



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Evaluación de la actividad cicatrizante de un extracto acuoso de
***Helietta parvifolia* en lesiones expuestas de ratones CD1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARTÍNEZ RÍOS JACOBO

Director de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor de tesis: MC. Maurilio Flores Pimentel

MÉXICO, D. F. 2011

Agradecimiento al proyecto PE-200310 PAPIME, DGAPA UNAM



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 mi familia que siempre ha estado ahí para apoyarme a pesar de las adversidades, y sin quienes nada de esto sería posible.

A la UNAM por ser mi segunda casa, y en ocasiones la primera, por extender los horizontes de mi pensamiento y de mi persona.

A mi director de tesis Dr. Rubén Marroquín Segura por transmitirme sus conocimientos y por ser tan paciente para con mi persona.

A mis sinodales Mtra. Yolanda Flores Cabrera, MC Maurilio Flores Pimentel, Dr. Arturo Valle Mendiola y M. en C. Juana Rosado Pérez por su paciencia y colaboración sin las cuales este trabajo no hubiese sido posible.

A mis amigos, Arell por tu siempre agradable compañía y por ser más que una compañera, como una hermana, Martha por tus atinados consejos y mostrarme que hay todo un mundo más allá del raciocinio, y por último y no por eso menos importante gracias a Alejandro Aguilera, Gerardo, Jessica, Esteban Espinoza, Claudia, Andrés, Jennifer, Victoria y Alicia por hacer de mi estancia en la FES algo muy agradable con su invaluable amistad y agradable compañía.

"Es preciso saber lo que se quiere; hay que tener el valor de decirlo
y cuando se dice, es menester tener el coraje de hacerlo"

George Clemenceau

CONTENIDO

I.	RESUMEN	3
II.	INTRODUCCIÓN	4
III.	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	5
III.1.	<i>Helietta parvifolia</i>	5
III.2.	Cicatrización	6
III.3.	Eventos moleculares durante la migración de los queratocitos.....	8
III.4.	Las integrinas y la matriz extracelular (MEC)	8
III.5.	La migración de los queratinocitos	9
III.6.	Factores de crecimiento y receptores asociados	10
III.7.	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	11
III.8.	Factor de crecimiento epidérmico (Epidermic Grow Factor-EGF).....	12
III.9.	El factor de crecimiento transformante beta (Transforming Grow Factor-TGF β).....	12
III.10.	Proteína estimuladora de macrófagos (Macrophage Stimulating Protein MSP.....	13
III.11.	El sinergismo MSP/TGF β 1	14
III.12.	Metaloproteínas de la matriz (MMPs)	14
III.13.	Proliferación de los queratinocitos en el sitio de la lesión	15
III.14.	Punto final de la reepitelización	16
III.15.	Uso de las plantas para mejorar la cicatrización	17
IV.	FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS	18
IV.1.	Importancia de los estudios de cicatrización en animales.....	18
IV.2.	Técnicas histológicas	19
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
VI.	OBJETIVOS.....	21
VII.	HIPÓTESIS.....	22
VIII.	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	23
IX.	REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL.....	24
X.	MÉTODOS.....	25
X.1.	Preparación del extracto acuoso de <i>Helietta parvifolia</i>	25
X.2.	Preparación de la crema 1% de <i>Helietta parvifolia</i>	25

X.3. Animales de estudio	25
X.4. Elaboración de las excisiones	25
X.5. Modelo de cicatrización	26
X.6. Sacrificio de los animales	26
X.7. Cortes histológicos	27
X.8. Análisis estadístico	27
XI. DIAGRAMA DE FLUJO	28
XII. RESULTADOS	29
XII.1. Apariencia de las lesiones durante el estudio	311
XII.2. Cortes Histológicos	334
XIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
XIV. CONCLUSIONES	43
XV. PERSPECTIVAS	444
XVI. REFERENCIAS	455

I. RESUMEN

Antecedentes: Se estima que alrededor de 6 millones de personas en el mundo sufren anualmente de lesiones con mala cicatrización, el costo para subsanar los tratamientos ascienden a billones de dólares, la investigación de agentes cicatrizantes es una de las áreas que más desarrollo ha tenido en los últimos años, la curación de heridas de forma tradicional a través del uso de plantas se lleva a cabo en todo el mundo principalmente en países como India y China, algunas de las plantas utilizadas son evaluadas en diferentes modelos animales y en lesiones humanas, pero el gran potencial de las plantas está aún inexplorado.

En Tamaulipas la corteza de *Helietta parvifolia* es administrada a los caballos de forma empírica como un antiinflamatorio y como adyuvante en el tratamiento de lesiones; la actividad antiinflamatoria se ha comprobado experimentalmente pero no se ha evaluado su actividad cicatrizante.

Objetivo: Evaluar la actividad cicatrizante de un extracto acuoso de *Helietta parvifolia* en lesiones expuestas de ratones CD 1.

Metodología: Se evaluó el efecto cicatrizante de un extracto acuoso de *Helietta parvifolia*, induciendo lesiones expuestas con un sacabocado de un centímetro de diámetro en el área interescapular de ratones CD 1, de un mes de edad de entre 25 y 30 g de peso, divididos en tres grupos de seis ratones cada uno; se evaluó la actividad cicatrizante causada por administración tópica de una crema al 1% de *Helietta parvifolia* (planta de estudio), Madecassol (*Centella asiática* como control positivo) y Vaselina (control negativo), por un período de 13 días.

Se determinaron los diámetros de las lesiones al final del estudio, y se realizaron cortes histológicos para su posterior análisis histopatológico.

Resultados: La cicatrización de las lesiones se vio significativamente acelerada al administrar la crema al 1% de extracto de *Helietta parvifolia* por un período de 13 días. En el diámetro de cicatrización se encontró diferencia significativa en el grupo tratado con *Helietta parvifolia* a partir de la interpretación del estudio estadístico ANCOVA con una significancia de 90%, que demuestra que el extracto mejora notablemente el proceso de cicatrización, los cortes histológicos indican que hubo una reepitelización más efectiva en el grupo tratado, comparado con el grupo control negativo y el grupo control positivo (a los que se les administró vaselina y Madecassol respectivamente por un período de 13 días), mediante la observación macroscópica se detectó que en los ratones tratados con el extracto hubo mayor formación de tejido de granulación.

Conclusión: Los datos experimentales obtenidos demuestran que *Helietta parvifolia* mejora notablemente el proceso de cicatrización apoyándose así nuestra hipótesis.

II. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas para el tratamiento de diferentes patologías está ampliamente difundido alrededor de todo el mundo, debido a que es una alternativa barata, efectiva y de fácil acceso, además de que las reacciones alérgicas son poco frecuentes y no presenta los efectos adversos que el uso de fármacos conlleva. Pero el poder curativo de las plantas no siempre es corroborado, la mayoría de las ocasiones se les atribuye cierta actividad sólo por testimonios, cuando puede no tener ningún efecto e incluso poner en riesgo la salud de las personas, lo que hace necesario un estudio de valoración de actividad farmacológica.

Diferentes extractos han demostrado ser útiles en el tratamiento de lesiones, con fines cicatrizantes como es el caso del Aloe vera y la Centella asiática, aunque el poder curativo de las plantas en su mayoría sigue inexplorado.¹

La corteza de *Heliopsis parvifolia* es administrada a los caballos sobre lesiones abiertas como un antiinflamatorio y para mejorar el proceso de cicatrización, ya se ha estudiado la actividad antiinflamatoria en un modelo de inflamación en ratones CD1 en cojinete plantar con resultados positivos, pero su actividad cicatrizante no ha quedado evidenciada, lo que hace necesario un estudio para evaluar dicha actividad.²

Con el objetivo de evaluar la capacidad cicatrizante de la *Heliopsis parvifolia* se utilizó un modelo en ratón CD 1. De esta forma al inducir las lesiones expuestas se logró monitorear el efecto cicatrizante sobre las mismas por un período de 13 días, al cabo del cual se sacrificaron los animales conforme a los lineamientos de la NOM-062-ZOO-199. Se determinó la calidad del tejido recién formado mediante la observación de la morfología microscópica (cantidad de infiltrado, formación de fibras de colágeno y reordenamiento de tejido recién formado), mostrada en los cortes histológicos.^{2,3}

Es importante considerar que para que una nueva alternativa terapéutica sea llevada a su aplicación clínica se deben de descartar reacciones alérgicas y efectos adversos que pueda ocasionar a la salud.

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Muchas de las plantas medicinales fueron descubiertas por la gente de tiempos ancestrales, las civilizaciones antiguas dejaron variados escritos donde dejaron manifiesto del poder curativo de muchas plantas, en Egipto se han encontrado escritos de esta naturaleza que datan del 300 a. C.¹

Las plantas pueden ser usadas para muy variadas funciones, pueden remover toxinas del cuerpo, tienen poder antiséptico. El mecanismo de acción de las plantas varía con la sustancia que tenga la actividad farmacológica, debido a que una planta contiene numerosos compuestos es difícil dilucidar que compuesto es el responsable del efecto deseado.²

Las plantas contienen variadas sustancias químicas, estas sustancias son almacenadas en varias partes de la planta, en las hojas, en los frutos, en la corteza, etc. El potencial curativo de las plantas es muy amplio y por ende deben ser consideradas para el tratamiento de enfermedades.

En la antigüedad el hombre usaba las plantas para el tratamiento de diferentes patologías, y experimentaba con algunas otras para observar su efecto en la salud humana, esto mediante ensayo y error, muchas de las plantas descubiertas en la antigüedad con actividad medicinal siguen siendo usadas hasta la fecha, las civilizaciones antiguas dejaron testimonio de esto en diferentes escritos.³

III.1. *Helietta parvifolia*

El uso de la medicina tradicional está muy difundido en la población mexicana. *Helietta parvifolia* es una planta que se encuentra distribuida en el norte del país, principalmente en los estados de Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí e Hidalgo, es una planta xerófila que crece a 1500-1700 m del nivel del mar principalmente en los lomeríos de la Sierra Madre Oriental, es un árbol pequeño sin espinas conocido comúnmente como “barreta”, alcanza ocho metros de altura, la corteza es lisa de coloración café. Las hojas son opuestas, trifoliadas, de 35-55 mm de largo, en su mayoría glabras, las flores son pequeñas de 2 mm de ancho, con tres o cuatro pétalos ovalados, ampliamente elípticos de hasta 3 mm de largo, los frutos son de 10-15 mm de largo, con semillas solitarias, la especie florece y fructifica de mayo a septiembre, en base a la presencia de lluvias.⁴

En Tamaulipas, la corteza de *Helietta parvifolia* es administrada a los caballos de forma empírica como un antiinflamatorio y como adyuvante en el tratamiento de lesiones; la actividad antiinflamatoria se ha comprobado experimentalmente como lo muestra un estudio realizado en cojinete plantar de ratones CD1 con resultados positivos, debido a que se administra sobre lesiones expuestas se hace necesaria la evaluación de su actividad cicatrizante.¹

Helietta parvifolia tiene constituyentes como la kokusaginina, heliparvifolina, flindersiamina y isoflindersiamina (principalmente en las hojas y en corteza), eugenol, O-metileugenol, isosafrol y safrol en el aceite esencial de hojas y ramas.^{4,5}

III.2. Cicatrización

La cicatrización se define como un proceso complejo, altamente coordinado, encaminado a la reparación y recuperación de la integridad de tejido, que requiere de la colaboración de diferentes tejidos, linajes celulares, fases de proliferación, factores de crecimiento, y demás condiciones que actuando de manera conjunta devuelven la inocuidad al tejido lesionado.^{6,7}

La reepitelización es crucial en la cicatrización de heridas, incluye la migración y proliferación de queratinocitos, para cubrir las superficies cutáneas desnudas. Mediante el estudio de este proceso se han aclarado las vías moleculares que regulan la reepitelización, que abre una nueva perspectiva para el desarrollo de mejores dianas terapéuticas.

La piel se compone de dos capas de tejido bien definidas: una capa llamada epidermis estratificada queratinizada y una capa gruesa subyacente rica en colágeno (dermis) como apoyo del tejido conjuntivo que además proporciona nutrientes. Debido a que la piel sirve como una barrera contra el mundo exterior, una ruptura en ella debe ser reparada de manera rápida y eficiente. Una reparación temporal se logra en la forma de un coágulo que tapa el defecto, y días después se toman las medidas necesarias para la reparación permanente del tejido.

En la fase inicial de éste proceso células de la inflamación y fibroblastos invaden el coágulo para formar una granulación contráctil, que intentará mantener los márgenes de la herida juntos (Figura1). A partir de éste momento se activarán diferentes linajes celulares encaminados a reconstituir una nueva matriz dentro del hueco de la herida; en esta etapa se pondrán en funcionamiento múltiples señales de activación e inactivación de actividades celulares encaminadas al saneamiento de la herida.^{1,6,8}

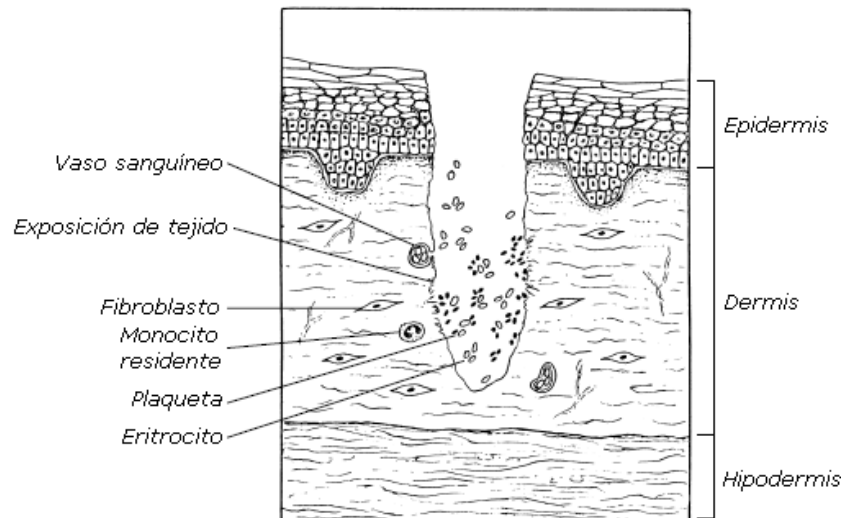


Figura III.2.1. Inmediatamente después de la lesión, se estimula la homeostasis vía degranulación de plaquetas y exposición de componentes tromboplásticos del tejido.⁷

La mayoría de las heridas se curan normalmente entre una y dos semanas, pero a veces el tejido no es enteramente funcional, lo cual justifica realizar estudios para averiguar cómo se puede inducir una reparación del daño de una manera más perfecta y funcional.

La mayoría de las heridas causan fuga de sangre a través de los vasos sanguíneos dañados, la formación del coágulo sirve entonces como escudo provisional y como una matriz por la cual las células podrán migrar durante el proceso de reparación, el coágulo se compone principalmente por plaquetas incrustadas en una malla de fibrina. Las plaquetas al degranularse liberarán citoquinas que iniciaran la llamada respuesta angiogénica, la migración de células circulantes al sitio de la lesión, iniciándose así la reepitelización. Durante éste proceso se expresan selectinas de adhesión en la luz de los vasos sanguíneos, que facilitan la adherencia y diapédesis de leucocitos circulantes a través del espacio endotelial (Figura 2).⁷

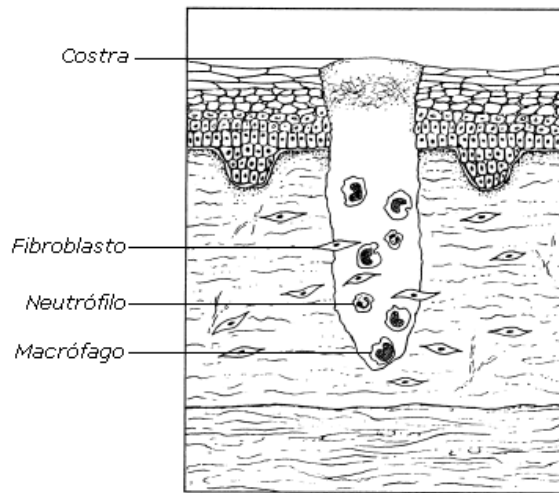


Figura III.2.2. Después de 2 o 3 días las células predominantes en el sitio de la lesión son los macrófagos, que limpian el sitio de la lesión y regulan el proceso de reparación mediante la secreción de factores de crecimiento.⁷

Los neutrófilos normalmente empiezan a llegar al sitio de la lesión en cuestión de minutos, se consideraba que su papel se limitaba sólo a limpiar el sitio afectado de bacterias contaminantes, aunque estudios recientes demuestran que los neutrófilos son también una fuente de citoquinas pro-inflamatorias que probablemente son algunas de las primeras señales para activar los fibroblastos locales y los queratinocitos (Figura3). A menos que una herida este gravemente infectada el infiltrado de neutrófilos se agota después de unos días, ocasionando así un acumulamiento de macrófagos y reclutamiento de monocitos, lo cual es esencial para una eficiente cicatrización ya que secretan una serie de factores de crecimiento y citocinas que amplifican todas las señales anteriores.^{6,9}

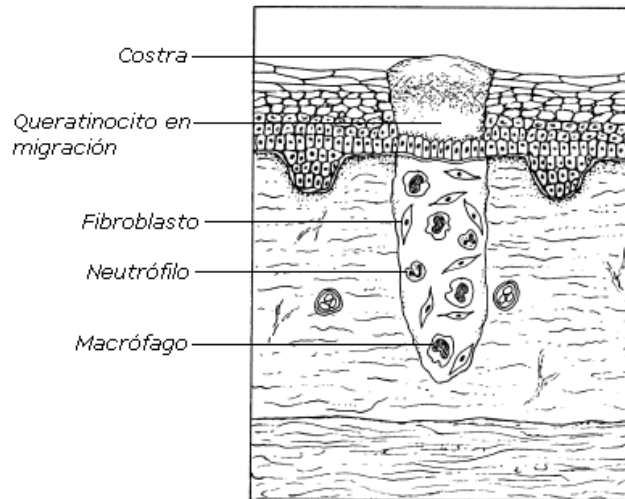


Figura III.2.3. Los fibroblastos se activan y se presentan en la herida 3 o 5 días después de la lesión, secretan factores que continúan con el proceso de reparación. La migración de los queratinocitos (epibolia) inicia desde los bordes de la herida, en folículos y en glándulas sudoríparas.⁷

III.3. Eventos moleculares durante la migración de los queratinocitos

Los queratinocitos forman parte del tejido sin daño, adheridos a la lamina basal, unidos por desmosomas (uniones célula-célula), y hemidesmosomas (HD's) (célula- substratos celulares); los desmosomas son el tipo de unión célula-célula más abundantes en la epidermis, en los queratinocitos los desmosomas son Ca dependientes, en condiciones normales expresan cierto tipo de receptores, pero en caso de una lesión se expresan receptores distintos que inducen su proliferación, siendo éste un proceso controlado, limitándose la diferenciación de éstos queratinocitos en la piel sin heridas.

Los HD's estabilizan la unión de las células epiteliales a la membrana basal, su papel fundamental radica en su capacidad para formar estructuras estables y rígidas, mediante la vinculación con filamentos de queratina del citoesqueleto con la membrana basal. La importancia de los hemidesmosomas para la integridad de la piel queda demostrada en la epidermólisis ampollosa o bullosa, donde hay mutación en los genes que codifican proteínas de los hemidesmosomas.¹⁰

III.4. Las integrinas y la matriz extracelular (MEC)

Las integrinas son un grupo de proteínas heterodiméricas, cada una constituida por polipéptidos de cadena alfa y de cadena beta, hay más de 15 alfa y 7 cadenas beta integrinas, se pueden vincular en diversas combinaciones para producir dímeros con propiedades de fijación distintivas que se expresan en tipos celulares distintos; las integrinas se fijan a una diversidad de proteínas de la matriz extracelular (MEC), así como a las moléculas de adhesión no integrina. El contacto de una integrina con su ligando también transmite una señal al interior de la célula, esta señal puede estimular su crecimiento u otras actividades.¹¹

Para que los epitelios sanen es necesario que los HD's se disocien para liberar la membrana basal y los substratos tengan contacto con las células y pueda ocurrir la reorganización celular, que

posteriormente permitirá la migración, receptores transmembranales en las células se unen a través de la MEC, que interactúan con el citoesqueleto.¹⁰

Muchas integrinas tienen una superposición de funciones de unión al ligando y algunos tipos celulares pueden expresar más de una de las integrinas, con la misma especificidad de unión al ligando, aunque su función de señalización parecen ser diferentes (por ejemplo, los queratinocitos pueden expresar por lo menos tres receptores diferentes fibronectina, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta6$ y $\alpha5\beta1$). Además, la diversidad funcional puede ser el resultado de splicing alternativo de las isoformas de subunidades alfa y beta.¹¹

La interacción de las integrinas con sus ligandos MEC ocasiona el agrupamiento de los receptores y desencadenan múltiples señales intracelulares, interacción con Cas p130, paxillina, vinculina, y proteínas quinasas, tales como la cinasa de adhesión focal (FAK) o a integrinas vinculadas quinasa (CIC), que produce señales que promueven la formación de lamelopodios, formación de filopodios, y fibras de actina.

Este proceso es de gran importancia en la cicatrización de las heridas debido a que los queratinocitos migran mediante proyecciones citoplasmáticas, además utilizan filamentos de actina para tirar de cada uno de los extremos de la herida. En la curación de las heridas la membrana basal intacta es degradada, lo cual sirve como una matriz provisional a los queratinocitos, rica en fibrina, fibronectina, vitronectina y laminina 5, durante la reepitelización también tienen contacto con el colágeno cutáneo.¹²

Unos de los pasos obligatorios antes de la migración de los queratinocitos es el desmontaje de los HD's de la matriz provisional, las integrinas se separan de la laminina 5 a través de una señal de separación, después se unen a la queratina del citoesqueleto.¹⁴

Los queratinocitos en migración expresan varios receptores de MEC en los sitios de lesión, $\alpha5\beta1$ (fibronectina unida a integrina), $\alpha3\beta1$ y $\alpha6\beta4$ integrinas que se unen a laminina 5, el receptor al colágeno $\alpha2\beta1$, el receptor de fibronectina $\alpha\beta1$, integrinas $\alpha\beta5$ y $\alpha\beta6$ que se vinculan a vitronectina y el receptor a tenascina C la $\alpha9\beta1$.¹⁴

III.5. La migración de los queratinocitos

Las lamininas son moléculas heterotriméricas que componen la membrana basal, la laminina 5 se sintetiza en cuestión de pocas horas en el sitio de la lesión por los queratinocitos de la piel, se secreta como una proteína precursora heterotrimétrica ($\alpha3$, $\beta3$, $\gamma2$), para su posterior procesamiento de subunidades $\alpha3$ y $\gamma2$, los precursores de la laminina 5 se pueden detectar en el sitio de la lesión. La expresión de la laminina 5 es sostenida por GF- β e INF y presentes en el líquido de la herida.^{15,16}

Cuando los queratinocitos inician la migración se da el cambio de integrinas de $\alpha6\beta4$ a $\alpha3\beta1$ vinculante a laminina 5 en el lugar de la herida, de manera paralela se da la fosforilación de $\alpha6\beta4$ que promueve el desmontaje de las HD's, se traslada la integrina $\alpha6\beta4$ a de los HD's y se forman los lamelopodios (prolongaciones transitorias de la membrana celular de microfilamentos de actina que otorgan movimiento). De la misma manera la fracción $\alpha3\beta1$ pasa a su forma activa que pasa a los receptores que coordinan los procesos actina-miosina, que son necesarios para la difusión y migración celular (Figura 4)¹⁰

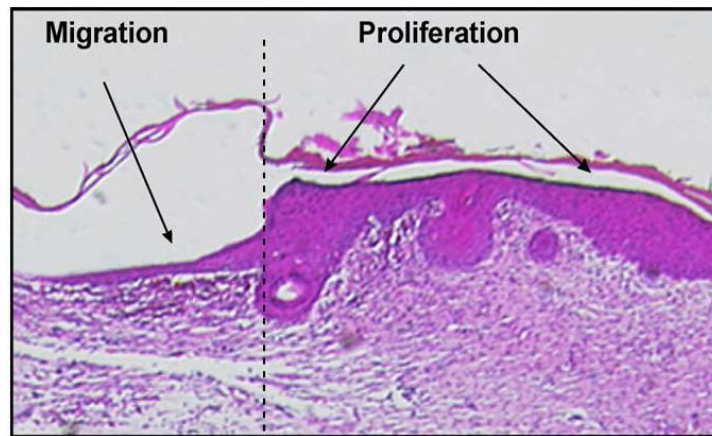


Figura III.5.1. Corte histológico de piel de ratón teñido con hematoxilina-eosina durante el proceso de reepitelización, indicando las zonas correspondientes.¹⁰

El cambio de $\alpha6\beta4$ a $\alpha3\beta1$ con el depósito de precursores de laminina-5 es necesario, pero no suficiente para estimular la motilidad a través de integrina $\alpha3\beta1$ y cierre de la herida. Otros factores solubles, principalmente factores de crecimiento, se presentan en los sitios de la herida para promover la reepitelización completa por queratinocitos.

Las integrinas se asocian a proteínas de transmembranales como los IAP's, tetraspan, proteoglicanos y sindecanos, que regulan la función de las integrinas especialmente durante el proceso de cicatrización.¹⁷

El ácido hialurónico es un glicosaminoglucano presente en la mayoría de las matrices extracelulares, forma una matriz muy hidratada que contribuye al mantenimiento del espacio extracelular y facilita la difusión de nutrientes, también interactúa con receptores como el CD 44 y el receptor asociado al ácido hialurónico para la motilidad que activa señales intracelulares, está involucrado en la migración y proliferación de los queratinocitos, produciendo un entorno favorable y estimulando la locomoción celular.

En el espacio extracelular, en la epidermis entre los queratinocitos existe una elevada concentración de ácido hialurónico, las altas concentraciones se han registrado durante el crecimiento de los órganos y en la cicatrización de heridas.¹⁰

III.6. Factores de crecimiento y receptores asociados

La lesión es el primer estímulo que inicia la migración de las células del epitelio al sitio de la lesión (Figura 5).

Durante la fase inflamatoria, la liberación local de plasma, fibroblastos y la producción de citocinas por parte de neutrófilos parece ser muy importante para la activación de los queratinocitos en los márgenes de la herida.

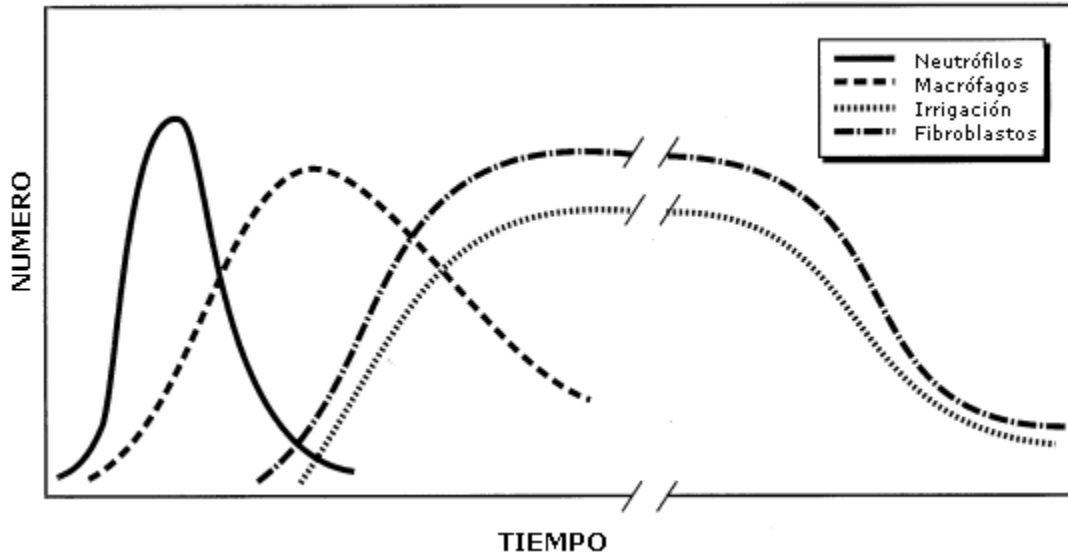


Figura III.6.1. Durante la reparación todos los tipos celulares del tejido son sometidos a un rápido aumento en el número que finalmente debe caer a niveles insignificantes en el tiempo que la herida llega a la maduración. Una herida madura termina muy acelular y avascular.

III.7. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Se ha reconocido que la presencia de PDGF en el proceso de cicatrización es de vital importancia, al parecer relacionado con la reepitelización, la formación del tejido de granulación, y la contracción de la herida. La concentración en nanomoles de PDGF basta para acelerar la formación del tejido de granulación tanto en vivo como en vitro. Además el PDGF sirve como factor quimiotáctico para Neutrófilos monocitos y fibroblastos, mejora la proliferación de los fibroblastos y la producción de la matriz extracelular, además induce la formación de miofibroblastos.

La expresión de PDGF y de los receptores al mismo, sugiere un mecanismo de acción paracrino, ya que el ligando se expresa en la epidermis, mientras que los receptores en el tejido de granulación y en los fibroblastos de la dermis. Al parecer el PDGF está asociado con anomalías en la cicatrización. En algunos individuos la cicatrización de heridas puede conducir a cicatrices hipertróficas o la formación de cicatrices queloides, que se caracterizan por la sobreabundancia de la matriz extracelular y consistentes diferencias en la concentración de factores de crecimiento, tanto en epidermis como en dermis.

Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que un aumento en la producción de PDGF conduce a mayor producción de la matriz dérmica en las cicatrices hipertróficas. Por otra parte en individuos genéticamente impedidos o enfermos, la expresión de PDGF y de sus receptores puede verse mermada significativamente como es el caso de los ratones diabéticos db/db, indicando la importancia de la administración de PDGF exógeno en los tratamientos de cicatrización. También se ha observado que el injerto de queratinocitos humanos genéticamente modificados para sobreexpresar PDGF-A a ratones atímicos mejora noblemente el rendimiento de los injertos.^{10,18}

III.8. Factor de crecimiento epidérmico (Epidermic Grow Factor-EGF)

Se ha demostrado con trabajos experimentales que el EGF, TGF- α (Factor de crecimiento transformante alfa), y HB-EGF son de vital importancia en la reparación de lesiones, se consideran como reguladores de la proliferación de los queratinocitos, los queratinocitos de los bordes de la herida han sido identificados como fuente productora de TGF α .

Se ha demostrado que la HB-EGF actúa de manera sinérgica con el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF)-1, otro de los factores de crecimiento presentes en el fluido de la herida, para la estimulación del crecimiento de los queratinocitos in vitro.¹⁹

EGF, TGF- α , y HB-EFG ejercen su función mediante la unión al EGFR, una proteína transmembranal tirosina quinasa que se expresa en muchas células diferentes, consistente con la expresión de ligandos para reepitelización. Al menos se asocian otros dos factores en éste proceso el TGF- β y MSP.²⁰

III.9. El factor de crecimiento transformante beta (Transforming Grow Factor-TGF β)

La superfamilia de TGF β abarca una amplia gama de proteínas que se relacionan estructuralmente. Sus efectos biológicos están mediados por complejos receptores heteroméricos. El TGB β da una señal de inicio mediante una unión de tipo I o de tipo II con sus respectivos receptores de serina/treonina quinazas ubicadas en las superficies celulares y con una elevada afinidad a un receptor de tipo III y mediante una cascada de fosforilaciones de proteínas Smad, de las cuales existen ocho tipos diferentes que forman complejos heteroméricos.

Los complejos activos Smad se translocan hacia el núcleo, y al relacionarse con otros cofactores nucleares, se regula la transcripción de sus genes blanco, unas Smad regulan positivamente el proceso mientras que otras en su contraparte lo regulan negativamente.

El TGF β es el ligando más importante para comenzar la migración de las células epiteliales durante el proceso de la reepitelización, puede inhibir la proliferación celular e inducir a la migración, ya que es un potente estimulador de la expresión de genes, en particular de los componentes de MEC (matriz extracelular), MMP's e integrinas de células diana diferentes.

Inmediatamente después de haberse llevado a cabo la lesión las plaquetas además de formar parte del tapón homeostático liberan grandes cantidades de TGF β -1. Éste factor de crecimiento tiene principalmente como objetivo dos células diana: los macrófagos y los queratinocitos. El TGF β -1 activo promueve la migración y activación de los monocitos-macrófago al sitio de la lesión para limpiar de microorganismos dicho sitio además de que eliminan remanentes de MEC. Asimismo el TGF β -1 es producido y secuestrado por la matriz de la lesión, permitiendo una liberación prolongada por las enzimas proteolíticas.

Esta combinación de diferentes fuentes celulares de TGB β -1 garantiza un suministro continuo durante el proceso de reparación, más tarde el TGB β -1 estimula la expresión de algunas subunidades de integrinas que promoverán la migración de queratinocitos en la matriz extracelular provisional de la lesión. También se ha demostrado que el TGB β -1 estimula la angiogénesis, la diferenciación de miofibroblastos y de la matriz extracelular, fundamental para

una eficiente reepitelización. Todo esto ha sido demostrado mediante el uso de modelos animales y la administración de TGB β -1 exógeno para mejorar la curación de las heridas.

El TGB β -1 es captado gracias a la integrina $\alpha\beta$ 6, representa una parte importante ya que regula la reepitelización de las heridas, suprime la inflamación, promueve la regeneración del tejido conectivo y la formación de cicatrices. A falta de integrina $\alpha\beta$ 6, parece que hay una deficiencia de TGB β -1 lo que ocasiona una inflamación exagerada en respuesta a lesiones o infecciones.²¹

III.10. Proteína estimuladora de macrófagos (Macrophage Stimulating Protein MSP)

Pertenece a una familia de proteínas que incluye al plasminógeno, es una molécula caracterizada por tener triples enlaces de puentes disulfuro que favorecen la formación de loops o bucles, es liberado por los hepatocitos a la circulación sanguínea en su forma inactiva (pro-MSP), la cual es activada por serin proteasas específicas con acción proteolítica en sitios extravasculares (proteasas como la tripsina, enzimas de la cascada de la coagulación y convertasas específicos localizados en la membrana plasmática de los macrófagos). La MSP lleva a cabo su acción mediante la unión a receptores tirosina quinasa Ron de sus células diana.

La unión al receptor Ron causa su dimerización y autofosforilación en los sitios con residuos de tirosina y en la cola C- terminal. Esta unión activa una variedad de vías de señalización intracelulares, incluyendo Ras/ Erk, PI3K/Akt, JNK, FAK y NF- κ B. Ahora se sabe que estas vías son esenciales en el crecimiento, desarrollo y migración de las células. El receptor para MSP es expresado normalmente por células epiteliales incluyendo a los queratinocitos y en específico a las células hematopoyéticas.²²

Reportes indican que la MSP podría tener un papel preponderante en el proceso de la cicatrización, esta hipótesis se ve sustentada por varias evidencias experimentales (Figura 6), esto debido a que en fluidos de las heridas humanas se han encontrado pro-MSP, MSP y una convertasa para MSP; además se ha encontrado la activación de Ron por MSP, se sabe además que regula la migración de los queratinocitos (en el borde de las heridas) y la de los macrófagos (en la dermis), el tratamiento con MSP exógeno mejora la reepitelización en ratones, el Ron promueve la reepitelización primaria de queratinocitos, y activa los mecanismos necesarios de expresión genética para el cierre de la herida. Los queratinocitos basales normalmente expresan el Ron, la MSP es activada por las proteasas correspondientes (proteín quinasa PKC).²³

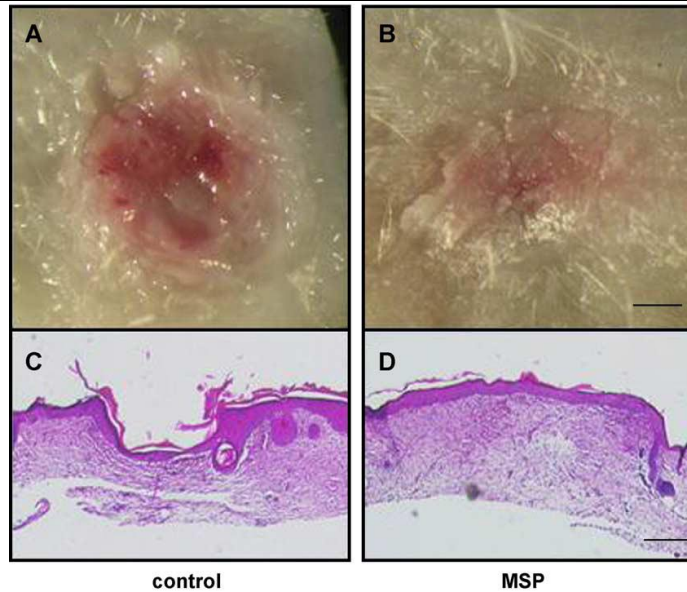


Figura III.10.1. La MSP promueve la cicatrización en vivo. Los ratones tratados muestran mejoría al cuarto día de tratamiento (A y B), cortes histológicos teñidos con hematoxilina –eosina después de 10 días de tratamiento (C y D).¹⁰

III.11. El sinergismo MSP/TGF β 1

Estudios demuestran que la activación de Ron resulta en un aumento de la producción de proteínas Smad 2 y directamente causa su fosforilación. Smad 2 es una molécula señal inducida por la función de TGF β . El hecho es que la activación de Ron media la expresión Smad 2 y la fosforilación de las células epiteliales, lo que sugiere una vía de señalización TGF β /Smad.

La estimulación *in vitro* con MSP y TGF β aumenta la migración queratinocitos, dado que la MSP y el TGF β están implicados en la cicatrización de heridas, la sinergia mejora la señalización entre Smad's y Ron, lo cual podría ser esencial en la regulación de la migración de los queratinocitos.^{24,25}

III.12. Metaloproteínas de la matriz (MMPs)

Las MMPs son una familia de enzimas dependientes de zinc, cuya actividad catalítica está estrechamente regulada: son secretadas como proenzimas inactivas (zimógenos) y la activación ocurre de manera extracelular.

Durante la cicatrización de heridas, la degradación de los componentes de MEC por las MMP se requiere para quitar y reorganizar las matrices provisionales y permitir la migración de células, la principal fuente de MMP son los queratinocitos que inician la migración durante la reepitelización. Los queratinocitos humanos sintetizan y secretan principalmente MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-10, y esta expresión es necesaria para regenerar el tejido lesionado.²⁶

Tras la lesión, es expresado de manera sostenida el MMP-1 por los queratinocitos en migración que bordean las heridas, pero no es expresado por los queratinocitos en proliferación. La concentración más elevada de MMP-1 se encuentra en el margen de la herida y va decreciendo paulatinamente al alejarse de este. Se ha demostrado que tanto TNF- α y TGF- β -1 inducen *in vitro*

la expresión de MMP-1 en los queratinocitos a través de una vía dependiente de p38, también puede ser inducida por el contacto del colágeno tipo 1 mediado por la integrina $\alpha 2 \beta 1$.

En el proceso de reepitelización, los queratinocitos migran sobre tejido conectivo dérmico, compuesto principalmente por colágeno tipo I, y pierden los contactos con BM, debido a que la lesión ocasiona una interrupción de la BM. La pérdida de contacto con la BM y el contacto con el colágeno tipo 1 de la dermis ocasiona la expresión de la integrina $\alpha 2 \beta 1$ (mediada por MMP-1) por parte de los queratinocitos en migración. A su vez la MMP-1 mantiene la migración sobre el colágeno tipo 1 y también su asociación con la integrina.

Esta interacción proporciona un mecanismo molecular para mantener junta la matriz, integrina y la proteasa. Esto resulta en una proteólisis controlada y localizada en el sitio de la lesión facilitándose la migración celular. La laminina 1 parece ser capaz de regular negativamente la expresión de MMP-1 en los queratinocitos.

La expresión de MMP-2 es modulada por TGF β -1, su concentración se mantiene estable en la cicatrización de heridas, lo que sugiere un papel prolongado en la fase de remodelación, por proteólisis de laminina-5 que modula la migración de los queratinocitos, la lisis de esta proteína ocasiona la producción de EGF (factor de crecimiento epidérmico), como un fragmento que promueve la migración de células epidérmicas. La MMP-9 es expresada en los sitios de la lesión debido a la migración de los queratinocitos y macrófagos. En los queratinocitos puede ser regulada su expresión por TGF- β , TNF α y estimulación por IL-1.

La MMP-9 puede activar ligandos inactivos de TGF- β , generando un loop positivo que mantiene sostenida la migración de queratinocitos. Finalmente, MMP-10 se expresa por queratinocitos en migración y son localizados con los MMP-1 del epitelio, parece que la MMP-1 asiste a los queratinocitos durante su migración y contribuye a la remodelación y formación de la nueva matriz. También puede activar la MMP-9.

En resumen la actividad de las MMP's tiene el potencial para inducir la migración, revierte la función de moléculas de la matriz y factores de crecimiento. Por lo tanto un desequilibrio en las MMP's puede contribuir a una mala cicatrización y al desencadenamiento de una patología.^{10,27}

III.13. Proliferación de los queratinocitos en el sitio de la lesión

Los queratinocitos migran al sitio de la lesión, se establecen y proliferan hasta formar una capa densa de epitelio para cubrir la herida. Para la reconstrucción total del tejido en su espesor e integridad es necesaria una fuente sostenida de factores del crecimiento, también asistida por integrinas y MMP (metaloproteinasas).¹⁰

Hay tres factores de crecimiento bien establecidos, el FEAG (Factor de crecimiento epidérmico), el TGF α (Factor de crecimiento transformante alfa), y KGF (factor de crecimiento de los queratinocitos), principales factores en el proceso de reepitelización.⁷

Ambos, el FEAG y TGF α , pertenecen a la superfamilia de EGF's, se encuentran en abundancia en incisiones, como reguladores clave de la proliferación de los queratinocitos. Los eosinófilos,

macrófagos y queratinocitos epidérmicos en el borde de la herida se han identificado como fuentes de EGF y TGF α a niveles máximos durante la fase de proliferación de los queratinocitos, EGF y TGF α ejercen su función mediante la unión con el EGF presente en heridas en cicatrización.

Otro importante regulador de heridas epidérmicas es el KGF (o FGF7), que actúa sobre los queratinocitos en la cicatrización de heridas. El FGF7 aumenta hasta en 100 veces su concentración dentro de las primeras 24 hs después de una lesión. El KGF administrado de manera exógena en heridas de la piel muestra actividad mitogénica en la epidermis.

La reepitelización también se ve favorecida si cuando se llevó a cabo la lesión quedaron folículos intactos, ya que a partir del folículo se generaron islas de crecimiento. La capacidad de proliferación de una pequeña porción es inmensa, como ha quedado demostrado con los injertos autólogos de queratinocitos cultivados para rescatar a pacientes con quemaduras de hasta el 98 % de la superficie corporal.^{7,10}

Para que los queratinocitos lleguen a la zona de la lesión tienen que pasar a través de la barrera de fibrina, por lo cual mediante la plasmina derivada del plasminógeno disuelven el coágulo, abriéndose paso a través de éste, el activador tisular del plasminógeno se activa mediante la migración de los queratinocitos. Por ésta razón en los ratones en los cuales el gen que codifica para el plasminógeno ha sido suprimido, la reepitelización ha sido casi totalmente eliminada.

III.14. Punto final de la reepitelización

Una vez llevada a cabo la lesión la herida se cubre por una capa de queratinocitos, la migración de los mismos cesa y una nueva epidermis estratificada con una nueva lámina basal se restablece en los márgenes de la herida, las células suprabasales dejan de expresar integrinas, se sabe poco acerca de las señales que detienen el proceso de reparación. Coincidiendo con la síntesis de la lámina basal la expresión de MMP se apaga y se empiezan a montar las nuevas uniones hemidesmosomales (Figura 7).⁶

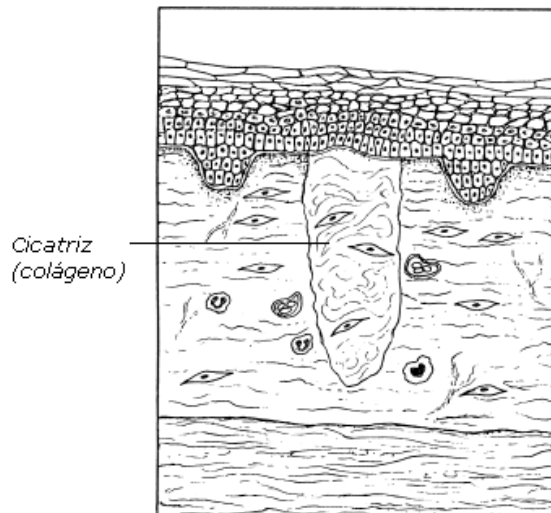


Figura III.14.1. La cicatriz se compone por densas fibras de colágeno desorganizadas, la remodelación de las mismas ocurre después de hasta 1 o 2 años.⁶

III.15. Uso de las plantas para mejorar la cicatrización

Las plantas contienen variadas sustancias químicas, las cuales son reservadas en varias partes de la misma, en las hojas, en los frutos, en la corteza, etc. Algunas plantas si son consumidas pueden coadyuvar en el tratamiento de algunas patologías o causar la muerte si no se utilizan racionalmente.

Las plantas y sus extractos tienen un potencial inmenso para la gestión y tratamiento de las heridas. El uso de plantas en la curación de las heridas no sólo es barata y asequible, también se sabe que rara vez ocasionan reacciones de hipersensibilidad. Estos agentes naturales inducen la curación y la regeneración del tejido perdido por múltiples mecanismos, sin embargo, hay una necesidad de validación científica, normalización y evaluación de los derivados de plantas antes de que estos puedan ser recomendados para la curación de las heridas.²⁸

Las lesiones y sobre todo las lesiones crónicas son una de las principales preocupaciones de los pacientes, afectan a muchas personas y reducen significativamente su calidad de vida. Estimaciones recientes indican que actualmente cerca de 6 millones de personas en todo el mundo se encuentran afectadas por este mal, la investigación de agentes cicatrizantes y el desarrollo de modelos efectivos para la evaluación de la cicatrización son de vital importancia.

Algunas plantas que mediante estudios han demostrado mejorar la cicatrización de heridas son el *Aloe vera*, *Lantana cámara*, *Azardica indica*, *Hypericum spp.*, *Tridax procumbens*, *Hydnocarpus wightiana*, *Helianthus annuus*, *Chromolaena odorata*, *Jasminum auriculatum*, *Curcuma longa*, *Ginkgo biloba*, *Centella asiática*, *Cedrus deodara*, entre muchas otras.³

El proceso de cicatrización puede ser promovido por varios constituyentes de las plantas, entre estos compuestos se encuentran los flavonoides, triterpenos, corticosteroides, aceites esenciales y alcaloides, de estos los alcaloides son un grupo inmenso que incluye a la morfina, la codeína, la quinina, la cocaína, etc. Elementos traza como el Zinc y la Vitamina C tienen influencia en el proceso de reparación, estos actúan como cofactores o coenzimas en una serie de funciones metabólicas involucradas en la reparación de tejidos.¹

IV. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

IV.1. Importancia de los estudios de cicatrización en animales

Debido al uso indiscriminado de muchas sustancias para el tratamiento de muchas patologías, cuyos efectos a la salud no han sido comprobados por estudios serios, se hace necesaria la experimentación con uso de animales de investigación para respaldar dichas propiedades curativas o en su defecto desmentir las mismas.

La obtención de resultados estadísticamente significativos requiere de controlar la mayor cantidad de variables posibles y de un estricto proceso de experimentación.

La cicatrización es un complicado proceso biológico que se inicia con el daño de tejido y que culmina con la reparación del mismo. En los modelos convencionales se retira una pieza completa de piel del animal de estudio, lo cual implica el retiro de dermis y epidermis, o bien dependiendo del estudio se puede retirar sólo la epidermis, dejando intacta la lámina basal y la dermis subyacente.¹

Los estudios donde se inducen daños al tejido nos ayudan a comprender el proceso de reparación, de esta manera ahora se puede influir mediante diferentes tratamientos en el proceso de reparación, muchos investigadores han estudiado heridas haciéndolas sanar más rápido de lo normal, además se ha podido estudiar como diferentes patologías afectan el proceso de cicatrización, muchos de los tratamientos estudiados han demostrado experimentalmente ser efectivos para mejorar la cicatrización, y han sido trasladados a su uso clínico con muy buenos resultados.

Sin embargo el uso de animales puede crear problemas en la interpretación de los resultados, debido a que cada organismo es distinto, además que puede que la sustancia empleada sea efectiva en el modelo animal pero no en las personas.⁴

IV.2. Técnicas histológicas

La técnica histológica es una serie secuencial de pasos a través de los cuales una muestra de tejido llega a transformarse en delgados cortes coloreados capaces de ser observados al microscopio.²⁹

PASOS	OBJETIVOS	MEDIOS USUALES
Obtención	-Proveer el material para su estudio al microscopio.	-Biopsia -Resección quirúrgica -Necropsia
Fijación	- Preservar la morfología y composición química de las células y tejidos. - Evitar la autólisis, mediante la interrupción de los procesos celulares dinámicos que concluyen con la muerte celular. -Eliminar los microorganismos -Facilitar la coloración y aumentar la consistencia de los tejidos.	-Formol 10% -Boulin -Glutaraldehido
Deshidratación	-Eliminar el agua de los tejidos.	-Alcohol etílico -Acetona
Diafanización	-Aclarar el tejido, debido a un cambio en el índice de refracción.	-Xilol
Inclusión	-Embeber el material en un medio fácil de cortar en fetas muy delgadas.	-Parafina -Acrílicos -Resinas Epoxi
Corte	-Lograr láminas muy delgadas que puedan ser atravesadas por la luz.	-Micrótomos rotatorio -M. de deslizamiento -Ultramicrótomos
Coloración	-Posibilitar el estudio morfológico o estructural, la histoquímica permite identificar un determinado tipo de molécula para hacer más fácil la caracterización de células.	-Hematoxilina -Eosina -Tricrómicos -Histoquímica
Montaje	-Preservar el corte, manteniéndolo, aislado del aire y deshidratado.	-Bálsamo de Canadá -Medios de plásticos

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las lesiones y sobre todo las crónicas son una de las principales preocupaciones de los pacientes, afectan a muchas personas y reducen significativamente su calidad de vida. Estimaciones recientes indican que actualmente cerca de seis millones de personas en todo el mundo se encuentran afectadas por este mal, la investigación de agentes cicatrizantes y el desarrollo de modelos efectivos para la evaluación de la cicatrización son de vital importancia.

Los elevados costos de los medicamentos para el tratamiento de las lesiones de la piel hace necesaria la búsqueda de alternativas más accesibles que no comprometan la integridad de los pacientes, con la misma efectividad que los tratamientos establecidos, por lo tanto los derivados de plantas se han vuelto en una alternativa confiable de bajo costo y que ha demostrado ser muy eficiente.

Es bien sabido que el uso de plantas para el tratamiento de diferentes patologías es una alternativa que en ocasiones es muy benigna, muchos productos derivados de plantas han mostrado tener un resultado favorable en el tratamiento de heridas, la curación de heridas con plantas favorece la coagulación, combate las infecciones y acelera la cicatrización de las heridas.

En el estado de Tamaulipas la corteza de *Helietta parvifolia* es administrada a los caballos como un antiinflamatorio, se han realizado estudios en un modelo de ratones CD1 sobre cojinete plantar para evaluar dicha actividad, pero no hay estudios serios sobre la actividad cicatrizante, por lo tanto nos hemos planteado la siguiente pregunta de investigación:

¿El extracto acuoso de *Helietta parvifolia* mostrará actividad cicatrizante?

VI. OBJETIVOS.

Objetivo general

- Evaluar la actividad cicatrizante de un extracto acuoso de *Helietta parvifolia*, en lesiones expuestas de ratones CD 1.

Objetivos particulares

- Evaluar la actividad cicatrizante de una crema al 1% de extracto acuoso de *Helietta parvifolia*.
- Evaluar la actividad cicatrizante de la crema Madecassol (control positivo).
- Evaluar la actividad cicatrizante de la Vaselina (control negativo).
- Realizar estudio histopatológico mediante la observación de cortes histológicos de piel regenerada.

VII. HIPÓTESIS

- Basados en la evidencia empírica que sugiere que el extracto de *Helietta parvifolia* presenta actividad cicatrizante y debido a que ya ha sido demostrada su actividad antiinflamatoria, suponemos que mejorará notablemente el proceso de cicatrización sobre excisiones quirúrgicas practicadas en ratones CD1.

VIII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Población de estudio:

Ratones CD1 machos, de 1 mes de edad, de entre 25-30 gramos de peso, exentos de enfermedades, mantenido en condiciones de bioterio, dividido en tres grupos de seis animales cada uno.

Tipo de estudio: Experimental

Criterios de inclusión: Ratones CD1 machos, de 1 mes de edad, de entre 25-30 gramos de peso sanos.

Criterios de exclusión: Hembras, ratones con alguna enfermedad, que no cumplan con la edad y el peso.

Criterios de eliminación: Aquellos animales que durante el proceso de experimentación se infecten o desarrollen tumores.

Variable independiente:

-Tratamiento:

1.-Madecassol (control positivo).

2.-Vaselina (control negativo).

3.-Crema al 1% de extracto acuoso de *Helietta parvifolia* (planta de estudio).

Variable dependiente: Diámetro promedio de las lesiones, observación de tejido de granulación y micromorfología en cortes histológicos.

IX. REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL

MATERIALES	EQUIPOS	SUSTANCIAS
<ul style="list-style-type: none"> • Matraz bola de 10, 20, 50, 250 y 500 mL. • Recirculador • Bomba de vacío • Sacabocados • Varilla de vidrio • Frasco de rosca • Jaulas • Vernier • Bisturí • Tijeras de disección • Pinzas • Cámara de éter • Soxhlet 	<ul style="list-style-type: none"> • Rotavapor BUCHI. • Sonicador SONICIS • Baño metabólico PRECISION. 	<ul style="list-style-type: none"> • Éter etílico Monterrey. • Madecassol Sanofi-synthelabo • Vaselina Uniliver

Cuadro IX.1. Materiales, equipos y sustancias a emplear.

Material biológico:

- Ratones machos CD1 (25-30g)
- Extracto de *Helietta parvifolia*

La *Helietta parvifolia* (Barreta) se colectó en el mes de junio, en la comunidad de El tanque. Xicotencatl, estado de Tamaulipas, una muestra de la planta fue depositada en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), a la cual se le asignó un número de registro IMSSM 15235 y fue autenticada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, jefa del herbario del IMMS. Los extractos utilizados fueron obtenidos y proporcionados por el Químico Carlos Salvador Valadez Sánchez profesor de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

X. MÉTODOS

X.1. Preparación del extracto acuoso de *Helietta parvifolia*

Se secaron al aire 4000 g de corteza del tallo de *Helietta parvifolia* a temperatura ambiente, la extracción se llevó a cabo con agua en un aparato Soxhlet durante ocho horas. La solución resultante (1000 mL) se concentró a presión reducida a 40 °C, para producir un residuo sólido de color marrón rojizo (118.66 g, w/w con un rendimiento de 2,96%). El residuo se almacenó en un refrigerador a 4-5 °C, hasta su uso.

X.2. Preparación de la crema 1% de *Helietta parvifolia*

En un vaso de precipitados de 100 mL se colocaron 29 gramos de vaselina, la cual se fundió con ayuda de un baño maría a 45 °C; en otro vaso de 10 mL fueron disueltos 0.3 gramos del extracto acuoso de *Helietta parvifolia* en un mililitro de agua destilada, el extracto disuelto se vertió en la vaselina fundida, y con un agitador de vidrio se incorporó perfectamente el extracto en la vaselina, manteniendo la temperatura del baño a 45 °C, la agitación se mantuvo por aproximadamente veinte minutos, se sacó la mezcla del baño y se llevó a sonicación por aproximadamente un minuto para homogenizar la mezcla, se continuó la agitación con varilla de vidrio hasta solidificación de la mezcla.

X.3. Animales de estudio

Se emplearon 18 ratones machos de 25 g a 30 g de peso, de las cepa CD1, mantenidos en condiciones de bioterio, con controles de ciclos luz-oscuridad, cambio semanal de viruta de madera y con libre acceso a agua y alimento. La atención de los animales y el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).³⁰

Se formaron 3 grupos de 6 animales cada uno, un grupo para el control negativo, otro para el control positivo (Madecassol), y otro para nuestra planta en estudio.

X.4. Elaboración de las excisiones

Cada uno de los seis ratones de todos los grupos se anestesiaron en cámara de éter, se les practicó una excisión circular en la región dorsal interescapular, con un sacabocado estéril de acero inoxidable de un cm de diámetro.

Una vez elaborada la lesión, se administró a cada ratón con la preparación correspondiente, la crema con extracto para el grupo tratado, la crema de referencia (Madecassol Sanofi-synthelabo) para los controles positivos, y la vaselina (Vaseline Uniliver) al grupo control negativo, se administraron diariamente durante un período de trece días. Los cambios en el diámetro de las lesiones se compararon al final del estudio, (midiendo en mm el diámetro de las lesiones). Una muestra de tejido en cicatrización de cada uno de los ratones en estudio se aisló para el posterior estudio histopatológico.

X.5. Modelo de cicatrización

Inducción de lesiones abiertas.

Grupo tratado

1.-Se anestesió a cada uno de los ratones, en cámara de éter, posteriormente se realizó una excisión circular de un centímetro de diámetro en la región dorsal interescapular con un sacabocado estéril de acero inoxidable de un cm de diámetro

2.-Se administró diariamente a cada ratón la crema al 1% de *Helietta parvifolia*.

3.- Se observaron los ratones diariamente durante 13 días para identificar efectos adversos (muerte, diarrea, irritabilidad, pérdida de peso, ataxia, anestesia, infección de las lesiones, etc), al terminar este periodo se sacrificaron los animales por medio de cámara de éter y dislocación cervical.

4.-Posteriormente se tomó una muestra de tejido cicatrizado y parte de la periferia para su posterior estudio histopatológico.

Grupo control negativo.

1) Se realizó una excisión circular de un centímetro de diámetro en la región dorsal interescapular con un sacabocado estéril de acero inoxidable de un cm de diámetro

2) Se administró diariamente Vaselina sobre la lesión de cada ratón por un período de 13 días y se procedió de igual manera que el grupo tratado.

Grupo control positivo.

1) Se realizó una excisión circular de un centímetro de diámetro en la región dorsal interescapular con un sacabocado estéril de acero inoxidable de un cm de diámetro

2) Se administró diariamente Madecassol sobre la lesión de cada ratón por un período de 13 días y se procedió de igual manera que el grupo tratado.

X.6. Sacrificio de los animales

Los ratones se sacrificaron a los 13 días de experimentación, en cámara de éter con posterior dislocación cervical, se cortó la zona del tejido reparado y la periferia, cuidando de tomar la menor cantidad de pelo posible, la muestra se conservó en una solución de formalina al 10% para el posterior análisis histopatológico.

X.7. Cortes histológicos

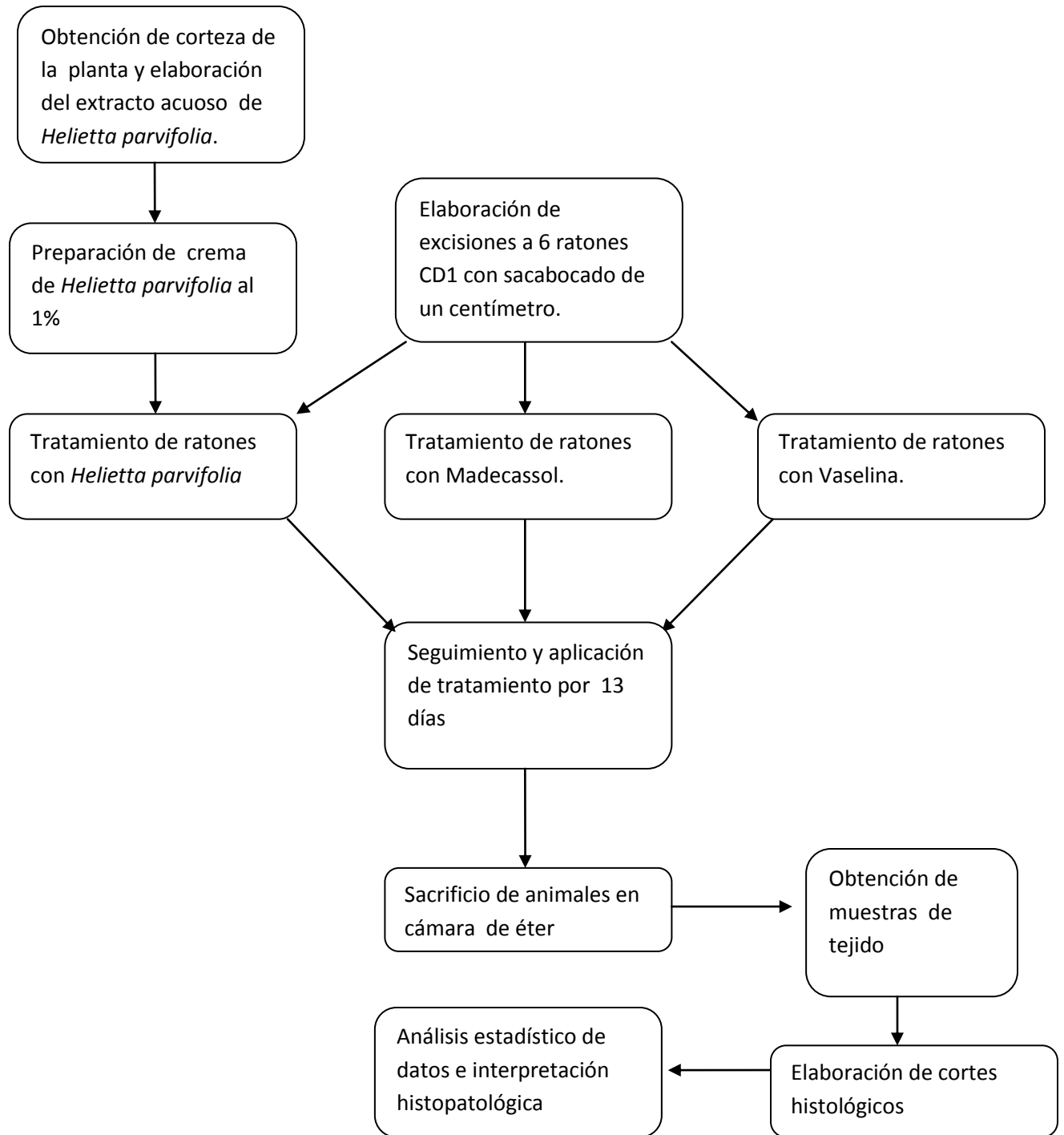
Las muestras de tejido de piel fueron conservadas en Formalina 10%.

A continuación se llevaron al laboratorio de Histología de la FES Zaragoza, UNAM, para la preparación de los cortes histológicos para el posterior estudio histopatológico.

X.8. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por ANCOVA ajustados a condiciones basales con el paquete estadístico SPSS Versión 16.0. Como Pos hoc se realizó la prueba de Bonferroni, se consideró significancia estadística al 90 % de confianza.

XI. DIAGRAMA DE FLUJO



XII. RESULTADOS

En el cuadro XII.1. se muestran los diámetros de las lesiones por grupo. Se observa que el diámetro de las lesiones del grupo tratado con *Helietta parvifolia* fue menor con respecto al grupo control negativo como al grupo tratado con Madecassol (control positivo), la diferencia fue estadísticamente significativa con una $p < 0.1$.

En la Figura XII.1.1. se observa la apariencia de la lesión recién elaborada, caracterizada por un color brillante y de bordes bien delimitados, con la total remoción de las tres capas de piel (epidermis, dermis e hipodermis).

En las figuras de la XII.1.2. a la XII.1.4. se observa la apariencia de las lesiones al tercer día de los diferentes tratamientos, se observa el cambio de coloración con respecto al primer día de tratamiento que sugiere un avance en la reepitelización, mientras más oscura la lesión más efectiva es la cicatrización, por lo cual era de esperarse que la lesión del grupo control negativo (Figura XII.1.3.) se viese más clara que en los demás grupos.

En las figuras de la XII.1.5. a la XII.1.7. se observan las lesiones al sexto día de tratamiento, para la observación de tejido de granulación, el cual es directamente proporcional al avance en la reparación de la lesión, se observa claramente el mayor avance en las lesiones del grupo tratado con Madecassol y *Helietta parvifolia* con respecto al grupo tratado con Vaselina.

En las figuras de la XII.1.8. a la XII.1.11. se observan las lesiones en el décimo día de tratamiento y con la costra retirada para facilitar la observación de tejido ya reparado, en el caso del ratón del grupo control negativo (Figura XII.1.8.) se observa una escasa reparación, en el caso del grupo control positivo (Figura XII.1.9.) se observa una lesión que ya es pequeña en comparación con la inicial y que muestra evidentes signos de reparación, pero en el caso de los ratones tratados con *Helietta parvifolia* (Figura XII.1.10. y Figura XII.1.12.) se observan amplias zonas de reparación (zonas con escaso pelo) que indica una eficiente reparación de tejido.

En la Figura XII.2.1. y Figura XII.2.2. se observan los cortes realizados al grupo control negativo, donde se observa abundante infiltrado leucocitario y la formación de fibras de colágeno desorganizadas que indican una lenta reparación del tejido.

En las figuras de la XII.2.3. a la XII.2.6. se observan los cortes histológicos realizados al grupo tratado con Madecassol (control positivo), en la figura a 10X (Figura XII.2.3.) se observan las zonas de reparación, se puede observar la formación muy abundante de fibras de colágeno desorganizadas (Figura XII.2.4.), se observa aún infiltrado leucocitario con fibras de colágeno adyacentes en este grupo de cortes histológicos.

En los cortes realizados de muestras del grupo tratado con *Helietta parvifolia* (Figura XII.2.7. a la Figura XII.2.12), se observa incluso en la figuras a 10X (XII.2.7 y XII.2.8.) la evidente formación de fibras de colágeno y la ausencia de infiltrado leucocitario, además de la presencia de folículos, en la figuras (XII.2.9, XII.2.10 y XII.2.7) se observa la formación de fibras de colágeno alrededor de folículos, tal como se fundamenta en la base teórica, lo cual indica una buena reepitelización, en

la figura XII.2.12. se observa una gran cantidad de fibras de colágeno, pero además un intento de reorganización de las mismas, lo cual es indicativo de una más avanzada reparación con respecto a los otros dos grupos.

Cuadro . XII.1. Comparación diámetros (mm) de las lesiones por grupo.

Parámetros	Vaselina (-)	Madecassol (+)	<i>Helietta parvifolia</i>
	n= 6	n= 6	n= 6
Diámetro final (mm)	3.326 ± 0.276	3.456 ± 0.352	1.302 ± 0.350

Prueba ANCOVA con ajuste para comparaciones múltiples Bonferroni.

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

La diferencia de medias es significativa a $p < 0.1$ (90% confianza).

XII.1. Apariencia de las lesiones durante el estudio



Figura XII.1.1. Apariencia de lesión en el primer día de tratamiento.



Figura XII.1.2. Apariencia de lesión en ratón tratado con la planta en el tercer día de



Figura XII.1.3. Apariencia de lesión en ratón control negativo en el tercer día de



Figura XII.1.4. Apariencia de lesión en ratón control positivo en el tercer día de tratamiento.



Figura XII.1.5. Granulación control positivo (sexto día)



Figura XII.1.6. Granulación planta de estudio (sexto día)



Figura XII.1.7. Escasa granulación en control negativo (sexto día)

Figura XII.1.8. Control negativo sin costra en el décimo día de estudio.





Figura XII.1.9. Control positivo sin costra en el décimo día de tratamiento.



Figura XII.1.10. Ratón tratado con *Helietta parvifolia* en el décimo día del tratamiento (sin costra).



Figura XII.1.11. Ratón tratado con *Helietta parvifolia* en el décimo día del tratamiento (sin

XII.2. Cortes Histológicos

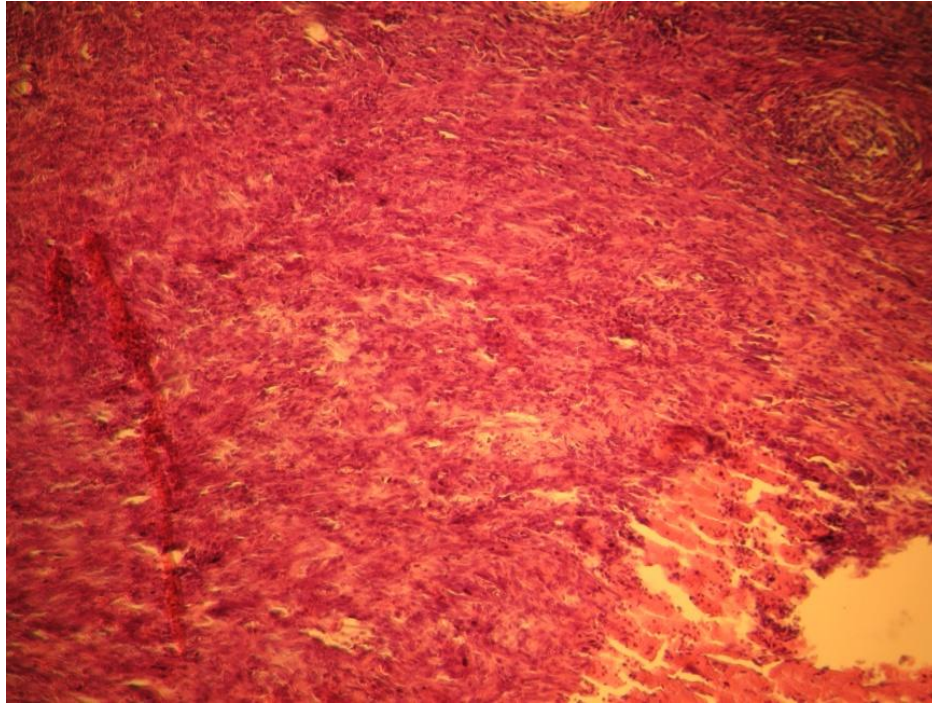


Figura XII.2.1. Abundante infiltrado leucocitario en un tejido de epitelio de ratón del grupo control negativo (10X).

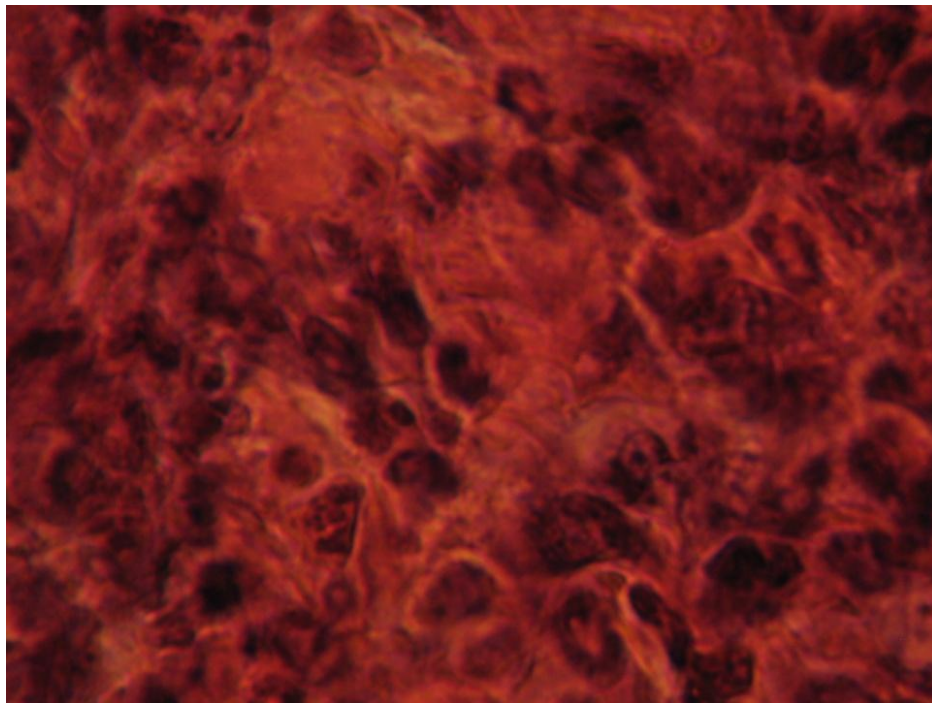


Figura XII.2.2. Abundante infiltrado leucocitario en tejido de reparación de ratón del grupo control negativo con fibras de colágeno visibles (100X).

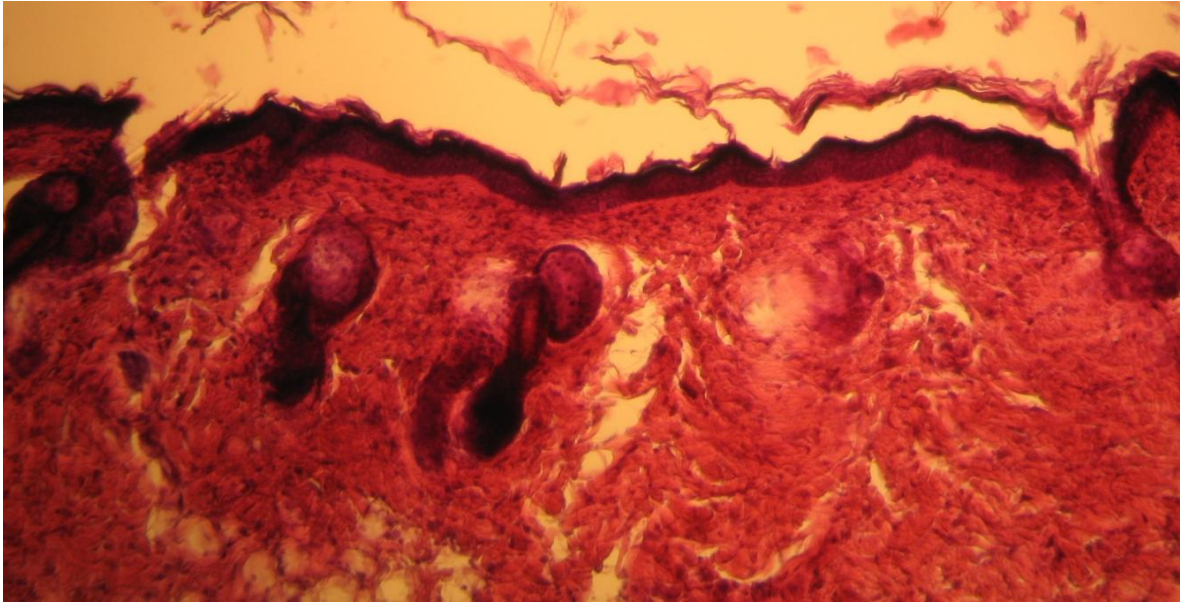


Figura XII.2.3. Tejido en reparación de grupo control positivo (10X).

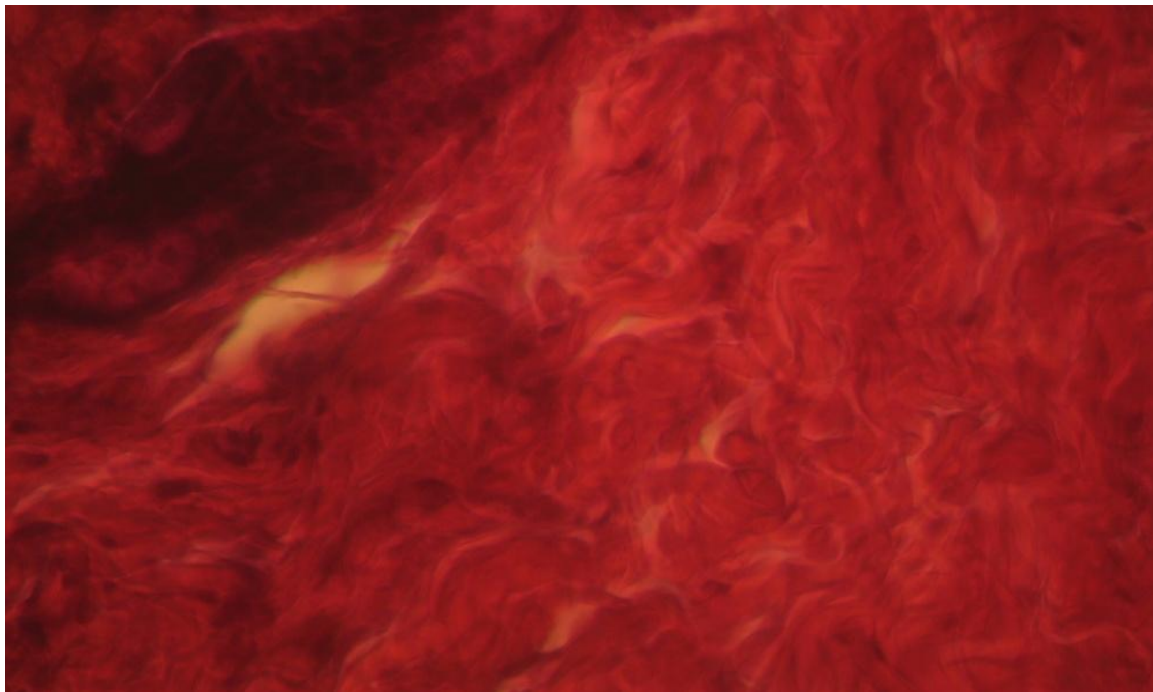


Figura XII.2.4. Tejido en reparación de grupo control positivo con evidente formación de fibras de colágeno y escaso infiltrado (40X).

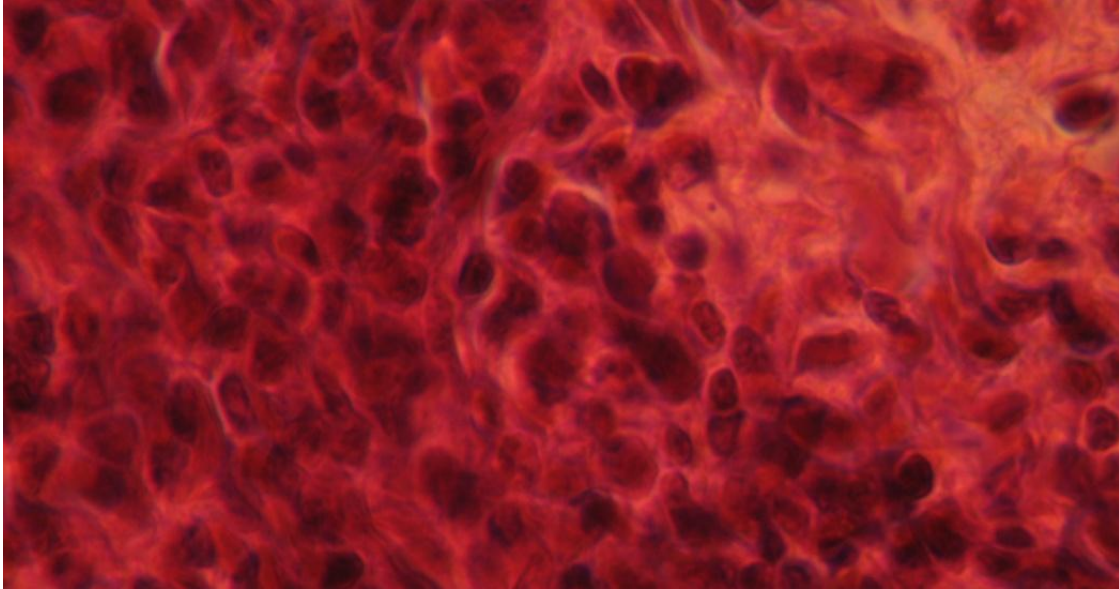


Figura XII.2.5. Tejido en reparación de grupo control positivo con evidente formación de fibras de colágeno y abundante infiltrado (100X).

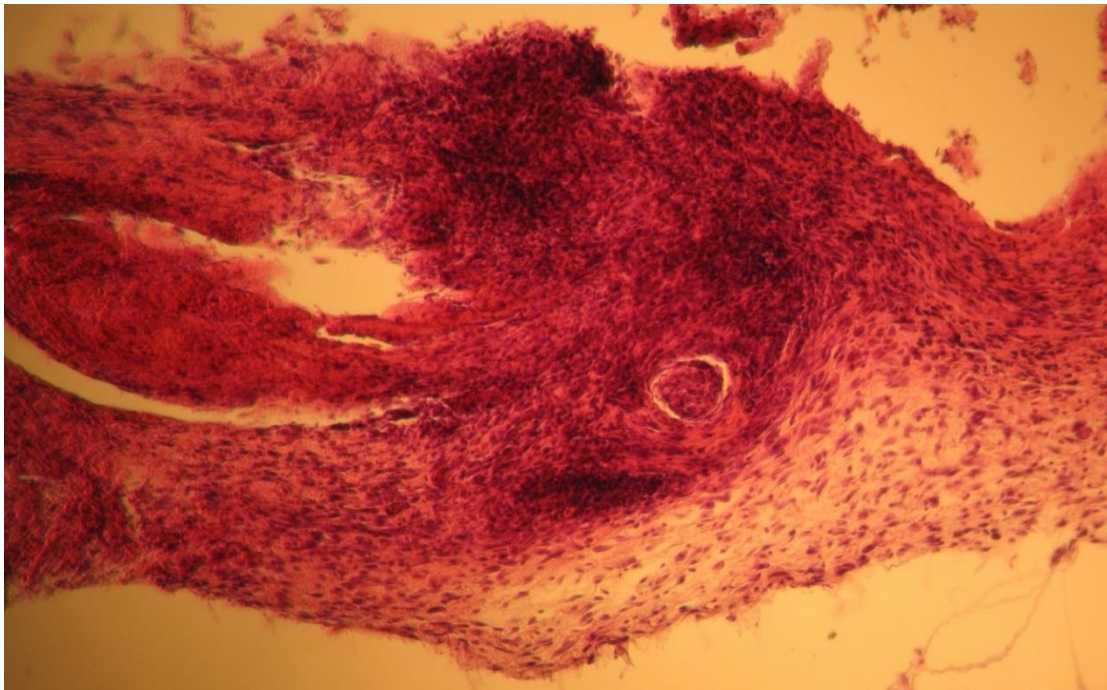


Figura XII.2.6. Tejido en reparación, tejido conectivo normal e infiltrado en corte de grupo control positivo (10X).

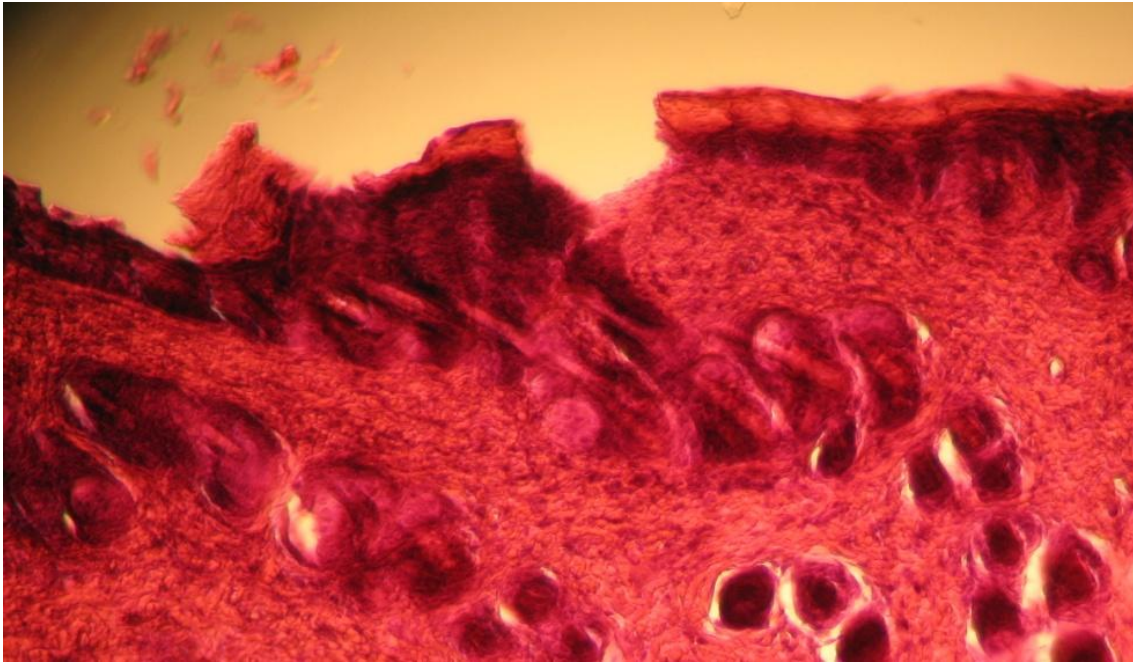


Figura XII.2.7. Tejido en reparación con evidente formación de fibras de colágeno en un corte del grupo tratado con *Helietta parvifolia* (10X).



Figura XII.2.8. Formación de fibras de colágeno alrededor de los folículos en un corte del grupo tratado con *Helietta parvifolia* (10X).

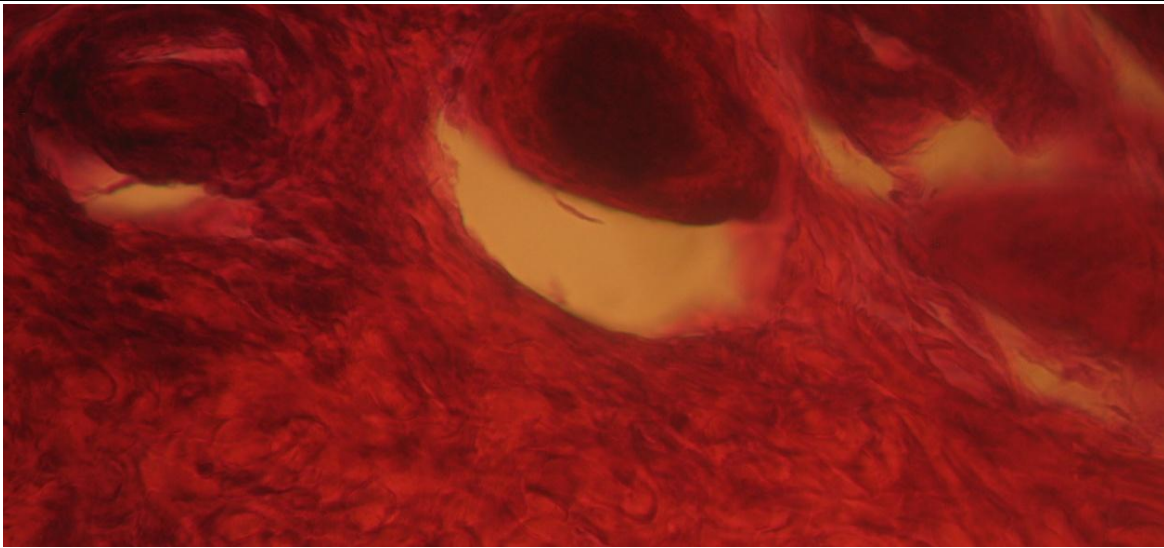


Figura XII.2.9. Formación de fibras de colágeno alrededor de un folículo en un corte del grupo tratado con *Helietta parvifolia* (40X).

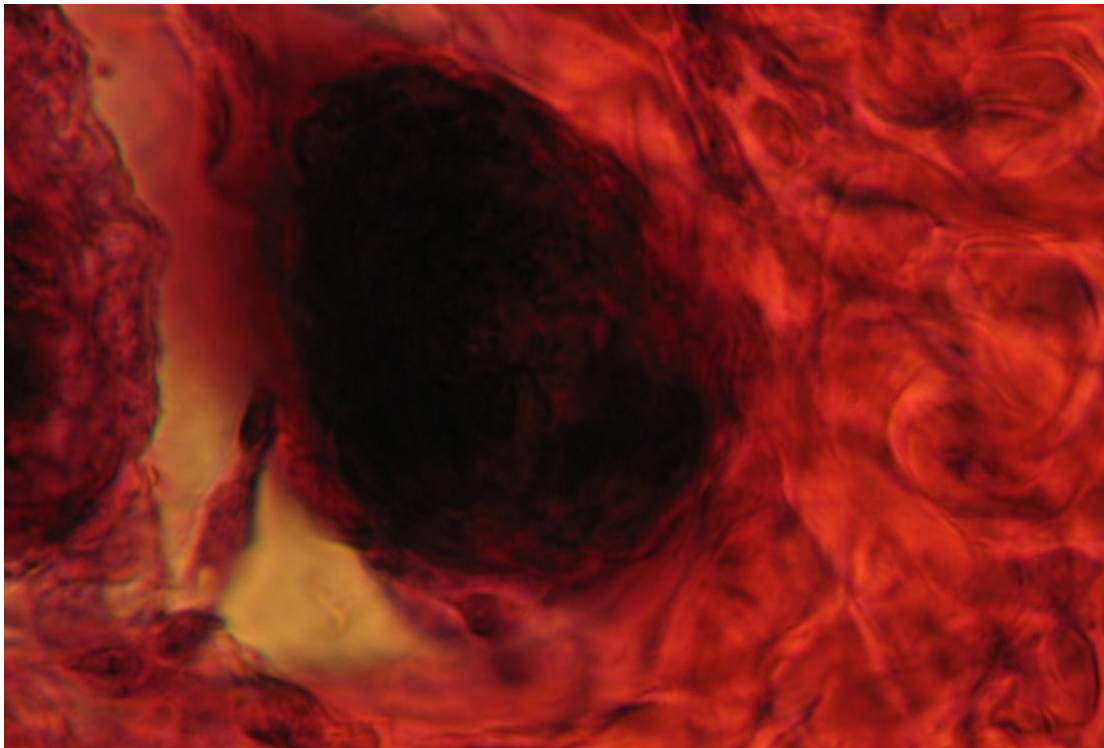


Figura XII.2.10. Formación de fibras de colágeno alrededor de un folículo en un corte del grupo tratado con *Helietta parvifolia* (100X).

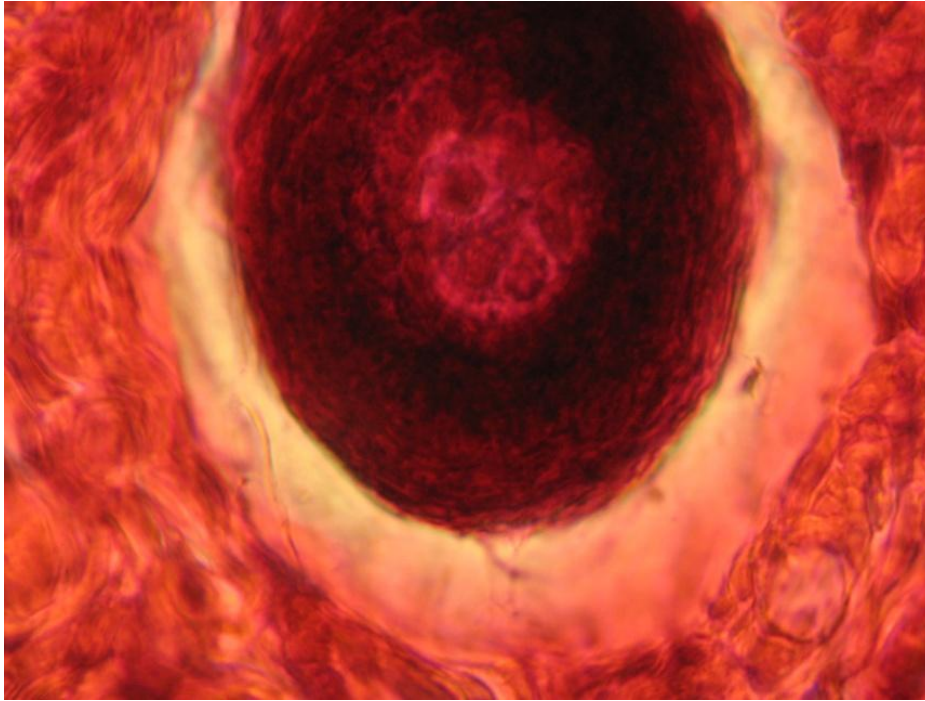


Figura XII.2.11. Formación de fibras de colágeno alrededor de un folículo en un corte del grupo tratado con *Helietta parvifolia* (100X).

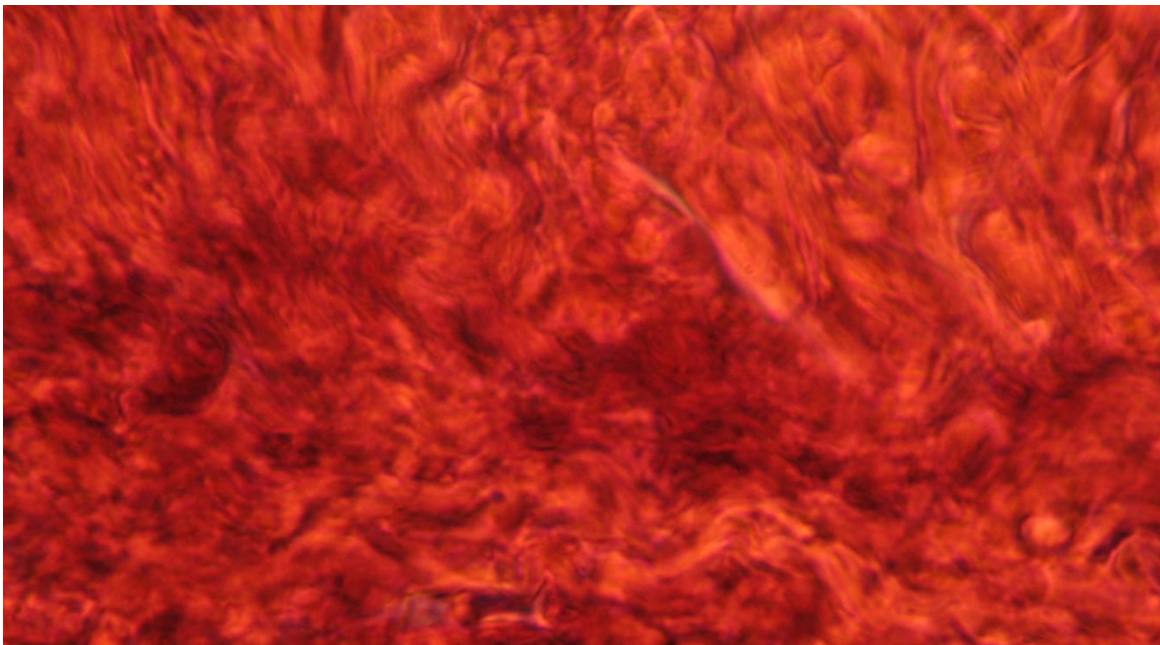


Figura XII.2.12. Tejido en reparación, donde se observan fibras de colágeno organizadas y desorganizadas, en un corte del grupo tratado con *Helietta parvifolia* (100X).

XIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las plantas son almacenes de variadas sustancias, los investigadores han aislado muchos compuestos y los han estudiado en muy variados campos, la medicina a base de plantas presenta la ventaja de su bajo costo y fácil accesibilidad, hay una serie de plantas de las cuales se ha validado su actividad curativa pero la mayoría de los estudios se realizan al azar o bajo el recabado de testimonios.

Muchos compuestos derivados de plantas han demostrado facilitar la curación de heridas, mediante el uso de modelos animales se ha comprendido mejor como se lleva a cabo el proceso de reparación. La cicatrización es un proceso complejo por el cual un tejido dañado es restaurado hasta quedar lo más parecido a su estado normal, este proceso depende de la capacidad regeneradora del tejido, el tipo y la magnitud de los daños, además del estado de salud del individuo.³

El proceso de reparación se da en cuatro procesos básicos tales como la inflamación, contracción de la herida, reepitelización y formación de tejido de granulación. La inflamación ocurre inmediatamente después de la interrupción de la integridad del tejido, las plaquetas al degranularse secretan mediadores de la coagulación para culminar en la formación de un tapón hemostático (por el cual migraran células de la inflamación) para detener la pérdida de sangre, este tapón es sustituido por tejido de granulación que consiste en nuevos capilares y fibroblastos. Los fibroblastos se diferenciarán a miofibroblastos (productores de colágeno) que aunado a la migración y proliferación de queratinocitos devolverán la inocuidad al tejido dañado.³¹

En el análisis estadístico ANCOVA se observó diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado con *Helietta parvifolia* respecto a los demás, ($p < 0.1$), lo cual indica que las lesiones en este grupo presentan un comportamiento distinto a los demás, y que al ser la media menor indica que las lesiones cerraron de manera más eficaz en este grupo, lo cual apoya a nuestra hipótesis.

Mediante la observación macroscópica se detectó que el grupo control negativo desarrolló escaso tejido de granulación, que fue visible hasta el octavo día y la coloración de las lesiones era claro lo cual indica una lenta y deficiente reepitelización, mientras el grupo tratado con Madecassol desarrolló tejido de granulación desde el sexto día con evidente oscurecimiento de la lesión al igual que el grupo tratado con la planta, basados en esta observación macroscópica y fundamentándonos en la premisa de que la formación de tejido de granulación indica una reepitelización más eficiente, se puede deducir que el grupo tratado con Madecassol y el tratado con *Helietta parvifolia* presentan una cicatrización más favorecida con respecto al control negativo tomando en cuenta este aspecto.³²

La reepitelización se ve favorecida si durante la lesión quedaron folículos intactos, debido a que a partir de estos se formaran fibras de colágeno y migraran más fácilmente las células al sitio de la lesión, además que a partir de estas zonas se intentará mantener los márgenes de la lesión juntos, se sabe que los miofibroblastos que generen fibras de colágeno tendrán afinidad por estos sitios,

La aparición de fibras de colágeno es indicativo de reparación pero no suficiente para decir que existe una buena cicatrización, debe de existir el reordenamiento de las fibras para que el tejido pueda considerarse como reparado, ya que este último nivel de organización es el que definirá la funcionalidad e inocuidad del tejido recién formado, además aunado a esto se encuentra el hecho de que mientras menos infiltrado exista en el tejido significa que la reparación se está llevando a cabo de manera eficiente.^{6,8,33}

En los cortes histológicos se aprecia que en el grupo control negativo hay una marcada infiltración leucocitaria, además de un escaso desarrollo de tejido de reparación (escasa formación de fibras de colágeno), en los tejidos del grupo control positivo (tratados con Madecassol), se observa la formación de tejido de reparación con abundantes fibras de colágeno, con escaso infiltrado, y en los tejidos del grupo tratado con la planta se puede observar fácilmente la formación de tejido de reparación con abundantes fibras de colágeno, la reparación de tejido alrededor de folículos e incluso se puede diferenciar en algunas muestras la reorganización de algunas porciones de tejido recién formado, todo esto indica que la cicatrización inducida por parte del tratamiento con *Helietta parvifolia* es más eficaz que en los otros dos grupos.

Se sabe que la presencia de infiltrado leucocitario retrasa el cierre de las lesiones y promueve la aparición de cicatrices, lo cual está respaldado en el corte histológico del grupo control negativo debido a su deficiente reepitelización.⁹

En los cortes histológicos del grupo control negativo y en el control positivo se observa infiltración leucocitaria abundante, lo cual no se observa en los cortes del grupo tratado con la planta, lo cual sugiere que el extracto podría tener algún agente antimicrobiano que favorece el aceleramiento de la cicatrización.³⁴

Se sabe que en la cicatrización influyen variados factores como la edad, el estado de salud, hipoxia en los tejidos, deficiencias vitamínica y mineral, si se está expuesto a radiaciones, la contaminación por parte de microorganismos, por lo cual debe garantizarse que en un estudio de este tipo ninguno de estos factores afecte las determinaciones, en este caso las lesiones fueron monitoreadas constantemente para descartar probables infecciones, de ahí la importancia de determinar la actividad antimicrobiana, ya que basados en esto si el extracto demostrase tener actividad cicatrizante, podría considerarse una terapia conjunta con algún antimicrobiano.^{33,35,36}

En las muestras de tejido del grupo tratado con *Helietta parvifolia* se observan fibras de colágeno alrededor de folículos que indica una muy buena reepitelización, pero estas estructuras no se observan en ninguno de los otros dos grupos, no sabemos porque mecanismo pero *Helietta parvifolia* de alguna manera favorece este tipo de reparación que es muy eficiente.

En ninguno de los grupos, excepto el tratado con el extracto, cerraron heridas completamente, lo cual ocurrió en dos ratones del grupo tratado con la planta, lo cual evidencia el potencial cicatrizante de la planta, queda por determinar ahora la calidad del tejido recién formado, es decir

llevar a cabo pruebas para determinar la capacidad de soportar la tensión del tejido cerrado, lo cual se hace con equipo especializado con el que no se cuenta.^{37,38,39}

La vitamina C y el Zinc juegan un papel preponderante en el proceso de cicatrización, principalmente a nivel de metaloproteinasas, por lo cual es importante determinar si en un extracto vegetal estos elementos se encuentran presentes, aunque debe tomarse en cuenta que debido al proceso por el cual se obtienen los extractos la vitamina C se ve mermada en su concentración debido a que es fotosensible, lo cual no pasa con el Zinc, pero para cuya determinación es necesaria la utilización de equipos más especializados y por ende más costosos.^{26,40,41,42}

Helietta parvifolia tiene constituyentes como la kokusaginina, heliparvifolina, flindersiamina y isoflindersiamina (principalmente en las hojas y en corteza), eugenol, O-metileugenol, isosafrol y safrol en el aceite esencial de hojas y ramas. No sabemos qué componente es el responsable de la actividad cicatrizante, aunque basados en la composición se puede deducir que la aplicación de la planta disminuye la sensación de dolor ya que el eugenol es un anestésico natural, la kokusamina tiene actividad parecida a la de la morfina, el eugenol además tiene efecto antiséptico, *Helietta parvifolia* tiene un gran potencial para aplicaciones terapéuticas más allá de antiinflamatorio o cicatrizante, por lo cual se deben de realizar más estudios para buscar nuevas aplicaciones clínicas.⁵

HIPÓTESIS

Basados en la evidencia empírica que sugiere que el extracto de *Helietta parvifolia* presenta actividad cicatrizante y debido a que ya ha sido demostrada su actividad antiinflamatoria, suponemos que mejorará notablemente el proceso de cicatrización sobre excisiones quirúrgicas practicadas en ratones CD1.

XIV. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que la crema preparada con el extracto de *Helietta parvifolia* al 1% favorece el proceso de cicatrización en las excisiones practicadas en ratones CD1.

La formación de tejido de granulación demuestra la eficiencia de la cicatrización, lo cual queda evidenciado en el cierre de la herida, por lo tanto el tratamiento con *Helietta parvifolia* ha demostrado favorecer la cicatrización ya que mostró la más eficiente reepitelización a nivel macroscópico (observación de tejido de granulación).

A nivel microscópico (mediante la observación de los cortes histológicos), la organización microscópica mostrada por el grupo tratado con la planta presenta un mayor grado de reparación y reorganización de tejido recién formado, por lo cual se concluye que el tratamiento con *Helietta parvifolia* ha demostrado ser eficaz, mejorando notablemente el proceso de cicatrización.

XV. PERSPECTIVAS

- *Llevar a cabo un estudio de la actividad antimicrobiana del extracto.
- *Llevar a cabo un estudio para determinar la presencia de Vitamina C y Zinc en el extracto de estudio.
- *Llevar estudios para descartar reacciones alérgicas y de hipersensibilidad del extracto.
- *Dilucidar que componente es el responsable de la actividad cicatrizante.
- *Una vez realizados todos los estudios pertinentes, llevar el estudio a su aplicación clínica, es decir ponerla al alcance de pacientes aquejados por lesiones y monitorear el tratamiento.
- *Considero que el estudio de plantas utilizadas con fines terapéuticos debe tener mayor difusión y llegar más lejos que simplemente un fin didáctico, para que la población tenga acceso a los beneficios que éstas alternativas terapéuticas ofrecen.

XVI. REFERENCIAS

- 1.- Pesin I, Koca U, Kupeli E, Yilmazer D, Alper M. Assessment of Wound Healing Activity of the Aqueous Extracts of *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. Fruits and Leaves. eCAM-- Evid Based Complement Alternat Med. [doi:10.1093/ecam/nep190]. 2009 [cited 2011 Feb 14] 190:1-7. Available from: <http://ecam.oxfordjournals.org>.
- 2.-Rasik A, Raghbir R, Gupta A, Shukla A, Dubey M, Srivastava S, Jain H, Kulshrestha D. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. Journal of Ethnopharmacology 1999; 68: 261–266
- 3.-Sandeep B, Naikwade N, Kondawar M, Magdum C, Awale V. Traditional uses of plants for wound healing in the Sangli district, Maharashtra. International Journal of PharmTech Research 2009; 1: 876-878
- 4.-Marroquin R, Flores M, Carreón R, García M, Mora G JLA, Aguilar A, Hernández VJ. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw o edema and granuloma tissue formation in mice. Journal of Ethnopharmacology 2009;124:639–641
- 5.-Domínguez X, Canales A, Garza J, Gómez E, Garza L. Constituents of leaves and branches of *Helietta parvifolia*. Phytochemistry 1971; 10: 1966
- 6.-Martin P, et al. Wound Healing- Aiming for Perfect Skin Regeneration. Science 1997;276: 75-81
- 7.- Lorenz PH, Longaker MT. Wounds: Biology, Pathology, and Management. In: Norton J, Lowry S, Mulvihill S, Pass H, Thomson R. editors. Essential practice of surgery. EUA: Springer, 2002; p. 77-78.
- 8.-Robin J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007; 39: 666–671
- 9.-Wilgus TA. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. Pharmacological Research 2008; 58: 112–116.
- 10.-Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. Experimental Cell Research 2005; 304:274–286.
- 11.-Goldsby RA, Kindt TH, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. 5ta ed. New York: Mc Graw Hill; 2004 357-358 pp665
- 12.-O’Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. Clinical and Experimental Dermatology 2001; 26: 525–530.

-
- 13.- Lotz M.M, Rabinovitz I, Mercurio AM. Intestinal restitution: progression of actin cytoskeleton rearrangements and integrin function in a model of epithelial wound healing. *American Journal of Pathology* 2000; 156: 985– 996
 - 14.- Häkkinen L, Hildebrand HC, Berndt A, Kosmehl H, Larjava,H. Immunolocalization of tenascin-C, $\alpha 9$ integrin subunit and $\alpha \beta 6$ integrin during wound healing in human oral mucosa. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2000; 48: 985–998
 - 15.- Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics* 2000; 218: 213– 234.
 - 16.- Kainulainen T, Hakkinen L, Hamidi S, Larjava K, Kallioinen M, Peltonen J, Salo T, Larjava H, Oikarinen A. Laminin-5 expression is independent of the injury and the microenvironment during reepithelialization of wounds. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1998; 46: 353– 360.
 - 17.- Hemler ME. Integrin associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 1998;10; 578– 585
 - 18.- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 1999; 79: 1283– 1316
 - 19.-Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J* 2008;32:1068–1081.
 - 20.-Chernoff E, Robertson S. Epidermal growth factor and the onset of epithelial epidermal wound healing. *Tissue & Cell* 1990; 22: 123-135
 - 21.-Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF- $\beta 1$ mediated fibroblast–myofibroblast terminal differentiation the role of Smad proteins. *Experimental Cell Research* 2003; 282: 90–100
 - 22.- Wang MH, Yoshimura T, Skeel A, Leonard EJ. Proteolytic conversion of single chain precursor macrophage-stimulating protein to a biologically active heterodimer by contact enzymes of the coagulation cascade. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 3436– 3440
 - 23.-. Santoro MM, Gaudino G, Marchisio PC. The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. *Developmental Cell* 2003; 5: 257– 271
 - 24.- Wang MH, Wang D, Chen YQ. Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1291– 1300.
 - 25.-. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425: 577–584
 - 26.-Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 21491–21494
-

-
- 27.-Saarialho UK, Crouch EC, Parks WC. Matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human exocrine epithelium. *Journal of Investigation Dermatology* 1995; 105: 190– 196
- 28.-Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological approaches to wound Healing-Exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 114:103–113
- 29.- Tecnicas histologicas.corcheteserial online corchete. Available from: Servet.uab.es/histologia/docencia/.../index/T1index.html
- 30.-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [<http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>]. c2001 [cited 2011 Ago 30]. Disponible de: Diario Oficial.
- 31.- Kwon H, Qiu Z, Hashimoto M, Yamamoto K, Kimura T. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *The American Journal of Surgery*. 2009; 197: 503–509
- 32.-Prasad V, Dorle A. Evaluation of ghee based formulation for wound healing activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 107: 38-47
- 33.-Schreml S, Szeimies R, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. *American Academy of Dermatology* 2009; 63: 866-881
- 34.-Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luikb S. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 122: 523–532
- 35.-Stadelmann W, Digenis A, Tobin G. Impediments to Wound Healing. *The American Journal of Surgery* 1998; 176: 39-47
- 36.-A Quirinia, A Viidik. The influence of the age on the healing of normal and ischemic incisional skin wounds. *Mechanisms of Ageing and Development* 1991; 58: 221-232
- 37.-Baie S, Sheikh K. The wound healing properties of *Channa striatus*-cetrimide cream — tensile strength measurement. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 71: 93–100
- 38.-Rashed A, Afifi F, Disi A. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 131–136
- 39.-Lodhi S, Pawar R, Jain A, Singhai A. Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. in rats . *Journal of Ethnopharmacology* 2006;108: 204–210
-

40.- Keller K, Fenske N. Uses of vitamins A, C, and E and related compounds in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1998;39: 611-625

41.-Jones P, Taylor D, Williams D. Analysis and chemical speciation of copper and zinc in wound fluid. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2000; 81:1–10

42.-M Jackson, N Lowe. Physiological role of zinc. *Food Chemistry* 1992; 43: 233-238