoides totales por el método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007).

Se determinó usando una curva patrón de quercetina (1-100 mg/mL). Para el análisis de flavonoides totales del propóleo se prepararon 10 mg en 3 mL de MeOH. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determinó

la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina por gramo de propóleo (EQ/g).

Análisis del propóleo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).

Se realizó la caracterización química del extracto metanólico y clorofórmico. Se utilizó una columna de marca Grace Allsphere ODS-1, longitud de 250 mm x 4.6 mm de diámetro interno con un tamaño de partícula de 5 µm. Se preparó una fase móvil para 150 mL de Agua: Acetonitrilo: Metanol: Ácido fosfórico 0.1% (75:37.5:37.5:0.15). Se inyectaron 20 µL de los extractos metanólico y clorofórmico a una concentración de 3mg/mL con MeOH grado HPLC.

Análisis del propóleo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Se realizó la caracterización química del extracto hexánico del propóleo mediante GS-MS debido a que permite la separación de componentes volátiles o semivolátiles. Se utilizó una columna Agilent 19091S-433E, de 30 metros de longitud y 250 µm de diámetro. La temperatura inicial del horno fue de 70°C, la rampa de calentamiento fue de 15°C por minuto hasta alcanzar la temperatura máxima de 290°C, se mantuvo durante 6 minutos. La temperatura del inyector fue de 250°C en modo de inyección split; el flujo de la corrida fue de 35cm/seg. El rango del detector del espectrómetro de masas fue de 35-600 m/z. Se inyectó 1 µl de muestra.

Análisis del propóleo por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC- MS)

Se sometieron a un análisis por HPLC-MS los tres extractos de propóleo para conocer sus componentes químicos. El análisis se realizó en fase reversa en un HPLC-DAD-ESI-TOF-MS (High Pressure Liquid Chromatography-Electrospray-Time of Flight-Mass spectrometry).

Para el HPLC se utilizó una columna Kinetex 2.6 μ C18 100Å 150 x 2.1 mm (Phenomenex, USA). La temperatura de la columna se mantuvo a 25° C. La fase móvil A consistió en agua grado HPLC-DAD: acetonitrilo grado HPLC-DAD: ácido fórmico (89:10:1) y la fase móvil B consistió en metanol grado HPLC-DAD: acetonitrilo: ácido fórmico (89:10:1).

El HPLC está acoplado a un TOF/MS (Agilent 66230B) con interface electrospray. La temperatura del gas 250°C, el flujo del gas 6 L/min. El volumen de inyección fue de 10 μ L.

Evaluación de la capacidad antioxidante.

Se evaluó mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH•) método modificado de Murillo (2006). En placas de ELISA de 96 pozos de fondo plano se colocaron las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, y 100 ppm para determinar la concentración antioxidante media (CA₅₀) de los extractos del propóleo de Michoacán. Como control positivo se utilizó quercetina, todas las concentraciones se hicieron por triplicado. La placa se leyó en un lector de ELISA a 540 nm.

- **Fuerza de cierre**

Organismos

Los ratones (*Mus musculus*) fueron obtenidos del Bioterio de la FES Iztacala UNAM, se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y con acceso libre a alimento y agua. El proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Los factores de inclusión fueron: provenir de la cepa CD1, ser machos y tener 7 semanas de edad.

Método tensiométrico de Vaisberg, 1989.

La evaluación de la eficacia cicatrizante de los extractos de propóleo se llevó a cabo mediante el método tensiométrico, el cual consiste en medir la fuerza en gramos necesaria para abrir una herida que ya ha cicatrizado.

Se utilizaron los extractos metanólico y clorofórmico, los cuales fueron disueltos con gel quirúrgico para obtener la concentración del 10%, se administraron 15 μ L a fin de cubrir la herida en su totalidad, en el caso del recoverón se colocó con ayuda de una espátula.

Los ratones se dividieron en 5 grupos experimentales (n=5 organismos por grupo):

- Piel sana
- Piel con herida sin tratamiento
- Recoverón NC.
- Extracto metanólico de propóleo 10%
- Extracto clorofórmico de propóleo 10%

Para realizar la herida, a los ratones se les hizo una tricotomía en la región dorsal 24 horas previas al experimento utilizando una crema depiladora comercial (Crema

Veet natural). Al día siguiente se anestesiaron vía aérea con isoflurano al 5%, enseguida, con un bisturí del número 5 se hizo una incisión longitudinal de aproximadamente 1 cm, involucrando las 3 capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis). Los tratamientos se administraron vía tópica dos veces al día por 10 días. Al terminar este periodo, los ratones se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se sometieron al método tensiométrico para evaluar la eficacia de los extractos en el proceso de cicatrización (APÉNDICE 6).

- **Evaluación de la eficacia cicatrizante a nivel histológico**

Una vez obtenidos los resultados de la eficacia cicatrizante de los extractos del propóleo, se prosiguió a realizar la evaluación a nivel microscópico mediante histología.

Se utilizaron ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa CD1 con las mismas características que para el método tensiométrico y se formaron los mismos grupos experimentales.

De igual manera, se llevó a cabo la misma metodología utilizada para el método tensiométrico, realizando la incisión en la parte dorsal de cada ratón y aplicando todos los tratamientos 2 veces al día por 10 días, al término de este periodo se sacrificaron utilizando una cámara de CO₂ y se obtuvieron las muestras de piel del área lesionada las cuales fueron procesadas mediante la técnica histológica convencional y se tiñeron con la tinción Hematoxilina-Eosina (APÉNDICE 7 y 8).

Para la observación de los cortes histológicos, se tomaron fotografías con un microscopio Motic BA310E a un aumento de 10X y 40X. Para su análisis, se midió

la longitud de la herida, el grosor de la epidermis a la hipodermis y el grosor de la epidermis, las cuales se hicieron con el programa Motic Images Plus 2.0 ML.

Longitud de la herida

Se utilizaron las capturas del área lesionada en 10x. El campo seleccionado fue en donde se detectó la interrupción de la continuidad celular, se hicieron 5 mediciones para obtener el promedio y graficar. Esto se realizó para cada grupo experimental.

Grosor epidermis-hipodermis

De las capturas del área lesionada en 10x, se hicieron 5 mediciones desde la epidermis hacia la hipodermis, se obtuvo el promedio de cada grupo experimental y se graficó.

Grosor epidermis

Se utilizaron las capturas del área lesionada en 40x para observar la epidermis, se hicieron 5 mediciones del grosor de la epidermis de cada grupo experimental. Se obtuvo el promedio y se graficó.

Conteo de fibroblastos

Se utilizaron las capturas del área lesionada, es decir de borde a borde de la herida a un aumento de 40x. Los fibroblastos se identificaron con base en su morfología y la presencia del núcleo central. (APÉNDICE 9).

Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron con la media del error estándar de los datos. Para evaluar estadísticamente las diferencias entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) con una prueba de comparación múltiple (Tukey-Kramer) ($P < 0.05$), utilizando el software GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Caracterización química del propóleo de Michoacán

Cuantificación de fenoles y flavonoides

Los fenoles y flavonoides son los compuestos más abundantes en los propóleos, además se considera que son los responsables de su propiedad antioxidante. En la prueba cualitativa, los extractos metanólico y clorofórmico fueron positivos, sin embargo, el extracto hexánico no presentó reacción alguna.

Para la prueba cuantitativa, el extracto metanólico presentó mayor concentración de estos compuestos en comparación con el extracto clorofórmico (Cuadro 1).

Cuadro 1. Contenido de fenoles y flavonoides de los extractos del propóleo de Michoacán

BIOMOLÉCULA	EXTRACTO METANÓLICO	EXTRACTO CLOROFÓRMICO
Fenoles (mg EAG/g)	620	20
Flavonoides (mg EQ/g)	10.64	4.89

Análisis por cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC-DAD).

Mediante este análisis, para el extracto metanólico se identificaron 3 compuestos: pinocembrina, acetina y camferol, mientras que para el extracto clorofórmico se identificaron pinocembrina y acetina. A continuación, se presentan los cromatogramas obtenidos de cada extracto (Figura 1 y 2).

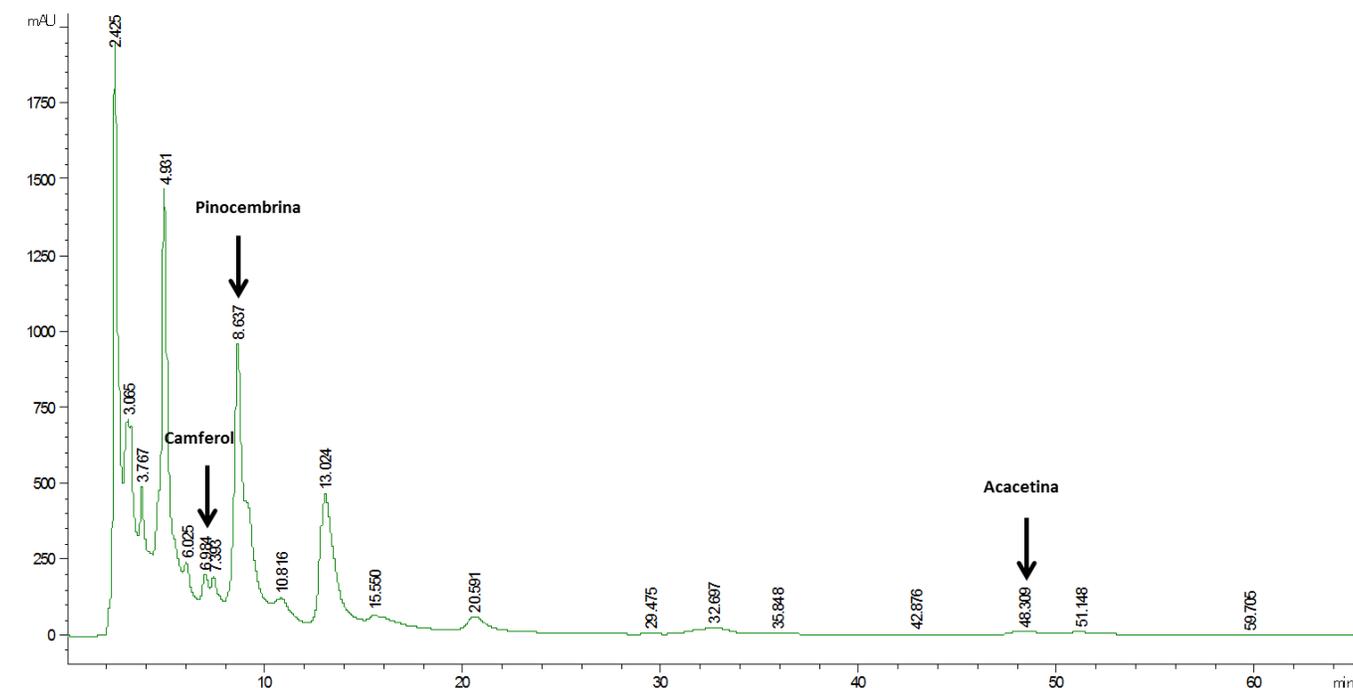


Figura 1. Compuestos fenólicos identificados mediante HPLC-DAD en el extracto metanólico del propóleo de Michoacán.

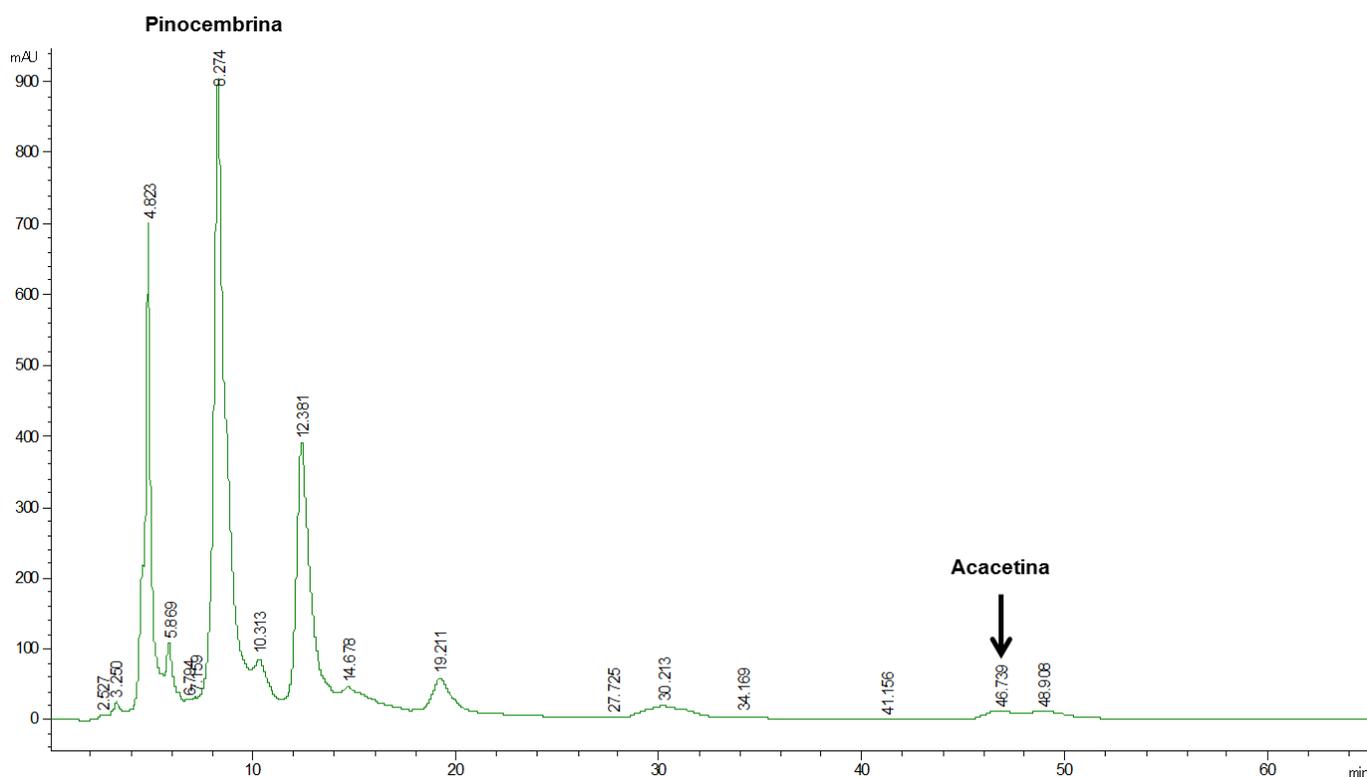


Figura 2. Compuestos fenólicos identificados mediante HPLC-DAD en el extracto clorofórmico del propóleo de Michoacán.

Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La fracción hexánica se sometió al análisis CG-EM, se identificaron 3 compuestos siendo el eicosano el compuesto más abundante, seguido del heptacosano y hexacosano (Cuadro 2, Figura 3).

Cuadro 2. Compuestos identificados en el extracto hexánico del propóleo de Michoacán por CG-EM.

Compuesto	Probabilidad (%)	Tiempo de retención (min)	Abundancia en el extracto hexánico (%)
Eicosano	93	16.976	21.205
Heptacosano	91	23.443	10.692
Hexacosano	95	14.216	5.802

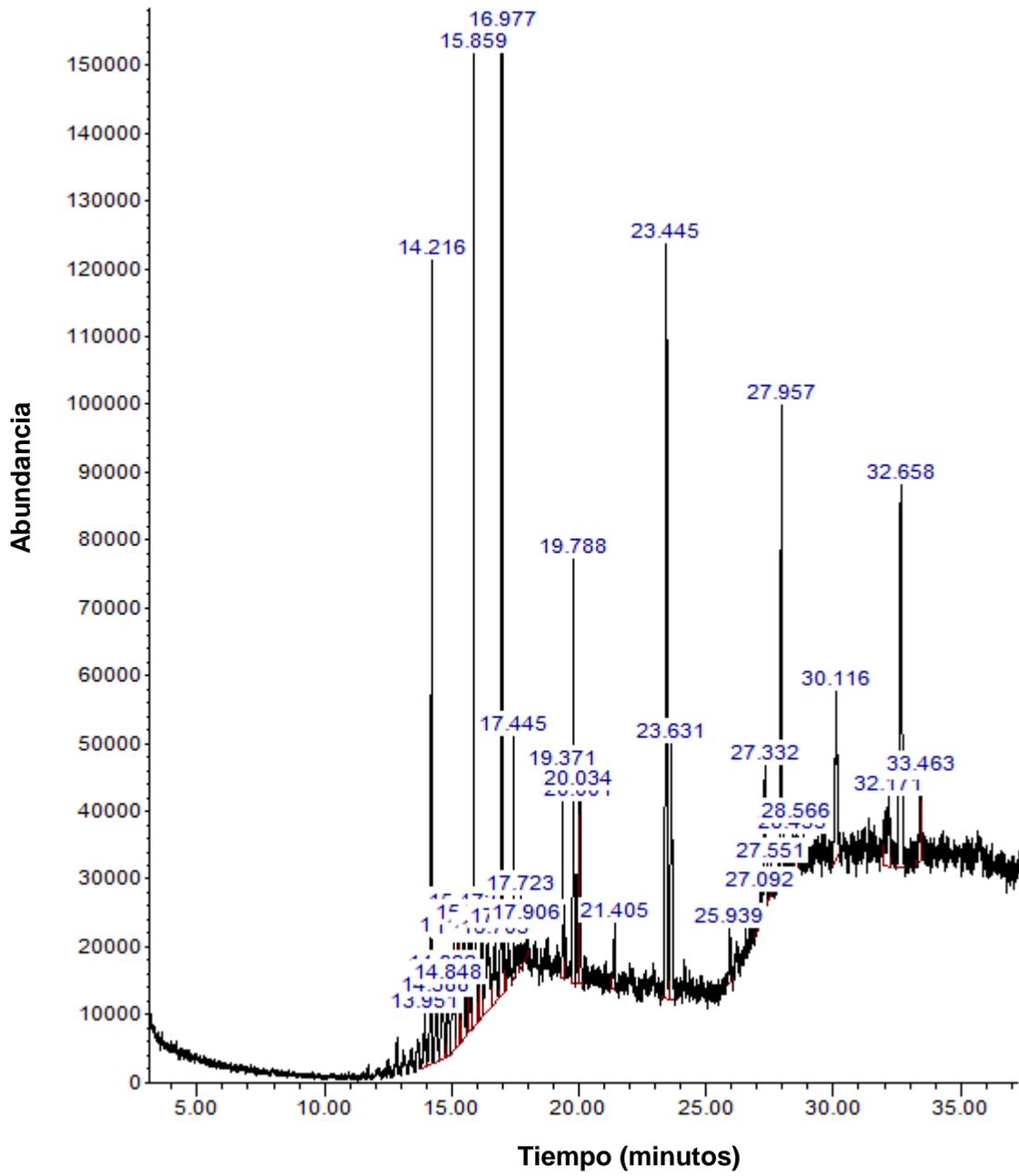


Figura 3. Cromatograma del análisis CG-EM del extracto hexánico del propóleo de Michoacán.

Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (LC- MS).

Los tres extractos de propóleo se sometieron al análisis por HPLC-MS. Se identificaron 4 compuestos (crisina, pinocembrina, naringenina y acacetina) siendo los mismos para el extracto metanólico (Cuadro 3. Fig. 4) y clorofórmico (Cuadro 4; Fig. 5), en el extracto hexánico sólo se encontraron 3 de ellos (crisina, pinocembrina y acacetina) (Cuadro 5; Fig. 6).

Cuadro 3. Compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico del propóleo de Michoacán detectados por HPLC-MS.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión (m/z)
Crisina	29.817	253.0621
Pinocembrina	29.07	255.0781
Naringenina	22.086	271.0729
Acacetina	31.542	283.0725

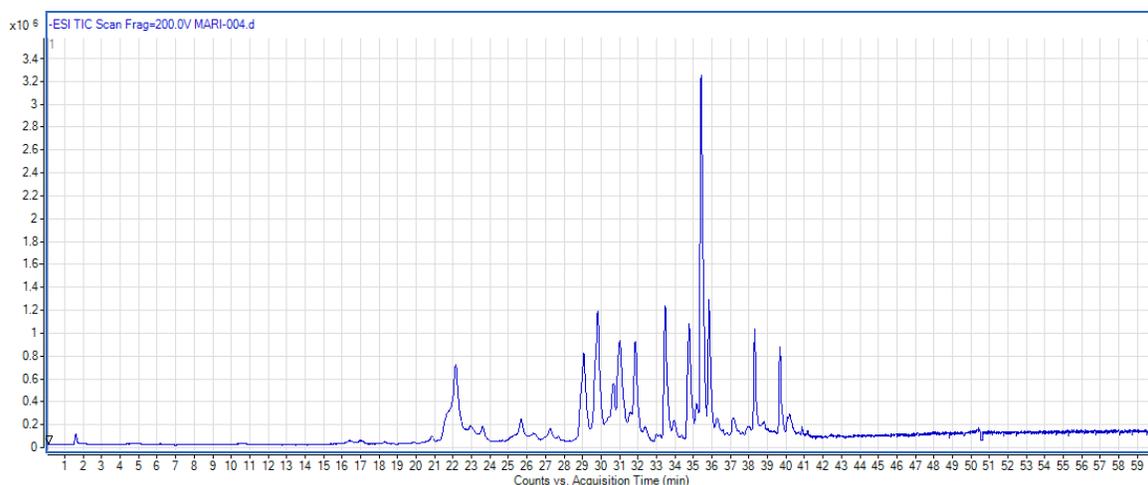


Figura 4. Cromatograma mediante HPLC-MS del extracto metanólico del propóleo de Michoacán.

Cuadro 4. Compuestos fenólicos presentes en el extracto clorofórmico del propóleo de Michoacán detectados por HPLC-MS.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión (m/z)
Crisina	29.732	253.0611
Pinocembrina	28.969	255.0769
Naringenina	22.018	271.0721
Acacetina	31.458	283.0717

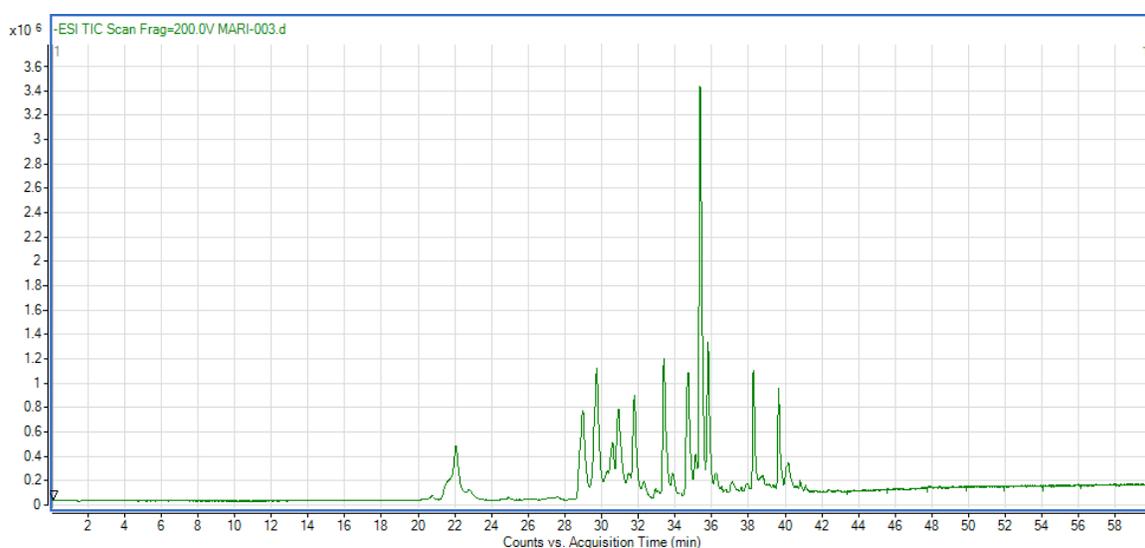


Figura 5. Cromatograma mediante HPLC-MS del extracto clorofórmico del propóleo de Michoacán.

Cuadro 5. Compuestos fenólicos identificados en el extracto hexánico del propóleo de Michoacán por HPLC-MS.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión (m/z)
Crisina	29.649	253.0595
Pinocembrina	28.886	255.0753
Naringenina	21.884	271.0692

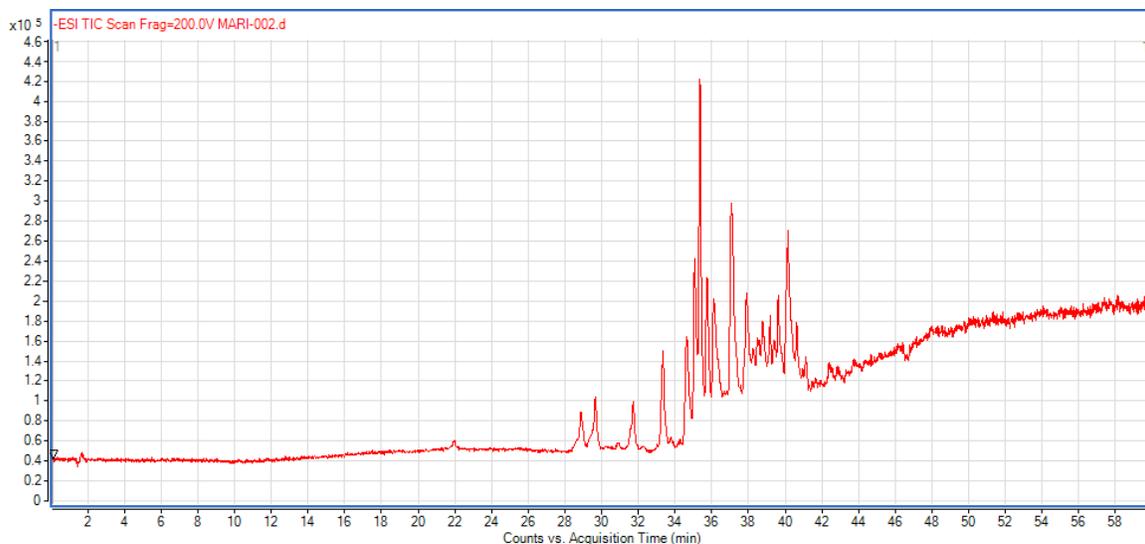
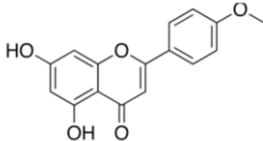
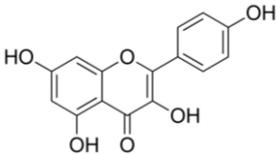
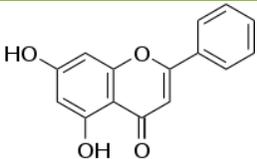
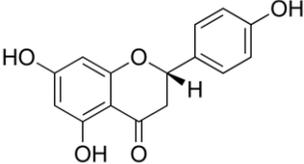
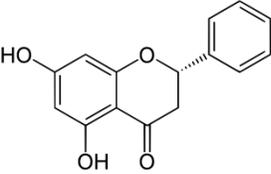


Figura 6. Cromatograma mediante HPLC-MS del extracto hexánico del propóleo de Michoacán.

A continuación, se presentan algunas de las propiedades biomédicas que tienen los compuestos identificados en el propóleo de Michoacán.

Cuadro 6. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados mediante HPLC-DAD, HPLC-MS y CG-EM.

Compuesto	Estructura	Propiedades biomédicas
Acacetina		Antiinflamatoria (Stangaciu, 1998)
Camferol		Antiinflamatoria antioxidante (Cheng y col., 2013).
Crisina		Antibacteriana, antioxidante (Zeghad y Merghem, 2013)

Naringenina		Antiinflamatoria, antioxidante (Felgines, 2000).
Pinocembrina		Antiinflamatoria antioxidante, antimicrobiana, anestésica (Stangaciu, 1998; Fernley, 2001).
Eicosano		Antibacteriana (Hsouna y col, 2011).
Hexacosano		Antifúngica (Fethi y col, 2012; Marrufo y col, 2013)
Heptacosano		Antifúngica (Fethi y col, 2012; Marrufo y col, 2013)

Evaluación de la capacidad antioxidante

Ya que sí se encontraron compuestos fenólicos en el extracto metanólico y clorofórmico del propóleo de Michoacán, se continuo con la evaluación de la capacidad antioxidante de dichos extractos, pues el propóleo es considerado un antioxidante natural. Como control positivo se utilizó quercetina, la cual tuvo una CA₅₀ de 6.5 µg/mL. Mientras que el extracto metanólico presentó una mayor capacidad antioxidante en comparación con el extracto clorofórmico (Cuadro 7).

Cuadro 7. CA₅₀ de los extractos del propóleo de Michoacán.

EXTRACTO	CA ₅₀ (µg/mL)
Metanólico	13.0
Clorofórmico	1195.0

Además, de acuerdo con el índice de actividad antioxidante (AAI) utilizando el método de DDPH (Scherer y Teixeira, 2009), el cual nos dice que si el valor de este índice es < 0.5 µg/mL, hay una pobre actividad antioxidante, si el valor es de 0.5-1.0 µg/mL es de actividad moderada, si el valor es de 1.0 a 2.0 la actividad antioxidante es fuerte y si el valor es mayor de 2 la actividad antioxidante se considera muy fuerte; el valor del índice del extracto metanólico del propóleo fue de 2.30, por tal motivo su actividad antioxidante es muy fuerte.

Fuerza de cierre

Debido a la composición química de los extractos metanólico y clorofórmico del propóleo de Michoacán, se continuó con la evaluación de la eficacia cicatrizante mediante el método tensiométrico.

En la figura 7 se muestran las imágenes del proceso de cicatrización de las heridas (día 1, 5 y 10) de cada tratamiento.

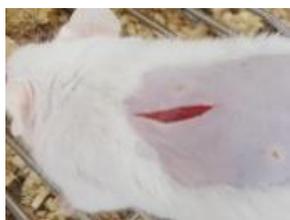
Como se observa, el grupo sin tratamiento al día 10 es el que muestra mayor inflamación, seguido del grupo tratado con el extracto clorofórmico, en el cual también se observa una ligera inflamación; El grupo tratado con recoverón no presenta inflamación, sin embargo, no se observa aún una cicatriz bien formada, por otra parte, el grupo tratado con el extracto metanólico de propóleo, ya presenta una cicatriz bien formada y libre de inflamación.

Día 1

Día 5

Día 10

Sin tratamiento



Recoverón



Extracto clorofórmico 10%



Extracto metanólico 10%



Figura 7. Fotografías de los ratones para la evaluación de la eficacia cicatrizante al día 1, 5 y 10 de los distintos grupos experimentales.

En la figura 8 se puede observar que para el extracto metanólico del propóleo (EM) se necesitó de mayor fuerza para abrir la herida (33%), en comparación con el grupo de recoverón (control positivo) (16.07%) y los otros dos grupos experimentales (S/T y ECI) (14% y 15%, respectivamente), por tal motivo, el extracto metanólico del propóleo contribuye a que se lleve a cabo un cierre de herida más eficiente.

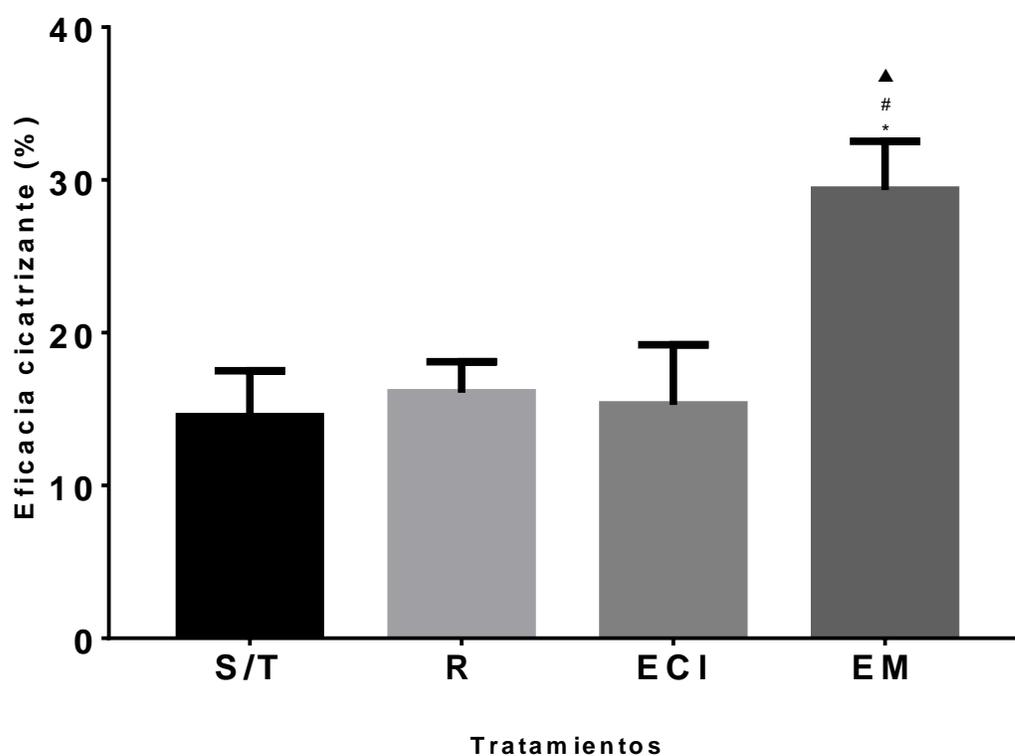


Figura 8. Eficacia de cicatrización de los extractos de propóleo de Michoacán por el método tensiométrico. S/T: sin tratamiento; R: Recoverón; ECI: Extracto clorofórmico. EM: Extracto metanólico. *Diferencia significativa con el grupo S/T; #Diferencia significativa con R; ▲ Diferencia significativa con ECI.

Debido a que el extracto metanólico presentó la mayor fuerza de cicatrización y con el fin de respaldar estos resultados, se realizó la técnica histológica del área lesionada para comparar la evolución de la reparación del tejido.

En la figura 9 y 10 se pueden observar las microfotografías de los cortes de piel de los distintos grupos experimentales. Se presentan dos aumentos de cada tratamiento (100X y 400X).

En el aumento de 100X se señala la epidermis y se puede observar la longitud de la herida, la cual, es mayor en el grupo sin tratamiento, el cual también presenta un mayor número de células inflamatorias. En comparación, el grupo tratado con recoverón y propóleo presentan una herida más pequeña, así como menor número de células inflamatorias.

En el aumento de 400X se señala la epidermis, fibroblastos y fibras de colágena. Como se observa, el grupo sin tratamiento presenta un grosor de epidermis mayor, en comparación con los demás grupos experimentales, además se observa menor densidad de fibras de colágena, el grupo tratado con recoverón así como el grupo tratado con propóleo, presentan mayor número de fibras de colágena y una epidermis delgada, asemejándose a la arquitectura del tejido de piel sana, además cabe resaltar que las fibras de colágena del grupo tratado con propóleo son más gruesas, por tal motivo este grupo presentó la mayor eficacia cicatrizante (Fig. 8)

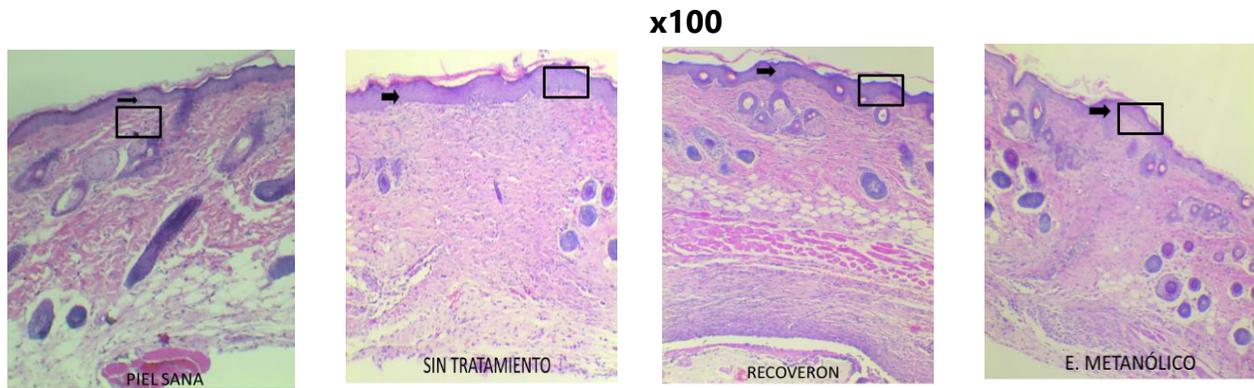


Figura 9. Microfotografías del área lesionada de la piel de ratones para la evaluación cicatrizante. Aumento x100. Se señala epidermis (➡). Tinción H-E.

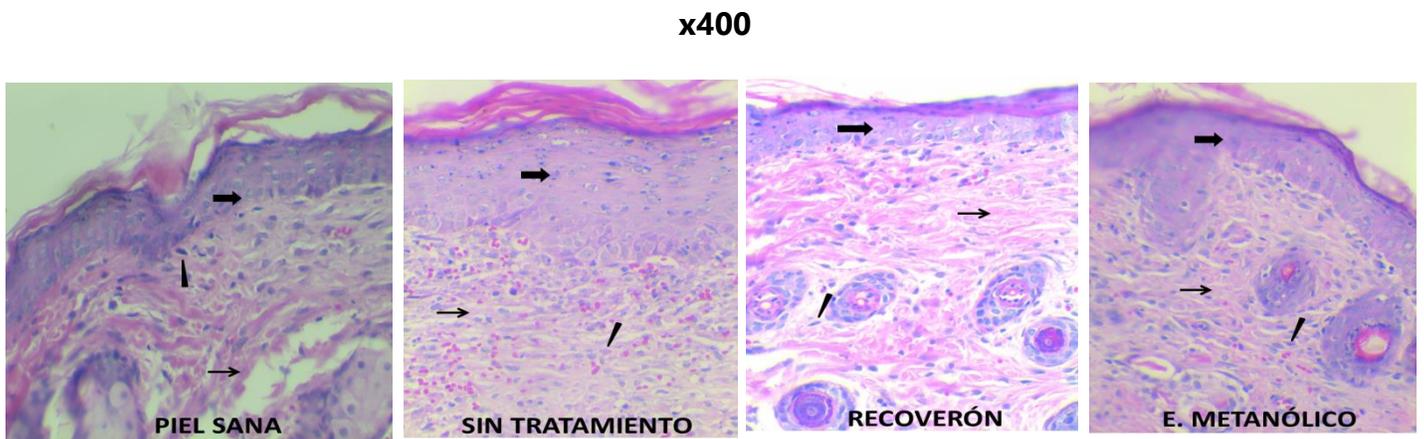


Figura 10. Microfotografías del área lesionada de la piel de ratones para la evaluación cicatrizante. Aumento x400 se señala epidermis (➡), fibroblastos (➡) y fibras de colágena (↘). Tinción H-E.

Todos los grupos presentan diferencias significativas entre ellos. Como se observa, el grupo sin tratamiento presenta una herida más pequeña que el grupo tratado con propóleo, por otra parte, el recoverón aceleró el cierre de herida, cabe destacar que, aunque el propóleo no aceleró el cierre, este sí brindó mayor fuerza en la herida (Fig. 8) por lo que probablemente favorece la proliferación de fibroblastos y por lo tanto, la síntesis de colágeno.

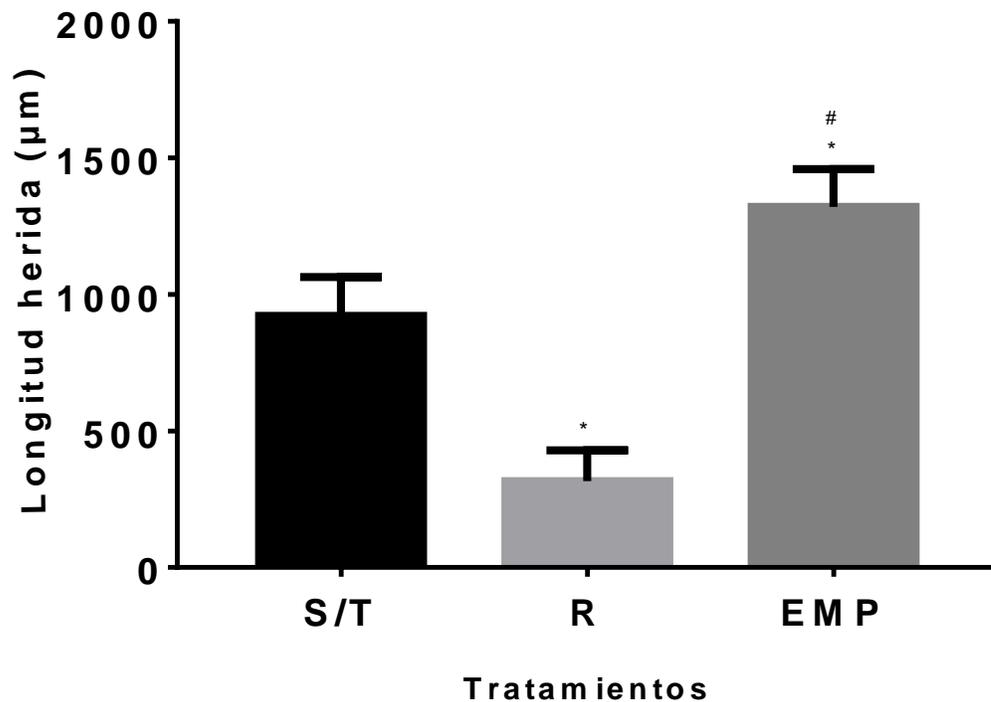


Figura 11. Longitud de la herida de los cortes histológicos. S/T: sin tratamiento; R: Recoverón y EM: Extracto metanólico del propóleo de Michoacán. * Diferencia significativa con S/T; # Diferencia significativa con R. (P<0.05).

En cuanto al grosor de la epidermis (Fig. 12), el grupo de piel sana presentó el valor más pequeño, ya que, al no haber lesión, está mantiene su integridad; los grupos con herida presentan valores más altos ya que se encuentran en proceso de reparación celular. En la gráfica se observa que el grupo sin tratamiento presenta el valor más alto, mientras que el grupo tratado con recoverón y propóleo se encuentran por debajo de éste, por lo que probablemente actúan durante el proceso de reparación tisular.

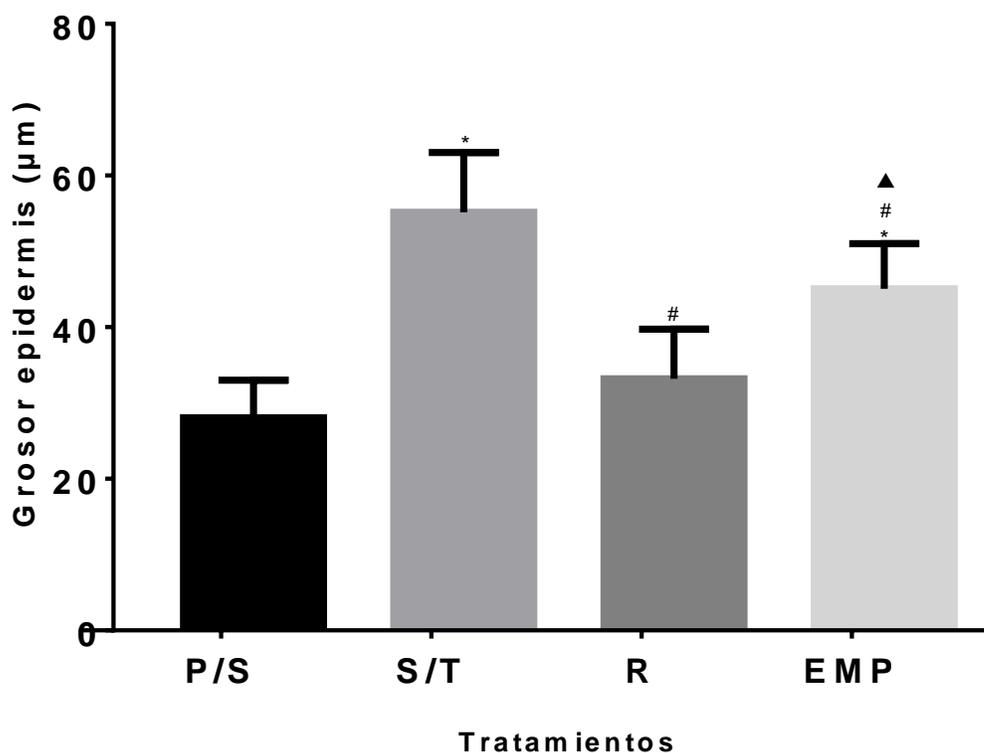


Figura 12. Grosor de la epidermis de los cortes histológicos de los distintos grupos experimentales. P/S: Piel Sana; S/T: sin tratamiento; R: Recuperón y EM: Extracto metanólico del propóleo de Michoacán. *Diferencia significativa con el grupo P/S; # Diferencia significativa con el grupo S/T; ▲ Diferencia significativa con R.

En cuanto al grosor de la epidermis hacia la hipodermis (Fig. 13), el grupo de piel sana presenta el valor más alto, lo cual es normal ya que no ha sufrido pérdida de fluidos por lo tanto mantiene su integridad celular. Por otro lado, el grupo sin tratamiento presenta el valor más bajo en comparación con el grupo de recuperón y propóleo, cabe destacar que, aunque los valores del tratamiento con propóleo se encuentran por debajo del tratado con recuperón, este es una mezcla de diferentes compuestos naturales con una amplia variedad de propiedades biomédicas que probablemente actúan de manera sinérgica en las distintas etapas de la cicatrización.

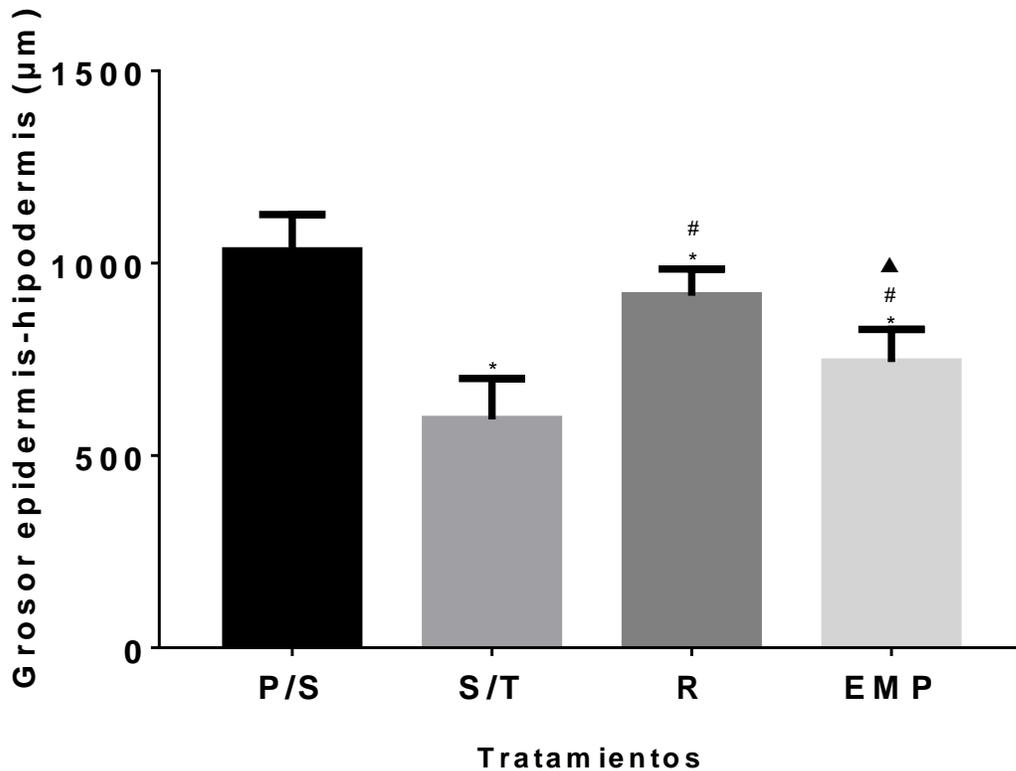


Figura 13. Grosor de la epidermis a la hipodermis. P/S: piel sana; S/T: sin tratamiento; R: Recoverón y EM: Extracto metanólico del propóleo de Michoacán. *Diferencia significativa con el grupo P/S; # Diferencia significativa con el grupo S/T; ▲ Diferencia significativa con el grupo R (P<0.05).

Para finalizar, se realizó el conteo de fibroblastos activos (Fig. 14); el grupo de piel sana presenta el valor más bajo, esto debido a que sólo cuando hay una lesión, los fibroblastos se activan, se diferencian de células totipotenciales y proliferan en la zona lesionada, por lo tanto, los demás grupos experimentales muestran valores más altos, en especial el control positivo (recoverón) y el extracto metanólico del propóleo, los cuales no presentan diferencias significativas entre ellos, es decir, ayudan a la rápida proliferación de los fibroblastos, generando mayor síntesis de colágeno.

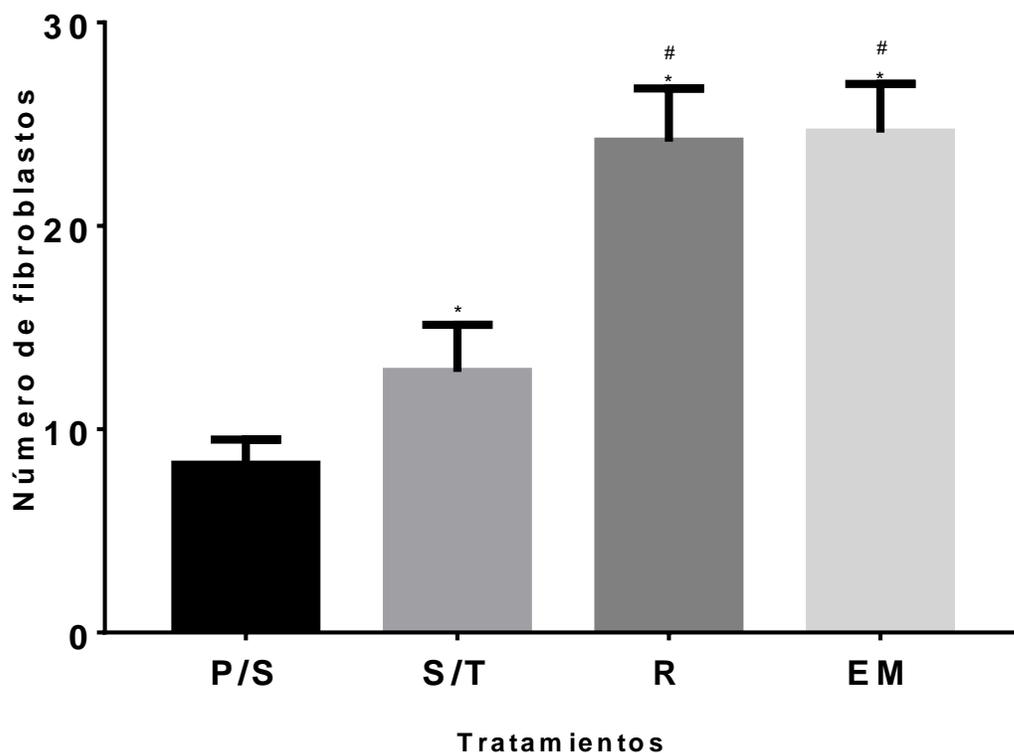


Figura 14. Promedio del número de fibroblastos de cada grupo experimental. S/T: Sin tratamiento; R: Recuperón y EM: Extracto metanólico del propóleo de Michoacán. * Diferencia significativa con P/S; # Diferencia significativa con el grupo sin tratamiento. (P<0.05).

DISCUSIÓN

El propóleo es una sustancia compleja elaborada a partir de resinas de diversas plantas; en la colmena es utilizado como material de sellado para mantener un ambiente aséptico (Bankova, 2009) pues tiene una mezcla de compuestos químicos identificados como familias de polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, etcétera, que pueden llegar a superar los 150 compuestos en un propóleo (Delgado y col., 2015) a los cuales se les atribuyen diversas actividades biomédicas, entre las que destacan la antibacteriana, antifúngica, antioxidante y antiinflamatoria y dependiendo de su origen botánico, estos compuestos varían.

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas, el metabolismo fenólico se activa en las plantas como una respuesta a diferentes condiciones de estrés, juegan un papel importante en la defensa de las plantas frente a agentes agresores externos como la radiación UV de los rayos solares, los microorganismos tanto bacterias, como hongos e insectos y otros animales herbívoros, las otras plantas (efecto alelopático) y el entorno (Faraa y Tahara, 1999), además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Por lo tanto, en el propóleo de Michoacán se cuantificaron fenoles y flavonoides totales, el contenido de estos compuestos fue mayor en el extracto metanólico (620 mg EAG/g de muestra y 10.64 mg EQ/g de muestra, respectivamente) que en el extracto clorofórmico, (20 mg EAG/g muestra y 4.89 mg EQ/g muestra, respectivamente) sin embargo, no se encontró contenido de estos compuestos en el extracto hexánico (Cuadro 1).

Los resultados anteriores son similares a lo reportado por Delgado y col., (2015) quienes cuantificaron fenoles y flavonoides totales de un extracto etanólico de un propóleo de Jalisco, reportando que la cuantificación de compuestos fenólicos totales arrojó un contenido de 260 mg EqAG/g de muestra. Por otra parte, la concentración de flavonoides obtenida fue de 130 mg EqQ/g de muestra, por lo que su proporción dentro de lo fenoles totales es del 50%, en cambio en este trabajo, en el extracto metanólico del propóleo de Michoacán, el contenido de fenoles totales fue mayor (620 mg EqAG/g) pero la proporción de flavonoides fue muy baja (10.64 mg EqQ/g) lo que corresponde a sólo el 1.7% del total de fenoles. Probablemente lo anterior se deba a la flora circundante a los apiarios, ya que,

como se mencionó antes, entre los propóleos existen grandes diferencias con respecto a la cantidad de flavonoides presentes y esto se atribuye en parte, a que las muestras son de distintas zonas geográficas.

De igual manera en un extracto metanólico de un propóleo de Chihuahua se obtuvo una concentración menor de fenoles totales 258 mg EAG/g, pero una concentración mayor de flavonoides de 135.41 mg EqQ/g en comparación con el presente trabajo (Vargas, 2017).

Por otra parte, en un estudio de actividad cicatrizante con un extracto etanólico de un propóleo de Chihuahua se encontró una concentración de fenoles de 314 mg EAG/g y de flavonoides de 62.58 mg EQ/g, siendo valores similares en cuanto a proporción con lo encontrado para el propóleo de Michoacán (Chávez, 2017).

De acuerdo con los parámetros establecidos por la NOM-003-SAG/GAN-2017, la cual sugiere un mínimo de 5% (peso/peso) para compuestos fenólicos y de 0.5% (peso/peso) para flavonoides, el extracto metanólico del propóleo de Michoacán sí cumple con los valores mínimos establecidos y se encuentra por arriba de estos, ya que tiene 62% de fenoles EqAG/g y 1.064% de flavonoides EqQ/g.

Para determinar los compuestos fenólicos presentes en los extractos, estos se analizaron mediante HPLC-DAD, se identificaron los flavonoides pinocembrina, acacetina y camferol, los cuales ya han sido reportados por presentar diversas propiedades como actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana. También ya han sido reportados dentro de los compuestos del propóleo; principalmente la pinocembrina, la cual es considerada como un componente común entre los propóleos y junto con el camferol se encuentran dentro de los

flavonoides más comunes tanto en plantas como en el propóleo, además de otros como lo son: apigenina, quercetina, galangina, crisina y hesperidina (Bedascarrasbure y col., 2004)

En el análisis por CG-EM para el extracto hexánico del propóleo, se identificaron 3 compuestos, siendo el más abundante el eicosano, seguido del heptacosano y hexacosano (Cuadro 2). Estos compuestos, Rodríguez (2013) los reporta como componentes químicos de la cera del propóleo, y también se reportan actividades biomédicas para estos; al eicosano se le ha atribuido actividad antibacteriana (Hsouna y col, 2011), el hexacosano y heptacosano poseen actividad antifúngica (Fethi y col, 2012), además para los tres hidrocarburos identificados en el propóleo de Michoacán, también se ha reportado actividad antioxidante (Marrufo y col, 2013).

Para complementar lo anterior, los tres extractos se analizaron por HPLC-MS, se encontraron presentes los flavonoides crisina, pinocembrina y naringenina en todas las muestras de propóleo, por otro lado, la acetina sólo se encontró el extracto clorofórmico y metanólico. (Cuadro 2, 3 y 4).

Los resultados coinciden con Vargas (2017) quien reporta que en el extracto metanólico de un propóleo de Chihuahua se determinó la presencia de pinocembrina y naringenina, ambas flavanonas, las cuales ya han sido reportadas por presentar propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas (Yan y col., 2014; González-Gallego y col., 2007).

De igual manera, Nava (2018) reporta la presencia de pinocembrina, acacetina y camferol en un propóleo de Chihuahua. Lugo-Sepúlveda y col., (2006) reportan a la pinocembrina como el principal componente de los propóleos Sonorenses.

Por otra parte, Robles (2018) analizó 40 muestras de propóleos mexicanos, donde reporta a la acacetina como el componente más abundante pues estuvo presente en las 40 muestras colectadas de propóleo, mientras que encontró la presencia de pinocembrina en sólo 28 muestras, sin embargo, la crisina estuvo ausente, en contraste con este trabajo, la crisina se encontró en los tres extractos del propóleo de Michoacán y se sabe tiene propiedades antioxidantes (Astudillo y col., 2000).

De acuerdo con los compuestos identificados en los extractos del propóleo de Michoacán y las diversas propiedades que poseen, estos pueden estar ejerciendo un mecanismo de acción durante la cicatrización, favoreciendo este proceso mediante la minimización de la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, también suprimen la producción de eicosanoides, además de alterar las membranas de las bacterias e inhibir su motilidad, evitando así, posibles infecciones en la herida y una inflamación exacerbada ayudando al sistema a reparar de una manera eficaz el tejido sin intervenir o inhibir en el proceso natural de este (Vargas-Sánchez y col., 2013).

Durante el proceso de cicatrización, principalmente en la fase inflamatoria, neutrófilos, macrófagos y otros tipos celulares producen especies reactivas de oxígeno (ERO) en el lecho de la herida, que actúan contra microorganismos invasores y regulan diversas vías de señalización celular necesarias para que ocurra el cierre de la herida, en concentraciones fisiológicas normales, las ERO juegan un rol importante en la regulación de las funciones celulares, sin embargo, elevadas

concentraciones de estas moléculas o un déficit en el sistema de defensa antioxidante, condición conocida como estrés oxidativo, puede causar serios daños a nivel celular lo cual afectan de forma negativa el proceso de cicatrización, manteniendo la fase inflamatoria de manera crónica (Auf dem Keller y col., 2006; Bickers y Athar, 2006; Roy y col., 2006; Sen y Roy, 2008; Sen, 2003; Soneja y col., 2005).

Para contrarrestar el estrés oxidativo existen compuestos químicos denominados antioxidantes, los cuales mediante una transición redox, a través de la cual la molécula antioxidante libera un radical de hidrógeno que puede ser captado por un radical libre, o que permite la formación de ligandos que facilitan la quelación de iones metálicos divalentes (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) y la interacción con enzimas (Vargas-Sánchez y col., 2013). Lo que impide el daño de moléculas biológicas al reaccionar más rápido con los radicales libres (Salinas, 2012).

Es sabido que los flavonoides actúan como antioxidantes gracias a su estructura, la cual está conformada por 2 anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de 3 átomos de carbono, la cual puede contener varias moléculas de OH como sustituyentes y que pueden donar su ión H^+ para neutralizar radicales libres (Bedascarrasbure y col., 2004), además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno. También inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A_2 ; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (Groot y Rauen 1998; Sudheesh y col., 1999).

Sabiendo que la actividad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos, se siguió en este estudio, con la evaluación de la capacidad antioxidante.

Se encontró que el extracto metanólico presentó la mejor capacidad antioxidante media (CA_{50}) con 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación con el extracto clorofórmico (1,195 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Cuadro 5). La elevada capacidad antioxidante del extracto metanólico muy probablemente se deba a que en él se encontró mayor contenido de fenoles y flavonoides totales.

En comparación con otros estudios, el extracto metanólico del propóleo de Michoacán presenta la mejor CA_{50} (13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) entre otros estudios de propóleo, ya que Vargas (2017) reportó que un extracto metanólico de un propóleo de Chihuahua presentó una CA_{50} de 412 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en otro extracto de un propóleo de Chihuahua la CA_{50} fue de 69.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Chávez, 2017), mientras que Nava (2018) encontró una CA_{50} de 15.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un extracto etanólico de un propóleo de Chihuahua.

Teniendo como antecedentes los resultados obtenidos hasta el momento, se continuó con la evaluación de la eficacia cicatrizante mediante el método tensiométrico, el extracto metanólico mostró la mayor eficacia de cicatrización (33%) en comparación con los demás grupos experimentales, los cuales mostraron valores similares que se encuentran por debajo del 20% de eficacia cicatrizante (Fig. 8), lo cual coincide con Azúa y Chumi en 2016 donde hallaron que un propóleo al 10% permite una regeneración tisular más rápida, con un tejido cicatrizal menor, libre de inflamación, infección y dolor en un alveolo dental después de una exodoncia, de igual manera Chávez (2017) y Nava (2018) evaluaron la actividad

cicatrizante de un propóleo de Chihuahua, reportando que a la concentración del 10% presenta una mejor actividad cicatrizante en comparación con el control positivo (Recoverón).

Ya que el extracto metanólico presentó la mayor eficacia cicatrizante, se hizo la evaluación a nivel histológico de este grupo. El grupo tratado con recoverón (control positivo) mostró tener mayor actividad ya que sus valores se asemejaron a los del grupo de piel sana. En comparación con los demás tratamientos, el grupo con recoverón presentó un cierre más rápido de la herida y la epidermis fue más delgada, similar a la del grupo de piel sana. En comparación con los demás grupos experimentales, también tuvo el mayor grosor de epidermis a hipodermis, reparando de una manera más rápida el tejido dañado (Fig. 11, 12 y 13 respectivamente). Cabe resaltar que el recoverón es un compuesto puro, el cual es un cicatrizante y regenerador tisular, que dentro de sus ingredientes contiene ácido acexámico, el cual participa en la acción proteica de la colágena, regulando la producción de fibroblastos y la disposición de las fibras colágenas (Ácidos, 2018).

Por otro lado, el extracto metanólico del propóleo, a pesar de mostrar diferencias significativas con el grupo de piel sana y recoverón en cuanto a la longitud de la herida, grosor de epidermis y grosor de epidermis a hipodermis, presenta valores por encima del grupo sin tratamiento, es decir, el propóleo sí favorece el proceso de cicatrización, además, contiene una mezcla de compuestos que probablemente actúan de manera sinérgica, al ser la mayoría de ellos antiinflamatorios es muy probable que esta fase se haya llevado a cabo de una manera más rápida, ya que, los flavonoides estabilizan la membrana de los lisosomas, lo que en otras palabras sería, evitar rotura y pérdida de líquidos a nivel celular, con lo que disminuye la

inflamación, permitiendo así, una proliferación de fibroblastos en un tiempo corto, los cuales contribuyen a un cierre de herida más eficiente(Díaz, 2001).

Respecto al conteo de fibroblastos activos (Fig.14), tanto el grupo tratado con propóleo como el tratado con recoverón presentaron valores por arriba del 20% y no mostraron diferencias significativas entre ellos, mientras que el grupo sin tratamiento presentó un valor menor y sí presentó diferencias significativas con estos dos grupos.

Lo anterior coincide con Chávez (2017) quien reporta que en un extracto etanólico de un propóleo de Chihuahua (10%) el número de fibroblastos tampoco presentó diferencias significativas con el control positivo.

Estos resultados pueden estar relacionados con las diferentes propiedades que se le atribuyen al propóleo, pues al contener flavonoides, éstos inhiben la síntesis de prostaglandinas y estimulan la síntesis de la lisina y prolina, éstas atraen a los leucocitos al punto de invasión por quimiotaxis e intervienen en la síntesis del colágeno donde se ha comprobado que los flavonoides favorecen su solubilidad y estabilidad así como la formación de muchos precursores de enlaces entre las fibrillas, lo que pudiera explicar la fortificación del tejido conectivo (Oamah y Mazza, 1996; Cartaya y Reynaldo, 2001), y por lo tanto, la buena eficacia cicatrizante del grupo tratado con propóleo (Fig. 8).

Por lo anterior, el grupo tratado con propóleo presentó mayor fuerza de cicatrización, pues la colágena es sintetizada por los fibroblastos, es la proteína más abundante en la piel y la encargada de brindar resistencia y fuerza a la herida (Prockop y Guzmán, 1981).

Dados los compuestos identificados en el propóleo de Michoacán y las actividades biomédicas reportadas para éstos, como la antibacteriana, antioxidante, antiinflamatoria y anestésica, es probable que el propóleo actúe de una manera integral en el proceso de cicatrización, primeramente evita alguna infección bacteriana, disminuye o neutraliza los radicales libres que se generen en la zona de la herida, evita también que se desencadene una inflamación crónica, además ayuda a que la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena se inicie más pronto, proporcionando una fuerza de cierre mayor en un periodo más corto de tiempo.

CONCLUSIONES

- El extracto clorofórmico y metanólico del propóleo de Michoacán presentan fenoles y flavonoides.
- El propóleo de Michoacán tiene dentro de sus componentes químicos: acetina, camferol, crisina, naringenina y pinocebrina, los cuales han sido reportados por presentar diversas propiedades biomédicas.
- El extracto metanólico del propóleo de Michoacán presentó la mejor capacidad antioxidante.
- El extracto metanólico del propóleo de Michoacán presentó la mejor eficacia cicatrizante.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. La piel (Pérez y Noriega, 2011).

La piel es un órgano de gran tamaño, el mayor del organismo, ya que tiene una superficie de alrededor de 2m² (depende de la altura y peso de la persona) y un peso de 4 kg, lo que supone aproximadamente el 6% del peso corporal total. Es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes del mismo tanto por tamaño como por sus funciones. La piel separa al organismo del medio externo y al mismo tiempo, permite su comunicación con el mismo, en las regiones donde se encuentran los orificios naturales del organismo, la piel se transforma paulatinamente en una mucosa. La piel sana es una barrera contra agresiones mecánicas, químicas, tóxicas, calor, frío, radiaciones ultravioletas y microorganismos patógenos. Además, es esencial para el mantenimiento del equilibrio de fluidos corporales, del equilibrio térmico y la transmisión de una gran cantidad de información externa que accede al organismo por el tacto, la presión, temperatura y receptores del dolor.

Desde afuera hacia dentro, se distinguen tres capas de tejido, cuyo origen embriológico es totalmente distinto:

- La epidermis.
- La dermis o corion.
- El tejido subcutáneo o también denominado hipodermis.

EPIDERMIS

Es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal. Es la capa de la piel con mayor número de células; presenta un espesor variable, con un valor medio de 0,1 mm hasta espesores de hasta 1 ó 2 mm como las plantas de los pies y las palmas de las manos. Está normalmente compuesta por cuatro capas diferentes que desde el exterior hacia el interior serían:

1. Capa córnea (estrato córneo).
2. Capa granular (estrato granuloso).
3. Capa de células espinosas (estrato espinoso).
4. Capa basal (estrato basal).

En aquellas zonas donde se presenta con un mayor grosor, la epidermis tiene cinco capas al contar con la capa lúcida (estrato lúcido), la cual está situada entre la capa córnea y la granular.

Los queratinocitos constituyen el 80% de las células epidérmicas, pero también se encuentran otros tipos celulares:

- a) Los melanocitos, que representan alrededor del 10% de las células epidérmicas y que son las células encargadas de la síntesis de melanina, pigmento que da color a la piel y protección frente a los rayos ultravioletas (UVA).
- b) Las células de Langerhans, que son células provenientes de la médula ósea, emigradas a la piel y que forman parte del sistema inmunitario.
- c) Las células de Merkel, son células sensoriales, situadas en el estrato basal y contactan con terminaciones de neuronas sensoriales para transmitir información de tacto.

DERMIS

Es la estructura de soporte de la piel y le proporciona resistencia y elasticidad. Está formada básicamente de tejido conectivo fibroelástico. La matriz extracelular contiene una elevada proporción de fibras de colágeno, no muy compactadas (>75%), elastina y reticulina. Es un tejido vascularizado que sirve de soporte y alimento a la epidermis. Constituye la mayor masa de la piel y su grosor máximo es de unos 5 mm.

Histológicamente, se divide en dos capas, que desde el exterior al interior son:

- La capa papilar (estrato papilar): Recibe ese nombre por la presencia de proyecciones hacia el interior de la epidermis, estas proyecciones se denominan papilas dérmicas y se alternan con los procesos interpapilares de la epidermis. En las papilas se encuentran las asas capilares (sistema circulatorio) que proporcionan los nutrientes a la epidermis avascular. La capa papilar también contiene numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos.
- La capa reticular (estrato reticular): Es más gruesa que la papilar, y recibe ese nombre por el entramado o retícula de las fibras colágenas que forman gruesos haces entrelazados con haces de fibras elásticas. Esta estructura es la que proporciona elasticidad y capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen.

Las células de la dermis son escasas y comprenden a los fibroblastos, macrófagos, mastocitos o células cebadas, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y monocitos. Los fibroblastos móviles se diferencian en fibrocitos, que se enlazan mediante elongación y forman un entramado tridimensional. Los fibroblastos

sintetizan y liberan los precursores del colágeno, elastina y proteoglicanos para construir la matriz extracelular.

El espacio libre entre los elementos celulares y fibrosos está relleno con un fluido gelatinoso en el que las células se pueden mover libremente. Es una sustancia amorfa compuesta principalmente por proteoglicanos (heteropolisacáridos y proteínas) que forman una materia pegajosa y gelatinosa, que no sólo sirve como elemento de unión entre el resto de los elementos tanto celular como fibrosos sino que influye en la migración, la cementación y la diferenciación celular.

TEJIDO SUBCUTÁNEO O HIPODERMIS

La dermis se integra con la capa de tejido subcutáneo no teniendo un límite definido. Esta capa está formada de tejido conectivo laxo y muchas de sus fibras se fijan a las de la dermis, formando franjas de anclaje. Si estas franjas de retención están poco desarrolladas, la piel se mueve en su sustrato formando plegamientos. Si están muy desarrolladas o son muy numerosas, como es el caso de la planta de los pies o del cuero cabelludo, la piel es casi inamovible.

El espesor de la hipodermis es muy variable dependiendo de la localización, el peso corporal, el sexo o la edad. Está formada por tejido adiposo por lo tanto sirve de almacén de energía, además de aislante térmico y de protector mecánico frente a golpes.

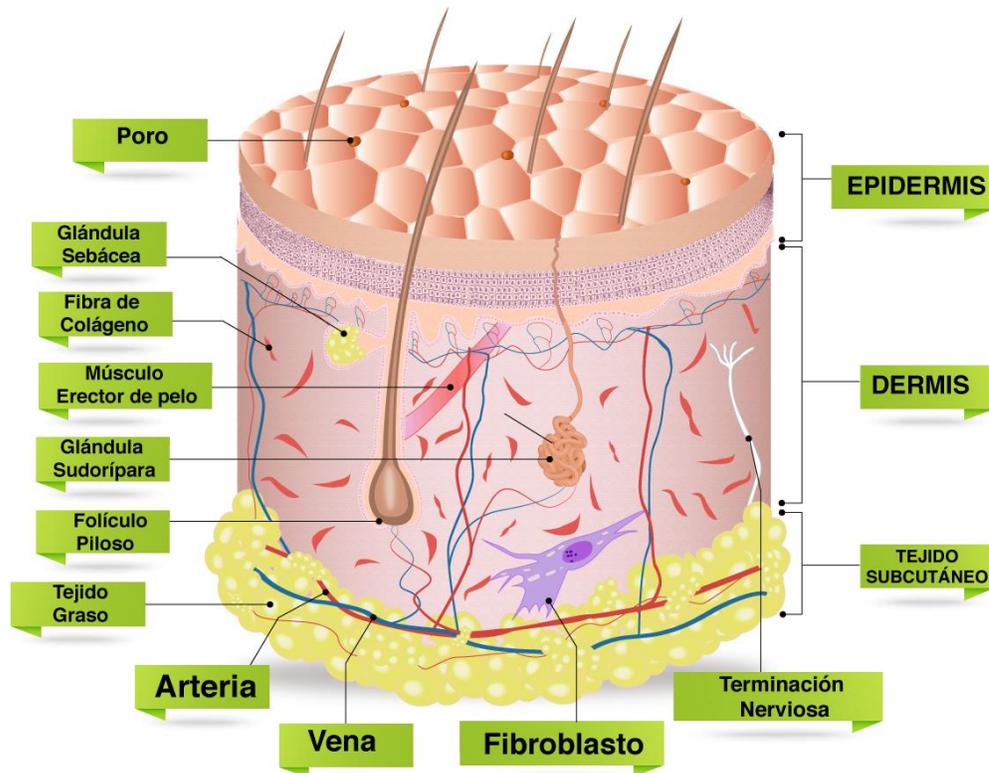


Figura 15. Organización morfológica de la piel. Imagen original (D. G. Hernández-Hernández P.).

APÉNDICE 2. El propóleo (Pérez y Jimeno, 1987).

El propóleo es una sustancia resinosa, balsámica, de color verde pardo, castaño o incluso casi negro (dependiendo de su origen botánico), sabor acre, frecuentemente amargo, y olor agradable y dulce, de forma que, cuando se quema, exhala una fragancia de resinas aromáticas. El propóleo es recolectado por abejas de más de quince días que, con sus mandíbulas, toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas: álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, pino y algunas herbáceas. Tras sujetar la partícula resinosa, la abeja mueve hacia atrás la cabeza hasta que logra desprenderla, almacenándola con sus patas

en los cestillos del polen. Los enzimas de su boca participan también en la operación para evitar su adherencia. Cuando llega a la colmena con la carga, otras obreras le ayudan a descargar el propóleo, misión que llega a durar varias horas. Si el material no es bastante maleable, la abeja recolectora se instala en la piquera, donde espera a que el calor del sol ablande la carga y pueda desprenderse mejor de ella.

Composición, básicamente está constituido por:

Resinas y bálsamos 50-60%.

Ceras 30-40%.

Aceites esenciales y aromáticos 7-10%.

Polen 5%.

Sustancias minerales y microelementos Pb, Ni, Ag, Fe, Zn.

Vitaminas: provitamina A y algunas vitaminas del grupo B

Las abejas emplean el propóleo principalmente para tapar las fisuras de la colmena, otra finalidad es la de embalsamar a algún animal muerto en el interior de la colmena (en ocasiones se han encontrado perfectamente embalsamados ratones, lagartos e incluso serpientes).

La cantidad media que se puede producir por colmena y año oscila entre los 150 y los 300 gramos. Las abejas propolizan durante todo el año, pero el apicultor deberá recolectar el propóleo pasado el invierno.

Técnicas de recogida

Mediante la espátula se desprende el propóleo de aquellas zonas donde se encuentra adherido: ángulos, marcos, piezas metálicas, piquera. No se recomienda

para ello la utilización del cuchillo, ya que pueden desprenderse astillas de madera, con lo que se obtendría un propóleos con muchas impurezas.

Otra forma de recogida consiste en colocar sobre los cuadros de la colmena una parrilla de plástico o una lámina metálica perforada, que, rápidamente, será propolizada por las abejas, siendo el propóleos fácilmente obtenido mediante raspado.

Otro procedimiento consiste en colocar una lona encima de los cuadros formando pliegues. Todas las superficies quedan propolizadas por las abejas. Este procedimiento tiene la ventaja de que se puede obtener un propóleos más puro.

APÉNDICE 3. Método Tensiométrico (Vaisberg, 1989).

El método tensiométrico se utiliza para evaluar la fuerza de cierre en el proceso de cicatrización, mediante la resistencia que presente la cicatriz al colocarle un contrapeso. En este caso se utilizó la técnica de flujo de agua con ayuda de un dispensador de agua de garrafón al centro, conectado mediante mangueras a un recipiente de cada lado, donde cae el agua. Se sujeta la piel de ratón con pinzas Halsted a aproximadamente 3 mm de la cicatriz de cada lado, estas pinzas están atadas a una piola que está sujeta a los recipientes de agua. Se permite el flujo de agua hasta notar que la cicatriz comienza a abrirse, se toma el volumen del agua que cae en los recipientes, convirtiendo la unidad de volumen en gramos.

La fuerza de cicatrización se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia de cicatrización (\%)} = \frac{GC}{GS} * 100$$

Donde

GC = gramos en que abre la piel cicatrizada.

GS = gramos para abrir la piel sana.

Se grafican las medias con su desviación estándar y para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos experimentales, se aplicó un ANOVA de un factor con un nivel de significancia del 0.5%.

APÉNDICE 4. Técnica histológica (Montalvo, 2010).

Conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios.

Toma de la muestra: Obtener las muestras de piel del área lesionada de los ratones.

Fijación: Detener la vida de las células e impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir la célula (procesos autolíticos), manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos. Esto se consigue inmovilizando (por coagulación o precipitación) las moléculas proteínicas e inhibiendo principalmente las enzimáticas haciéndolas insolubles. Esta acción garantiza la integridad de las células y tejidos; se efectúa por mediante agentes químicos.

Una vez que se obtienen las muestras de piel, se colocan en formol al 4% durante 24 horas. El formol ejerce su acción fijadora coagulando las proteínas. Posee un buen poder de penetración y difusión. Mantiene de manera adecuada la estructura y facilita la coloración posterior de los componentes celulares y tisulares. Endurece bien las muestras. Conserva bastante bien a las grasas.

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

		Tiempo	
		Mínimo	Máximo
Sumergir en alcohol:	Etílico 70%	2 horas	2-5 días
	Etílico 80%	2 horas	2-3 días
	Etílico 90%	2 horas	2-3 días
	Etílico 100%	1 hora	2 horas

Aclaración: Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto; pero la parafina tampoco es soluble en alcohol por lo que es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente, de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina. Sumergir en:

Butanol I 2 horas

Butanol II 2 horas

Infiltración: Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. La penetración de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando ésta se encuentre en estado líquido. Se clasifican en:

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

Semiduras: Sus puntos de fusión son de 54°C – 58°C. Es la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza técnica histológica. De acuerdo con la temperatura del medio, se recomienda su uso pues se pueden obtener secciones de 5 a 7 de μm .

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

Colocar las muestras en:

Parafina I 24 horas

Parafina II 24 horas

Formación de bloques de parafina

Una vez que las muestras permanecen 24 horas en parafina II, son puestos en moldes cuadrados para formar los cubos de parafina. Estos moldes se llenan con parafina de inclusión, la cual se funde previamente utilizando un horno a una temperatura de 50°C, la parafina al enfriarse se solidifica y permite que los cubos sean cortados en el micrótopo.

Microtomía: En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes.

Antes de cortar el bloque de parafina, este se coloca en el congelador durante 20 minutos aproximadamente. Posteriormente se coloca en el micrótopo y se obtienen los cortes con un grosor de 5 micrómetros.

APÉNDICE 5. Tinción con Hematoxilina – Eosina (Montalvo, 2010).

Tinción: El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora.

La coloración de Hematoxilina - Eosina (H&E) consiste en la tinción de:

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

b) el citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado.

Lo primero que se lleva a cabo es desparafinar las muestras en el horno durante 3 horas aproximadamente. Posteriormente se procede a hacer el tren de tinción:

Desparafinar:

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: 10 minutos

Hidratar:

Alcohol 100%: 10 lavados

Alcohol 90%: 10 lavados

Alcohol 80%: 10 lavados

Alcohol 70%: 10 lavados

Agua corriente: 10 lavados

Colorear:

Hematoxilina: 5 minutos

Agua corriente: 10 lavados

Alcohol ácido: 1 lavado

Agua corriente: 10 lavados

Carbonato de litio: Sumergir los cortes hasta que vire el color

Agua corriente: 1 lavado

Alcohol 100% 10 lavados

Eosina: 7 minutos

Deshidratar:

Alcohol 70%: 10 lavados

Alcohol 80%: 10 lavados

Alcohol 90%: 10 lavados

Alcohol 100%: 10 lavados

Aclarar:

Xilol I: 10 lavados

Xilol II: Dejar ahí las muestras hasta que sean montadas

Montaje: consiste en colocar encima del corte coloreado una gota de una sustancia adherente, diluida, generalmente en xilol (resina natural como el bálsamo de Canadá cuyo índice de refracción es similar a los del vidrio) y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina.

APÉNDICE 6. Fibroblastos (Acosta, 2006)

El fibroblasto es una célula dinámica, la cual ejerce funciones tisulares a nivel local y del sistema inmune; son las células fijas más abundantes del tejido conjuntivo, se originan a partir de las células mesenquimatosas indiferenciadas. Dentro de sus principales funciones se encuentra:

- La formación de fibras del tejido conectivo denominadas colágeno y elastina.
- Producción y mantenimiento de la sustancia fundamental en la cual sus productos fibrosos son embebidos.
- Capacidad de sintetizar y fagocitar el colágeno y los componentes de la matriz extracelular en procesos de remodelación del tejido conectivo.
- Producción de citoquinas con la capacidad de promover la destrucción tisular y estimular la reabsorción ósea mediada por osteoclastos.

ESTRUCTURA DEL FIBROBLASTO

Bajo el microscopio de luz, los fibroblastos son normalmente reconocidos en asociación con agrupaciones de fibras colágenas. En reposo (ej. en tendones), en cortes coloreados con hematoxilina-eosina, éstos se presentan como células ahusadas, con finas prolongaciones, núcleo oval cerrado, algo achatado (Figura 19). El citoplasma de los fibroblastos es basófilo, mientras que el de los fibrocitos (fibroblastos en reposo) es eosinófilo, al igual que las fibras colágenas que los rodean, lo cual dificulta la diferenciación de los cuerpos celulares con respecto a las fibras; debido a esto, la mayoría de las veces sólo podemos observar los núcleos.

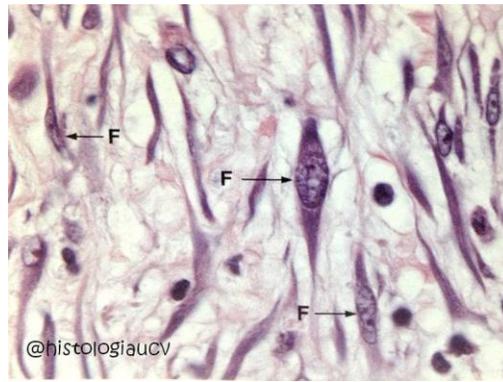


Figura 16. Fibroblastos activos. F: fibroblastos.

LITERATURA CITADA

- Ácidos.info. Ácido acexámico, conoce sus propiedades, usos y beneficios. 2018. Consultado de <https://acidos.info/acexamico/>
- Acosta, G. A. 2006. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas odontológicas*. 25(57): 26-33.
- Agaiby, A. y Dyson, M. 1999. Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. *Journal of Anatomy*. 195: 531 – 542.
- Astudillo, S., Avila R., Morrison F., Gutierrez M., Bastida J., Codina C., y Schmeda-Hirschmann G. 2000. Biologically active compounds from Chilean propolis. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 45:577-581.
- Auf dem Keller, U., Kümin, A., Braun, S. & Werner, S. 2006. Reactive Oxygen Species and Their Detoxification in Healing Skin Wounds. *Journal Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 11(1): 106-111.
- Azúa, C. y Chumi, E. 2016. Eficacia del Propóleo al 10% en la cicatrización del alvéolo dental post exodoncia. *Acta odontológica Venezolana*. 53 (3):
- Bankova, V. 2009. Review: chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1(2): 23–28.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L. y Álvarez, A., 2001. Propóleos: un valioso producto de la colmena. Horizonte agroalimentario. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Agricultura y Pesca, República Argentina.

- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A y Rodríguez, E. 2004. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleos Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 23(3): 369-72.
- Benavides, J. 2008. Reparación de heridas cutáneas. *Revista de la Asociación Colombiana dermatológica y cirugía dermatológica*. (16)1: 29 – 35.
- Benavides, W.S., Brizuela, H.P y Rivas, O.M. 2016. Efecto de extracto etílico de propóleo de abeja melífera (*Apis mellifera scutellata*) como alternativa natural en el proceso de cicatrización de heridas en cabras raza Saanen. Universidad de El Salvador, El Salvador. (Tesis de Licenciatura).
- Bickers, D. R. y Athar, M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 126(12): 2565-2575.
- Bradley, U., Cullum, N., Nelson, E.A. 1999. Systematic reviews of wound care management dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. *Health technology assessment*. 3:1-18.
- Cartaya, O. y Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22(2): 5-14.
- Castrillón, R.L., Palma R.A y Padilla D.C. 2008. La función inmunológica de la piel. *Dermatología Revista Mexicana*. 52(5): 211-224.
- Chaillou, L.L., Herrera, H.A. y Maidana, J.F. 2004. Estudio del propóleos de Santiago del estero, Argentina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24(1): 011-015.
- Chávez, I. 2017. Actividad cicatrizante del propóleo de Chihuahua. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Tlalnepantla, Estado de México. (Tesis de Licenciatura).
- Cheng, H., Zhang, L., Liang, YY., Hsu, Y., Lee, J., Liaw, C., Hwang, Y. y Kup, H. 2013. Antiinflammatory and Antioxidant Flavonoids and Phenols from

Cardiospermum halicacabum (Dào Dì Líng). *Journal Traditional Complement Medicine*. 3(1):33-40.

- Delgado M., Ortega J., Ramírez C. 2015. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 6(28): 74-87.
- Diario Oficial de la Federación. ACDO.SA2.HCT.010611/155.P.DF. 2011. México.
- Díaz, J. 2001. Apiterapia hoy en Argentina y Cuba. Estación Experimental Apícola. Municipio La Lisa – La Habana – Cuba.
- Falanga, V. 2004. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 32:88-94.
- Faraa, M. y Tahara, S. 1999. Fungal metabolism of flavonoids and related phytoalexins. *Phytochemistry*. (2): 1-33.
- Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A. Regeat, F. y Remesy, C. 2000. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *American Journal Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 279 (6): 1148-1154.
- Fernley, J. 2001. Bee propolis natural Ealing from the hive. London, souvenir Press.
- Fethi, K., Mohamed M., Samia, M., Karima, S., Ahmed H. y Zine, M. 2012. Chemical composition, *in vitro* antifungal and antioxidant activities of essential oil from *Cotula coronopifolia* L. growing in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research*. 6 (20), pp. 4388-4395,

- González-Gallego, J.; Sánchez-Campos, S. y Tuñón, M. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*. 22: 287-293.
- Groot, H. y Rauen, U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 3: 249-55.
- Guarín-Corredor, C., Quiroga-Santamaría, P y Landínez-Parra, N.S. 2013. Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. *Revista de la Facultad de Medicina*. 61(4): 11.
- Hsouna, A., Trigui, M., Mansour, R., Jarraya, R., Damak, M. y Jaoua, S. 2011. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. 148(1). 66-72.
- Julkunen-Tiito, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33 (2): 213-217.
- Kumar, N., Anmad, K.K.M., Dang, R. y Husain, A. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2(12): 361-364.
- Kuwahara, RT. y Raspberry, R. 2007. Chemical peels. Emedicine.com. Accessed September 15,2007.
- Ledón, N., Casacó A., González, R., Merino, N., González, A. y Tolón, Z. 1997. Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propóleo rojo colectado en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. 30(1).

- Li, J., Chen, J. y Kirsner R. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 25: 9 – 18.
- Londoño, O.A., Penieres, C. J., García, T.C., Carillo, M.L., Quintero, M.M., García, V.S., Mendoza, S.M y Cruz, S.T. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en marcha*. (21)1: 49-55.
- Lugo-Sepúlveda, E., Gooycolea, F., Hernández, J., y Velásquez, C. 2006. Pinocembrina: Principal componente químico de propóleos Sonorenses. *Invurnus* 1(2): 68-83.
- Martín, A. 2005. Patología quirúrgica. Madrid, España: GEA Consultoría Editorial S.L.L.
- Marrufo, T., Nazzaro F., Mancini E., Fratianni, F., Coppola, R., De Martino, L., Agostinho, A. y De Feo, V. 2013. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Mozambique. *Molecules*. 18(9). 10989-10999.
- Montalvo, C. 2010. Técnica histológica. Consultado el 23/04/2018 de http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recurso%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
- Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante «*in vitro*» de las bebidas de frutas. Rev Tecnol. Alfa Editores Técnicos. 27 pp.
- Nava, A. 2018. Propiedades biológicas del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua en un modelo de cicatrización. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Estado de México, México. (Tesis de Licenciatura).
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.
- Oamah, B. D. y Mazza, G. 1996. Flavonoids and antioxidative activities in Buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(7): 1746-1750.
- Pérez, C. y Jimeno, M. 1987. El propóleos de las abejas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.
- Pérez, J. y Noriega, M. 2011. Fisiología General. La piel: estructura y funciones. Universidad de Cantabria. España.
- Prockop, D. y Guzmán, N. 1981. El colágeno. *Tiempos médicos*. 191: 53-63.
- Quintero-Mora, M., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayosso, P., López-Martínez, R., Soto-Zárate, C., Carrillo-Miranda, L., Penieres-Carrillo, G., García-Tovar, C., y Cruz-Sánchez, T. 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25: 22-26.
- Ramamoorthy, K. y Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2: 70-80.
- Ramírez, H.G.A. 2010. Fisiología de la cicatrización cutánea. *Dermatología*. 2(2): 69-78.
- Robles, S. 2018. Caracterización química de propóleos Mexicanos por HPLC-DAD-UV-ESI-MS. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de química. Ciudad de México. (Tesis de Maestría).
- Rodríguez, B. 2013. Usos terapéuticos del propóleo de acuerdo con su composición química. Periodismo científico y temas de educación.

Consultado de <https://anamorin.wordpress.com/2013/06/26/usos-terapeuticos-del-propoleo-de-acuerdo-con-su-composicion-quimica/>

- Roy, S. Khanna, S., Nallu, K., Hunt, T. K. y Sen, C. K. 2006. Dermal wound healing is subject to redox control. *Molecular Therapy*. 13(1): 211–220.
- Salinas, R. 2012. Estudio comparativo de la actividad antioxidante y de la composición en compuestos fenólicos de propóleos de la región metropolitana de Santiago, Chile. Universidad de Chile, facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. (Tesis de Licenciatura).
- Scherer, R. and Teixeira, H. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 112: 654-658.
- Secretaria de Salud. 2018. Modelo de atención clínica de heridas. Ciudad de México, México. Edición digital.
- Sen, C. K. 2003. The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 11: 431–438.
- Sen, C. K. y Roy, S. 2008. Redox signals in wound healing. *Biochimical et Biophysica Acta*, 1780(11): 1348–1361.
- Simental, F.L. 2014. Actividad cicatrizante del aceite extraído de la corteza de *Caesalpinia coriaria* en ratas. Universidad Juárez del Estado de Durango.
- Singleton, L. y Rosi, J. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158;
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin - Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.

- Soneja A., Drews M. y Malinski T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative in wound healing. *Pharmacological Reports*. 57: 108-119.
- Stangaciu S. 1998. Composición y propiedades del propóleos. *Apiacta*. 33: 71-77.
- Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. 1999. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytotherapy Research*. 13: 393-396.
- Vaisberg A.J. 1989. Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lecheri*. *Planta medica*. 55(02): 140-143.
- Vargas L.E. 2017. Actividad antimicrobiana del extracto metanólico de un propóleo de Chihuahua. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. (Tesis de Licenciatura).
- Vargas-Sánchez, R., Torrescano-Urrutia, G., Mendoza-Wilson, A., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez-Escalante, J., Peñalba-Garmendia, M. y Sánchez-Escalante, A. 2013. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y Antibacteriana del propóleos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. XVI (1): 32-37.
- Velnar T, Baley T, Smrkolj V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 37:1528-42.
- Watson, T. 2009. Electroterapia: práctica basada en la evidencia. 12 Ed. Barcelona: S.A Elsevier, España.
- Yan, B., Cao G., Sun, T., Zhao, X., Hu, X., Yan, J., Peng, Y., Shi, A., Li, Y., Xue, W., Li, M., Li, K. y Liu, Y. 2014. Determination of pinocembrin in human plasma by solid-phase extraction and LC/MS/MS: application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*. 28 (12): 1601-1606.

- Zeghad, M. y Merghem, R. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris*. *Journal of applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 1: 5-11