



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Evaluación del efecto cicatrizante y
antimicrobiano del extracto acuoso de
Oenothera rosea.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
SOFÍA ALEJANDRA LUNA SANDOVAL**

DIRECTOR: DR. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA

ASESOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA



**ÉSTE TRABAJO RECIBIÓ EL APOYO DEL PROYECTO PAPIIT
IG300315**

MÉXICO D. F., 2016



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.

DEDICATORIA

*A mis padres y a mis hermanos Gabriela, Luis y Minerva,
por su paciencia, su amor y su apoyo incondicional;
Son mi más grande ejemplo de tenacidad,
ustedes han hecho esto posible.*

*A mis sobrinos Fernanda, Gabriel, Arantza y Valeria,
gracias por hacer amenos los momentos que compartimos,
por su cariño y compañía.*

*A Carlos, por la compañía, el apoyo y el cariño
demostrados durante este tiempo.*

A todos ustedes, MUCHAS GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial al **Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara** y al **Dr. Rubén Marroquín Segura** por sus valiosas enseñanzas y orientación para llevar a cabo la investigación y la elaboración de ésta tesis.

Agradezco también al **Biólogo Leonardo Ulises Guzmán Cruz** y a la **M. en C. Balbina Vázquez Benítez**, por su invaluable ayuda en la autenticación del ejemplar de *Oenothera rosea* probado en este trabajo; así como al **M. en C. Marco Antonio Hernández Muñoz** por su colaboración para otorgar un número de registro a dicho ejemplar dentro del Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Por último, les doy las gracias a todos mis profesores que contribuyeron en mi formación profesional, y a todas aquellas personas que de una u otra manera, me han permitido terminar éste trabajo.

Í N D I C E

1. Introducción.....	6
2. Marco Teórico.....	8
2.1. Estructura de la piel.....	8
2.1.1. Epidermis.....	9
2.1.2. Dermis.....	10
2.2. Proceso de cicatrización.....	11
2.2.1. Hemostasia e inflamación.....	11
2.2.2. Fibroplasia.....	14
2.2.3. Depósito de matriz. Características estructurales del colágeno.....	14
2.2.4. Angiogénesis.....	16
2.2.5. Epitelización.....	17
2.2.6. Remodelación y Contracción de la herida.....	18
2.3. Factores que interfieren en el proceso de cicatrización.....	19
2.3.1. Factores locales.....	19
2.3.1.1. Oxigenación.....	19
2.3.1.2. Infecciones.....	20
2.3.2. Factores sistémicos.....	20
2.3.2.1. Edad.....	20
2.3.2.2. Diabetes.....	21
2.3.2.3. Medicamentos.....	21
2.3.2.4. Nutrición.....	22
2.3.2.5. Alcoholismo y Tabaquismo.....	23
2.4. Tipos de cicatrices.....	24
2.4.1. Úlceras cicatriciales.....	24
2.4.2. Cicatrices atróficas.....	24
2.4.3. Cicatrices normotróficas.....	24
2.4.4. Cicatrices hipertróficas.....	25
2.4.5. Queloides.....	25
2.5. Plantas medicinales.....	26
2.5.1. La <i>Centella asiática</i> y el Madecassol.....	27

2.5.2. <i>Oenothera rosea</i>	29
3. Planteamiento del problema.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos.....	31
5.1. Objetivo General.....	31
5.2. Objetivos particulares.....	31
6. Material y Métodos.....	32
6.1. Diseño (Tipo de estudio).....	32
6.2. Universo (Población y muestra).....	32
6.3. Variables.....	32
6.3.1. Variables independientes.....	32
6.3.2. Variables dependientes.....	32
6.4. Técnicas.....	32
6.4.1. Obtención del Extracto acuoso de <i>Oenothera de rosea</i>	32
6.4.2. Preparación del ungüento al 4% del extracto acuoso de <i>O. rosea</i>	33
6.4.3. Evaluación del efecto cicatrizante en ratones macho CD1.....	34
6.4.4. Determinación de Hidroxiprolina en tejido cicatrizado.....	36
6.4.5. Determinación de Nitritos.....	39
6.4.6. Ensayo Antibacteriano.....	41
6.4.7. Ensayo Antimicótico.....	44
6.5. Análisis estadístico.....	46
7. Resultados.....	47
8. Discusión de resultados.....	51
9. Conclusiones.....	56
10. Propuestas.....	57
11. Anexo.....	58
12. Referencias.....	60

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cerca del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades primarias de salud. De acuerdo a la OMS, una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal que en uno o varios de sus órganos contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

Las plantas medicinales en México forman parte importante de la historia y cultura del país; el uso y aplicación de los remedios herbolarios constituyen un conocimiento que aún se transmite de generación en generación como parte de una tradición; sin embargo, no se cuenta con estudios suficientes que comprueben la eficacia de las plantas utilizadas para fines medicinales ni de los remedios derivados de éstas.

Existe un gran número de especies vegetales a las que se les han atribuido propiedades farmacológicas; tal es el caso de *Oenothera rosea*, planta comúnmente conocida como “hierba del golpe”, la cual es usada como antiinflamatorio, además de usarse como desinfectante y cicatrizante en afecciones de la piel, en éstos casos se utiliza el cocimiento o la infusión de manera local como cataplasmas o en lavados. Por tal motivo, ésta planta ha sido estudiada y se ha demostrado que posee ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en sus hojas; éstos componentes fitoquímicos se han asociado a diversos efectos farmacológicos. Por ejemplo, algunos ácidos fenólicos han demostrado tener actividad antimicrobiana, por otro lado, los flavonoides además de tener efectos antimicrobianos también tienen efectos antiinflamatorios.

Hasta el momento se han evaluado algunas actividades farmacológicas *in vitro* de extractos acuosos y metanólicos de *O. rosea*, por ejemplo, el efecto antiinflamatorio y el efecto antibacteriano contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Vibrio cholerae*. Estos estudios han arrojado resultados que demuestran que *O. rosea* posee componentes con propiedades farmacológicas.

Con base al conocimiento empírico y a las investigaciones que prueban que *O. rosea* posee componentes fitoquímicos los cuales pueden ser responsables de la actividad

antiinflamatoria y antibacteriana demostrada en estudios previos; se consideró posible que dicha planta también tenga actividad cicatrizante, por lo que en este ensayo se evaluó el efecto cicatrizante de un ungüento al 4% de un extracto acuoso de *O. rosea* sobre lesiones expuestas de ratones macho CD1, haciendo una comparación con los resultados obtenidos con el uso de Madecassol® como control positivo y Vaselina como control negativo. Por otra parte, se realizó la determinación de 4-Hidroxiprolina, (aminoácido que suele encontrarse únicamente en el colágeno) como indicador de la eficacia con la que se llevó a cabo el proceso de cicatrización.

Tanto la actividad antiinflamatoria como la antimicrobiana se encuentran asociadas a la actividad cicatrizante; ya que dos de los factores más importantes que afectan el proceso de cicatrización son el riesgo de infección de la herida así como las alteraciones que interfieren con la fase inflamatoria; lo que conlleva complicaciones que retrasan la sana cicatrización de las heridas; por lo que de manera complementaria se realizó la determinación de nitritos en el suero de los ratones para evaluar el efecto de los tres tratamientos sobre la fase inflamatoria, así como para descartar el posible desarrollo de un proceso infeccioso en las lesiones durante su cicatrización la cual pueda prolongar la fase inflamatoria y con ello la reparación del tejido. Los nitritos son el metabolito estable derivado del óxido nítrico, éste último es un mediador de la inflamación cuyas funciones abarcan la capacidad de inducir la síntesis de la COX -2 además de tener efectos bactericidas y vasodilatadores; sus concentraciones son detectables solo cuando existe de por medio un proceso inflamatorio.

Asimismo aunque ya se han realizado estudios para evaluar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de *O. rosea* se consideró importante para este estudio realizar la evaluación del efecto antimicrobiano del extracto sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, por ser microorganismos oportunistas encontrados con frecuencia en heridas quirúrgicas infectadas además de ampliar la evaluación antimicrobiana del extracto acuoso sobre una bacteria Gram positiva y sobre un organismo fúngico.

2. MARCO TEÓRICO

Las cicatrices se producen como parte de la respuesta fisiológica normal del organismo a una alteración de la integridad de cualquiera de los tejidos que lo componen. La cicatrización de todos los tejidos comparten procesos de reparación similares, sin embargo, existen diferencias entre la cicatrización de tejidos especializados como el tubo digestivo y el tejido fetal, los cuales, al finalizar el proceso de reparación lo hacen sin la formación de una cicatriz.¹

La piel es el órgano en el que se han estudiado de manera exhaustiva los mecanismos de cicatrización, debido a la posición que ocupa en el cuerpo en donde cumple su función protectora frente a cualquier agresión externa. Éste estudio se enfoca en el proceso de cicatrización cutánea lo que hace importante conocer la estructura de la piel y su composición, así como la función de las células que la constituyen, para poder comprender el desarrollo de su reparación.

2.1. ESTRUCTURA DE LA PIEL.

La piel cubre la superficie externa del cuerpo y es el órgano más grande; en los adultos ocupa una superficie de alrededor de 2m² y pesa entre 4.5 y 5 kg, lo que equivale al 7% del peso corporal total aproximadamente. Su espesor varía, por ejemplo, en el párpado mide 0.5mm, mientras que en el talón llega a medir 4mm, sin embargo, en la mayor parte del cuerpo su espesor oscila entre 1 y 2mm. ²

La piel consta de dos partes principales; la porción más delgada se denomina **epidermis** y se encuentra compuesta por tejido epitelial no vascularizado; la porción más profunda y gruesa está compuesta por tejido conectivo vascularizado, a ésta parte se le denomina **dermis**. Debajo de la dermis está el tejido subcutáneo, y no forma parte de la piel, a ésta capa se le denomina **hipodermis** y está constituida por tejido areolar y adiposo. El tejido subcutáneo almacena grasa y contiene vasos sanguíneos grandes que irrigan la piel; ésta región y en ocasiones la dermis, contienen terminaciones nerviosas que son sensibles a la presión. ² (Fig. 2.1)

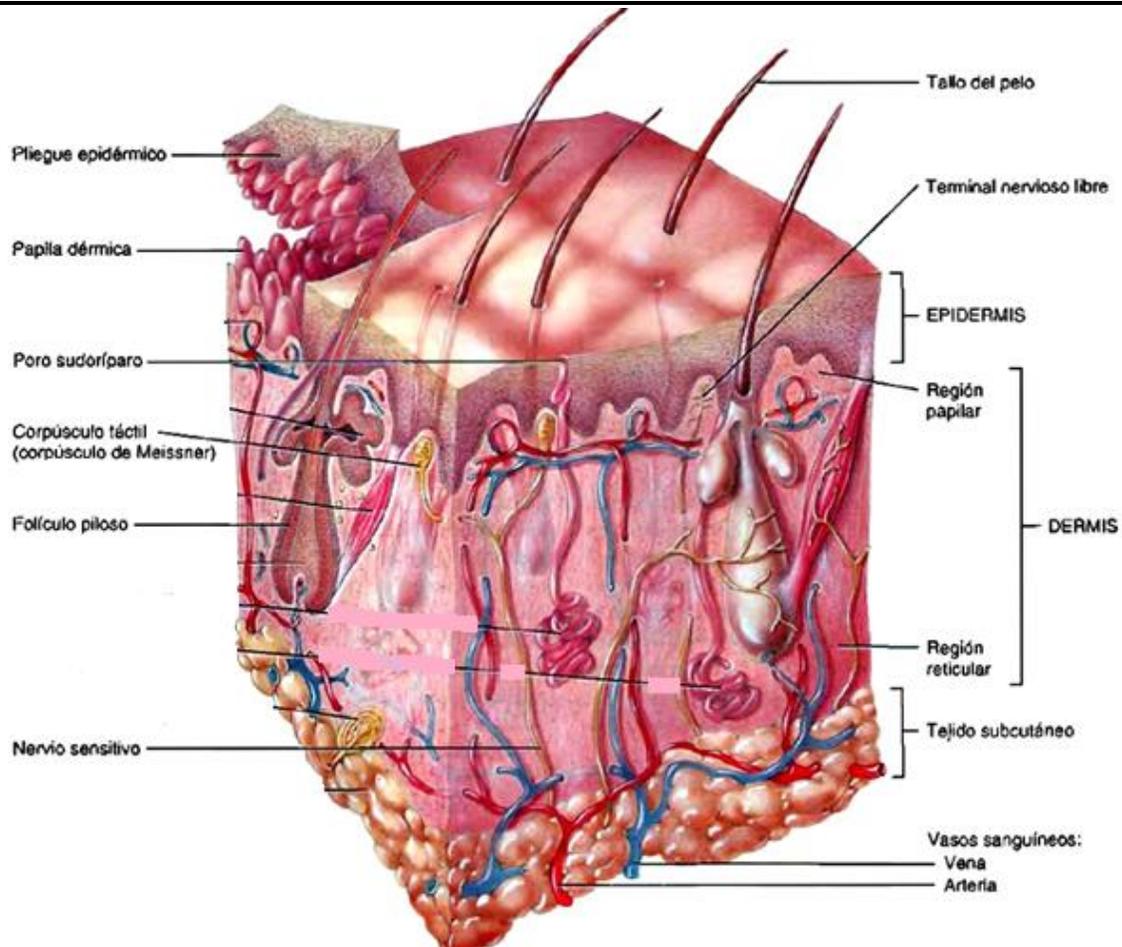


Figura 2.1. Corte de la piel y la capa subcutánea.

2.1.1. Epidermis.

La **epidermis** está constituida por un epitelio pavimentoso estratificado queratinizado; contiene cuatro tipos principales de células: *queratinocitos*, *melanocitos*, *células de Langerhans* y *células de Merkel*.²

Los **queratinocitos** conforman alrededor del 90% del total de las células epidérmicas; se encuentran distribuidos en cuatro o cinco capas y sintetizan la proteína queratina, proteína fibrosa resistente que ayuda a proteger a la piel y a los tejidos subyacentes de las abrasiones, el calor, los microorganismos y compuestos químicos. Los queratinocitos también producen gránulos lamelares que liberan un sellador que repele el agua, disminuyendo la entrada y la salida del líquido, además de impedir el ingreso de materiales extraños.²

Los **melanocitos** constituyen alrededor del 8% de las células de la epidermis, su principal función es la de producir el pigmento melanina; pigmento de color amarillo-rojizo o pardo-negruzco que le otorga color a la piel y absorbe los rayos ultravioleta nocivos. ²

Las **células de Langerhans** se originan de la médula ósea y migran a la epidermis, dónde constituyen una pequeña fracción de las células epidérmicas, su función consiste en ayudar a otras células del sistema inmunitario a reconocer microorganismos invasores y destruirlos. ²

Las **células de Merkel** son las menos numerosas de la epidermis y están localizadas en la capa más profunda de la epidermis, donde entran en contacto con prolongaciones aplanadas de las neuronas denominadas discos de Merkel, dicho complejo percibe las sensaciones táctiles. ²

2.1.2. Dermis.

La dermis es la segunda porción de la piel y la más profunda, está formada sobre todo por tejido conectivo denso irregular con colágeno y fibras elásticas, puede estirarse y recuperarse con facilidad; su espesor varía entre las distintas regiones corporales y al igual que la epidermis, alcanza su máximo espesor en las palmas de las manos y las plantas de los pies. ²

Las pocas células halladas en la dermis suelen ser fibroblastos, algunos macrófagos y unos pocos adipocitos en la parte más cercana a la hipodermis; los vasos sanguíneos, los nervios, las glándulas y los folículos pilosos (invaginación epitelial de la epidermis) se encuentran en ésta capa. De acuerdo a su estructura tisular, la dermis puede dividirse en una **región papilar** superficial delgada y una **región reticular** gruesa más profunda. ² (Fig. 2.1)

- **Región papilar.**

Representa alrededor de la quinta parte del espesor total de la epidermis y consiste en fibras delgadas de colágeno y elastina; en ella se encuentran pequeñas estructuras mamilares llamadas *papilas dérmicas* que se proyectan hacia la superficie inferior de la epidermis, todas ellas contienen asas capilares (vasos sanguíneos) y algunas también presentan receptores táctiles llamados corpúsculos de Meissner que son terminaciones nerviosas sensibles al

tacto. Todas las diferentes terminaciones nerviosas libres envían señales que dan origen a sensaciones como calor, frío, dolor, cosquilleo y prurito. ²

- **Región reticular.**

Esta zona se encuentra conectada con el tejido subcutáneo (hipodermis) y está compuesta de fibras de colágeno gruesas, fibroblastos y macrófagos dispersos; en la porción más profunda se pueden hallar algunos adipocitos. ²

Las fibras de colágeno y de elastina de la región reticular se entrelazan formando una estructura similar a una red, esta disposición le otorga a la piel resistencia, distensibilidad (capacidad de estirarse) y elasticidad (propiedad de volver a la forma original después del estiramiento). ²

2.2. PROCESO DE CICATRIZACIÓN.

Las lesiones alteran profundamente el medio químico y la estructura de los tejidos, por lo que el medio después de una herida se caracteriza por las alteraciones en el riego sanguíneo que coincide con el proceso inflamatorio, poniéndose en juego diversos mecanismos bioquímicos, fisiológicos y celulares fundamentales para hacer frente al fenómeno. La lucha subsiguiente para reestablecer la normalidad del tejido implica diferentes sucesos que incluyen coagulación, inflamación, angiogénesis, fibroplasia, depósito de matriz, epitelización y contracción; a éste proceso cuyas fases se hallan sobrepuestas se le conoce como cicatrización. ³

2.2.1. Hemostasia e inflamación.

La hemostasia es el proceso de formación de la barrera contra la pérdida de sangre; ésta masa se conoce como coágulo sanguíneo o trombo. Después de una lesión, la herida debe dejar de sangrar para que pueda cicatrizar, por lo que los elementos celulares que participan en la hemostasia también participan en la reparación del tejido. ^{3, 4}

La inflamación es la respuesta defensiva inespecífica del organismo ante un estímulo que puede ser un traumatismo o una infección; los objetivos de éste mecanismo son la

eliminación de microorganismos y la preparación del sitio lesionado para el posterior proceso de reparación. Un traumatismo o una infección activa a los mastocitos para que liberen mediadores de la inflamación desencadenando una serie de reacciones con la intención de neutralizar la agresión.⁵

Los **mediadores de la inflamación** son moléculas de pequeño peso molecular de origen plasmático o celular encargados de las reacciones físicas y químicas que promueven y regulan la respuesta inflamatoria; entre ellos se encuentran los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos), aminas vasoactivas (histamina y serotonina), proteínas (citocinas, interleucinas, factores de crecimiento, factores de necrosis y neuropéptidos) y otras sustancias como el óxido nítrico. Éste último es una molécula endógena de señalización intercelular que se forma a partir del aminoácido L-arginina, a través de la enzima óxido nítrico sintasa de la cual se han descrito dos isoformas; la constitutiva que da lugar a pequeñas cantidades de óxido nítrico durante cortos períodos de tiempo, y la forma inducible, la cual es activada por citocinas proinflamatorias y endotoxinas generando concentraciones de óxido nítrico altas y sostenidas durante una reacción inflamatoria. El óxido nítrico es un potente vasodilatador formado por las células endoteliales, tiene una vida media de 3-50 segundos y su labilidad es debida a su rápida conversión a nitritos y nitratos por el oxígeno.^{5,6}

Por otra parte, la enzima fosfolipasa A2 descompone los fosfolípidos de membrana en glicerol y ácido araquidónico, éste último será el sustrato que utilizará la enzima ciclooxigenasa 2 (COX 2) para producir prostaglandinas y la enzima lipooxigenasa para producir leucotrienos, dichos mediadores son sintetizados principalmente por los mastocitos; mientras que las plaquetas, a partir del ácido araquidónico sintetizan tromboxano A2.⁵

Al principio, las interleucinas y algunos componentes inflamatorios como la histamina, liberada por los mastocitos; las quininas que son polipéptidos presentes en el plasma en forma de zimógeno las cuales son activadas al iniciar el proceso inflamatorio; así como los leucotrienos y las prostaglandinas, promueven la vasoconstricción como ayuda a la hemostasia y luego, propician la permeabilidad vascular para que el plasma sanguíneo y los leucocitos migren hacia el área lesionada produciendo hinchazón y dolor. Otras funciones conocidas de las prostaglandinas y los leucotrienos son la capacidad que tienen de atraer y

activar a otros leucocitos, así como la de aumentar la sensibilidad de los receptores del dolor a la bradiquinina (quinina).^{3,7}

El tromboxano A₂ sintetizado por las plaquetas estimula la vasoconstricción durante la hemostasia y genera la secreción del contenido de los gránulos plaquetarios. Los gránulos alfa de las plaquetas liberan factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF-1), factor α de transformación de crecimiento (TGF- α), factor β de transformación de crecimiento (TGF- β) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales tienen entre sus funciones atraer glóbulos blancos y fibroblastos al sitio de la herida.^{2,3,4}

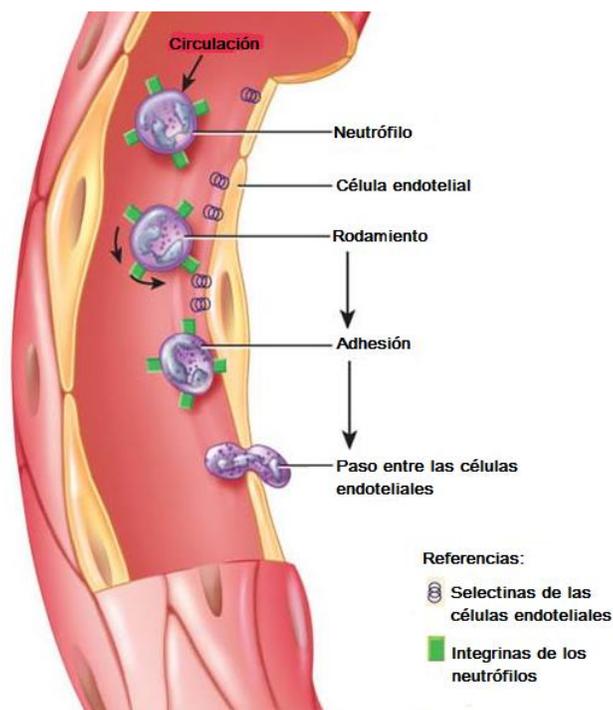


Figura 2. 2. Migración de los glóbulos blancos.

Las células endoteliales dañadas liberan interleucinas (IL-1 e IL-8), induciendo la expresión de receptores de integrina en ellas mismas así como la formación de integrina en las membranas celulares de los linfocitos, quienes han sido atraídos en parte por la presencia en el medio por algunos mediadores proinflamatorios. Moléculas conocidas como selectinas, las cuales se encuentran en las membranas de las células endoteliales, se pegan a hidratos de carbono de la superficie de los linfocitos haciéndolos rodar a lo largo de la superficie endotelial hasta llegar a los receptores de integrina en donde se fijan para finalmente llegar al líquido intersticial del tejido lesionado.^{2,7} (Fig. 2. 2)

La presencia de las células inflamatorias en el lugar de la lesión aumenta la demanda metabólica, por lo que se observa una disminución en la presión parcial de oxígeno y un aumento de dióxido de carbono y lactato; éste último en particular desempeña una parte importante durante la síntesis de colágeno. Estas condiciones persisten durante toda la reparación y junto con otros estimulantes como la fibrina, dirigen a los leucocitos, sobre todo a los macrófagos para que liberen citocinas, factores de crecimiento, sustancias quimioatrayentes y lactato, que contribuirán y regularán la consecuente reparación del tejido, por lo que se deduce que los macrófagos asumen un papel dominante en la síntesis de moléculas de cicatrización conforme caen las señales de reparación de tejido mediadas por la coagulación.^{3,7}

2.2.2. Fibroplasia.

Los fibroblastos y las células endoteliales son la últimas poblaciones que infiltran la herida en cicatrización; el factor más quimiotáctico para fibroblastos es el PDGF. Los fibroblastos reclutados necesitan proliferar y luego activarse para realizar su principal función de síntesis y remodelación de la matriz.⁴

La fibroplasia (replicación de fibroblastos) es estimulada en un principio por los factores liberados por las plaquetas como el PGDF, el IGF-1 y el TGF- β y después por los factores de crecimiento liberados por los macrófagos y los fibroblastos en la herida. Entre los factores de crecimiento y las citocinas involucrados en la replicación de los fibroblastos se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el IGF-1, el factor de crecimiento endotelial (VEGF); las interleucinas IL-1, IL-2, IL-8, además de los factores PDGF, TGF- α , TGF- β y el TNF- α .^{4,7}

Las células endoteliales también proliferan en forma extensa durante esta fase de la cicatrización, estas células migran, se replican y forman nuevos capilares bajo la influencia de citocinas y factores de crecimiento como TNF- α , TGF- β y el VEGF.⁴

2.2.3. Depósito de matriz. Características estructurales del colágeno.

Los fibroblastos recién replicados secretan el colágeno y los proteoglucanos de la matriz del tejido conectivo que unen los bordes de la herida. El colágeno es una proteína fibrosa y es la más abundante en el cuerpo.⁷

La estructura primaria del colágeno es una cadena de aminoácidos levógira que corresponde generalmente a la repetición de un tripéptido Gly-X-Y, donde X es a menudo Prolina (Pro) e Y es a menudo 4-Hidroxiprolina (4-Hyp); éste último es un aminoácido derivado de la prolina que se encuentra raramente en proteínas distintas al colágeno; juega un papel esencial en el plegamiento del colágeno y en el mantenimiento de su estructura.^{8,9}

Se ha deducido que la estructura secundaria del colágeno es una cadena polipeptídica conformada por tres de estas hélices levógiras, las cuales se enrollan entre sí de forma dextrógira. A éstos entramados supramoleculares se les denomina moléculas de tropocolágeno.^{8,9} (Fig. 2.3)

Las hélices que conforman las moléculas de tropocolágeno se encuentran unidas por enlaces covalentes poco habituales en los que intervienen residuos de Lisina (Lys) e Hidroxilisina (HyLys) presentes en algunas posiciones X o Y.⁹

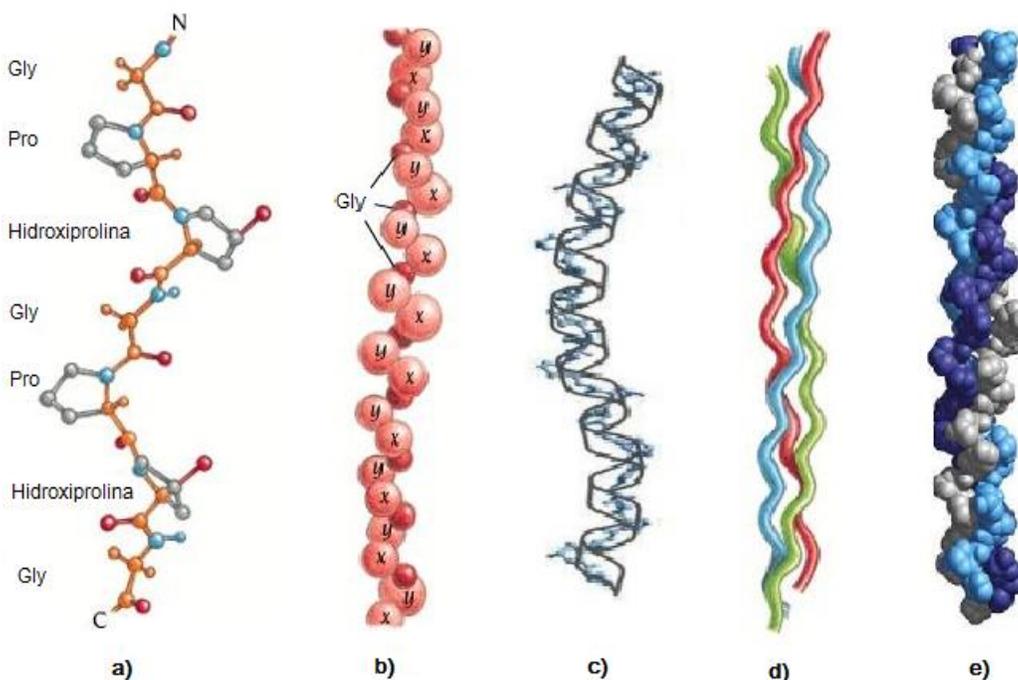


Figura 2. 3. a), b) y c) La secuencia repetitiva tripeptídica Gly-X-Pro o Gly-X-Hyp adopta una estructura helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. d) Tres de éstas hélices (mostradas aquí en verde, azul y rojo) se enrollan entre sí en forma dextrógira, éste entramado se denomina tropocolágeno. e) Modelo de esferas de tropocolágeno.

La síntesis de colágeno no es una prioridad constitutiva de los fibroblastos, pero debe señalarse. Los mecanismos que regulan la estimulación y síntesis de colágeno son

multifactoriales e incluyen factores de crecimiento como el TGF- β e IGF-1, así como entradas metabólicas de acumulación de lactato en el medio extracelular, los cuales favorecen la transcripción de genes para la síntesis de colágeno.^{3,7}

El aumento de RNAm para colágeno da lugar a un incremento de la proteína en el interior de los fibroblastos, pero esto no es suficiente para aumentar el depósito de colágeno en la lesión ya que el colágeno no puede transportarse desde la célula hacia el espacio extracelular hasta que algunas de sus prolinas y lisinas son hidroxiladas. El derivado de la hidroxilación de la prolina (4-Hidroxiprolina), como se explicó anteriormente, juega un papel esencial en el plegamiento del colágeno y en el mantenimiento de su estructura.^{3,9}

En la reacción de hidroxilación de la prolina, que realiza la dioxigenasa prolil hidroxilasa, un átomo de oxígeno se inserta en determinadas prolinas del colágeno en la presencia de ácido ascórbico (Vitamina C), hierro y α -cetoglutarato; mientras que la lisil hidroxilasa, hidroxila algunas lisinas del colágeno y prepara las condiciones para la unión cruzada ulterior entre las hélices y moléculas de colágeno para dar lugar a fibrillas de tropocolágeno las cuales pueden ser liberadas al medio extracelular para ser finalmente depositadas en la lesión.⁴

Los glucosaminoglucanos comprenden una gran porción de la sustancia fundamental que compone el tejido de granulación y rara vez se encuentran libres por lo que comúnmente están acoplados a proteínas para formar proteoglucanos. Los principales glucosaminoglucanos que se encuentran en heridas son el dermatán y el sulfato de condroitina; éstos compuestos son sintetizados por los fibroblastos y su concentración aumenta mucho durante las tres primeras semanas de la cicatrización.⁴

2.2.4. Angiogénesis.

La angiogénesis se vuelve visible alrededor de los cuatro días después de la lesión, pero inicia antes, de forma simultánea con la fibroplasia. Como se mencionó anteriormente durante la fibroplasia también proliferan las células endoteliales las cuáles estructuran los vasos sanguíneos y participan en la formación de nuevos capilares.³

En las heridas que cierran de forma primaria, los brotes de vasos se encuentran y se fusionan con las contrapartes que migran del otro lado de la herida, estableciendo el flujo

sanguíneo por toda la herida; mientras que en las heridas que se dejan abiertas, los capilares que apenas se están formando se conectan con capilares adyacentes que migran en la misma dirección, y se forma tejido de granulación. Éste tejido se caracteriza por ser de aspecto rojizo, granuloso, húmedo y al microscopio muestra estar compuesto por nuevo colágeno, vasos sanguíneos, fibroblastos y células inflamatorias, en especial macrófagos.^{3,4}

Diversos factores de crecimiento y citosinas (TNF- α , TGF- β y el VEGF) estimulan la angiogénesis, pero los experimentos en animales indican que los estimulantes angiogénicos dominantes en las heridas se derivan en primer lugar de las plaquetas y después de los macrófagos.^{3,6}

2.2.5. Epitelización.

Las células epiteliales responden a muchos de los mismos estímulos que los fibroblastos y las células endoteliales. Diversos factores de crecimiento regulan la replicación; por ejemplo, el TGF- β tiende a evitar que las células se diferencien y por lo tanto potencia la mitogénesis; el TGF- α es un mitógeno de célula epitelial.^{3,4}

El proceso inicia en el transcurso de un día y se observa como un engrosamiento de la epidermis en el borde de la herida, la mitosis se da a unas cuantas células de distancia de éste borde. Las nuevas células se desplazan sobre las células del borde y hacia la zona no cicatrizada, tal vez atraídas por un factor de crecimiento o citocina, y se fijan en el primer lugar no epitelizado formando un nuevo borde en la herida. La baja concentración de oxígeno en la zona estimula a las células del epitelio a producir más TGF- β para favorecer la mitosis.

³

Una vez que el defecto se cubre, las células epiteliales pierden su aspecto aplanado y adquieren una forma más cilíndrica; las capas del epitelio se reestablecen y al final la capa superficial se queratiniza. La epitelización y la diferenciación se ven favorecidas cuando las heridas se mantienen húmedas en la superficie; esto puede deberse a que el exudado de las heridas no infectadas contiene factores de crecimiento y lactato, condiciones que recapitulan el ambiente de crecimiento y diferenciación celular.^{3,7}

2.2.6. Remodelación y Contracción de la herida.

Como se mencionó anteriormente, los fibroblastos reemplazan la matriz extracelular de fibrina provisional con colágeno en un patrón que es mucho más fortuito que el normal, dejando cicatrices débiles y endeble. La remodelación de la cicatriz se caracteriza por una reorganización de éste tipo de colágeno provisional; éste proceso es catalizado por colagenasas (metaloproteinasas) secretadas por fibroblastos y leucocitos, de tal forma que existe un equilibrio entre la colagenólisis y su reorganización.⁴

Tanto la cantidad como la calidad del colágeno recién depositado determinan la fuerza y la integridad mecánica de una herida; la formación de fibrillas y el enlace cruzado de las mismas disminuye la solubilidad del colágeno e incrementa la fuerza y la resistencia a la degradación enzimática de la matriz de colágeno. Tanto la síntesis como la lisis del colágeno están controladas de modo estricto por citocinas y factores de crecimiento; por ejemplo, el TGF- β estimula la síntesis de inhibidores tisulares de metaloproteinasa.^{4, 7}

Todas las heridas experimentan cierto grado de contracción; durante el recambio rápido las heridas suelen obtener fuerza y durabilidad, pero están vulnerables a la contracción o el estrechamiento. Se postula que los miofibroblastos son las principales células que producen la contracción, éstas células son un fenotipo especializado que se diferencia de los fibroblastos en que poseen una estructura citoesquelética compuesta generalmente por actina de músculo liso que le confiere capacidad contráctil a la célula misma y por lo tanto al tejido cicatrizado. Algunos estudios han demostrado que los miofibroblastos depositan actina en la cicatriz durante la etapa de remodelación bajo la influencia del factor de transformación de crecimiento β -1(TGF- β 1), el cual es una isoforma del TGF- β .^{10, 11}

Por lo general, los factores de crecimiento en la cicatrización obedecen a controles básicos y la cicatrización se detiene en un punto adecuado; en condiciones normales, los estímulos que promueven la liberación de factores de crecimiento y citocinas parecen ser la hipoxia y la acidosis láctica locales, cuando estos estímulos desaparecen a medida que madura la nueva microcirculación, se detiene la cicatrización.³

2.3. FACTORES QUE INTERFIEREN EN EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN.

Existen múltiples factores que interfieren con el proceso de cicatrización; en términos generales, los factores que influyen en la reparación del tejido después de una lesión se pueden clasificar en locales y sistémicos. Los factores locales son los que influyen directamente con las características de la propia herida, mientras que los factores sistémicos son todos aquellos que tienen relación con el estado general de salud del individuo los cuales afectan su capacidad de cicatrización. Muchos de estos factores están relacionados, y los factores sistémicos actúan a través de los factores locales afectando la cicatrización de las heridas; a continuación se describirán algunos de los más importantes. ¹²

2.3.1. Factores locales.

2.3.1.1. Oxigenación.

El oxígeno es importante para el metabolismo celular especialmente para la producción de energía a partir ATP y es esencial para casi todas las etapas de la cicatrización, por ejemplo, la producción de superóxido por parte de los leucocitos es dependiente de los niveles de oxígeno, ésta molécula contribuye a evitar que las heridas se infecten, además la síntesis óptima de colágeno requiere oxígeno ya que actúa como cofactor en las etapas de hidroxilación de la prolina y la lisina. ^{4, 12}

Aunque al inicio de la cicatrización la hipoxia promueve la fibroplasia, la angiogénesis y la transcripción de genes para la síntesis de colágeno; en aquellas heridas en donde no se reestablece la oxigenación se observa un incremento en el riesgo de infección. Se ha observado que las heridas en tejidos bien vascularizados cicatrizan más rápido y son notablemente resistentes a la infección. ^{4, 7, 12}

Los principales factores que afectan el aporte local de oxígeno incluyen hipoperfusión por razones sistémicas (insuficiencia cardíaca) o por causas locales (insuficiencia arterial, vasoconstricción local o tensión excesiva en los tejidos). ⁴

2.3.1.2. Infecciones.

Una vez que la piel se lesiona, los microorganismos que normalmente se encuentran en la superficie de la piel tienen acceso a los tejidos subyacentes y al torrente sanguíneo, no obstante, la mera presencia de bacterias en una herida no constituye una infección, para mayor claridad los autores diferencian entre contaminación, colonización e infección. *Contaminación* es la presencia de bacterias sin multiplicación, *colonización* se refiere a la multiplicación sin respuesta del hospedador e *infección* implica una respuesta del hospedador como reacción a la presencia de microorganismos y su multiplicación.⁴

Las infecciones pueden originar cierres deformantes, desagradables o tardíos, debido a que la presencia de microorganismos patógenos en la herida prolonga la respuesta inflamatoria del paciente. La inflamación es un proceso normal de la cicatrización de heridas y es importante para la eliminación de microorganismos contaminantes, sin embargo, ésta etapa puede extenderse como consecuencia de una eliminación incompleta de dichos microorganismos.

Tanto las bacterias como las endotoxinas pueden conducir a la liberación prolongada de citocinas pro-inflamatorias tales como la IL-1, el TNF- α , así como de óxido nítrico; factores que promueven la inflamación local, la acumulación de neutrófilos y la fagocitosis. La inflamación prolongada conduce a una mayor síntesis de metaloproteínas, familia de enzimas que pueden degradar la matriz extracelular del tejido conectivo de la piel, pudiendo generar ulceraciones.^{3, 4, 14}

2.3.2. Factores sistémicos.

2.3.2.1. Edad.

Muchos estudios realizados a nivel celular y molecular han examinado los cambios relacionados con la edad y los retrasos en la cicatrización de heridas; se reconoce comúnmente que en adultos mayores sanos, el efecto del envejecimiento provoca un retraso temporal en la cicatrización de la herida, pero no representa un impedimento real en términos de calidad en la cicatrización. Éste retraso se asocia con una respuesta inflamatoria alterada, como consecuencia de la infiltración tardía de linfocitos T en el área de la herida con

alteraciones en la producción de citocinas y la reducción de la capacidad fagocítica de los macrófagos. Estudios en roedores han demostrado que en ratones ancianos existe un retraso en las fases de epitelización, síntesis de colágeno y angiogénesis en comparación con ratones más jóvenes.¹⁴

2.3.2.2. Diabetes.

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico que incrementa las tasas de infección e interfiere con la cicatrización de las heridas; la diabetes no controlada disminuye la respuesta inflamatoria, la angiogénesis y la síntesis de colágeno. Varios estudios que han investigado los mecanismos detrás de la restauración de la vascularización en las heridas diabéticas sugieren que existe una disminución de VEGF y de factor de crecimiento pro- angiogénico en las heridas.^{4,15}

Según estudios de heridas en animales diabéticos experimentales, la insulina reestablece la síntesis de colágeno y la formación de tejido de granulación, si se administra durante las fases tempranas de la cicatrización. En pacientes diabéticos, varias funciones celulares alteradas se encuentran relacionadas con el fracaso en la cicatrización de heridas, por ejemplo, existen defectos en la quimiotaxis de leucocitos a la zona de la herida así como en la capacidad fagocítica de los macrófagos; del mismo modo suelen describirse defectos en la proliferación de fibroblastos y las células epidérmicas.^{16, 17}

2.3.2.3. Medicamentos.

Los medicamentos que interfieren con la formación de coágulos o la función plaquetaria, la respuesta inflamatoria y la proliferación de células tienen la capacidad de afectar la cicatrización de las heridas.^{4, 12}

Los *glucocorticoides* son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona; su uso prolongado interfiere con el proceso inflamatorio por lo que inhiben la respuesta inmune, dando como resultado un aumento en el riesgo de infección en la herida, además inhiben la proliferación de fibroblastos, así como la síntesis de colágeno.^{3, 4, 12}

Los fármacos quimioterapéuticos están diseñados para inhibir el metabolismo celular y la división celular; estos medicamentos inhiben la síntesis de ADN y ARN, por lo que también inhibe la síntesis de proteínas lo cual resulta en la disminución de la fibroplasia, la angiogénesis, la síntesis de colágeno así como la formación de matriz para regenerar el tejido conectivo de la piel. ¹²

2.3.2.4. Nutrición.

El consumo nutricional deficiente altera de modo notable muchos aspectos de la cicatrización de heridas; aunque la interacción completa de la nutrición y la cicatrización de heridas aún no se comprende a plenitud, se han realizado estudios que pueden ayudar a desarrollar intervenciones nutricionales específicas para heridas y contribuir con su sanación.

En un estudio, roedores experimentales alimentados con una dieta de 0 a 4% de proteínas experimentaron un deterioro del depósito de colágeno con disminución secundaria en la fuerza de rotura de la herida de la piel y la fascia, y un incremento en las tasas de infección de heridas. La inducción de estados deficientes de energía al proporcionar sólo el 50% del requerimiento calórico normal produce una disminución en la formación de tejido de granulación y en el depósito de proteínas de matriz en ratas. El ayuno agudo en ratas deteriora mucho la síntesis de colágeno, el cual está asociado con una disminución de RNAm para la síntesis de colágeno. ¹⁸

Las vitaminas que se vinculan más de cerca con la cicatrización de la herida son la C y la A. Desde el punto de vista bioquímico la vitamina C se requiere para la conversión de prolina y lisina en hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente. Asimismo la deficiencia de vitamina C está asociada a una mayor incidencia en la infección de las heridas; se cree que estos efectos se deben al deterioro de la función de los neutrófilos, disminución de la actividad del complemento y reducción del aislamiento de bacterias, secundaria al depósito insuficiente de colágeno. ⁴

La vitamina A aumenta la respuesta inflamatoria en la cicatrización de la herida, tal vez al incrementar la labilidad de las membranas lisosómicas; se observa un mayor ingreso de macrófagos, con aumento de su activación y síntesis de colágeno; además eleva en forma directa la producción de colágeno y de receptores del factor de crecimiento epidérmico

cuando se añade *in vivo* a fibroblastos cultivados. Además los complementos de vitamina A pueden revertir los efectos inhibidores de los corticoesteroides en la cicatrización de heridas.

19, 20

2.3.2.5. Alcoholismo y Tabaquismo.

Experimentos realizados en roedores demostraron que una exposición aguda al etanol puede dar lugar a la alteración de la cicatrización de heridas al interferir con la respuesta inflamatoria, además de inhibir los procesos de epitelización, angiogénesis y la producción de colágeno en la herida.¹²

Así mismo, los pacientes fumadores después de cualquier tipo de cirugía, muestran un retraso en la cicatrización de heridas y un aumento en una variedad de complicaciones tales como infección, rotura de la herida, necrosis y una disminución en la resistencia a la tracción de las heridas.^{12, 21}

La mayoría de los estudios se han centrado en los efectos que ejercen la nicotina, el monóxido de carbono y el cianuro de hidrógeno del humo del tabaco, sobre el proceso de cicatrización. Con ello se ha demostrado que la nicotina puede causar disminución del flujo sanguíneo en el tejido a través de los efectos vasoconstrictores que provoca, por lo que interfiere con el suministro de oxígeno induciendo isquemia tisular, también aumenta la viscosidad de la sangre debido a que genera una disminución en la actividad fibrinolítica y provoca un aumento de la adhesividad plaquetaria. El monóxido de carbono en el humo del cigarrillo también causa hipoxia tisular debido a que éste se une fuertemente a la hemoglobina con una afinidad 200 veces mayor que el oxígeno, lo que resulta en una fracción disminuida de hemoglobina oxigenada en la sangre (hipoxia); el cianuro de hidrogeno tiene un efecto similar a la provocada por el monóxido de carbono, ya que también se une a la hemoglobina con una afinidad mayor que la que presenta el oxígeno, aumentando el estado de hipoxia en el tejido lesionado.^{12, 21, 22}

2.4. TIPOS DE CICATRICES

La cicatriz cutánea se define como la alteración macroscópica de la estructura y función normales de la piel, originada por la aparición de tejido dérmico fibroso de reemplazo, que se desarrolla tras la curación de un traumatismo, quemadura o herida quirúrgica. ¹

En condiciones normales, una vez finalizado el proceso de curación, la elevación de la cicatriz no debe divergir de la piel circundante. Las alteraciones en las fases del proceso de cicatrización pueden determinar la aparición de heridas crónicas o cicatrización excesiva, ésta última puede ser tan importante en términos clínicos como la falta de cicatrización.

2.4.1. Úlceras cicatriciales.

Las **úlceras cicatriciales** se caracterizan por la presencia de una ulceración en el centro de la herida debida a fenómenos isquémicos producidos por el estrangulamiento de los vasos como consecuencia de la fibrosis cicatricial profunda y periférica; el epitelio superficial no consigue cubrir la herida o es frágil y se ulcera ante agresiones mínimas, pueden aparecer en heridas profundas y de gran tamaño que curan por segunda intención, en su evolución tórpida puede inducir fenómenos degenerativos pareciendo un carcinoma epidermoide. ²³

2.4.2. Cicatrices atróficas.

Las **cicatrices atróficas** se generan tras la destrucción del colágeno dérmico, aparecen cuando se produce una formación insuficiente de tejido conectivo por una desorganización del proceso de curación; se caracterizan por ser cicatrices planas y deprimidas por lo general son pequeñas, a menudo redondas y suelen surgir tras un proceso como puede ser el acné o la varicela. ²³

2.4.3. Cicatrices normotróficas.

Las **cicatrices normotróficas** se producen cuando la cicatriz no ha madurado completamente y curan en general con contracción de tejido, aparecen tras heridas de gran

tamaño y secundarias a quemaduras en las articulaciones o pliegues de la piel, suelen ser incapacitantes y disfuncionales. ²³

2.4.4. Cicatrices hipertróficas (HTS).

Las cicatrices hipertróficas se desarrollan por encima del nivel de la piel (rara vez se elevan más de 4mm), permanecen dentro de los confines de la herida original. Se desarrollan en el transcurso de cuatro semanas del traumatismo y el riesgo aumenta si la epitelización requiere más de 21 días sin importar el sitio, la edad y raza. Por lo general ocurren en áreas de tensión y superficies flexoras, que tienden a encontrarse en ángulos rectos como las articulaciones o pliegues cutáneos. ⁴

Histológicamente muestran un incremento del grosor de la epidermis, hay abundancia de colágeno y depósito de glucoproteínas. La piel normal tiene haces de colágeno nítidos, la mayor parte paralelos a la superficie epitelial, con uniones aleatorias entre los haces mediante cadenas fibrilares finas de colágeno. En las HTS los haces de colágeno son más planos, más aleatorios y las fibras se encuentran en un patrón ondulado. ²⁴

2.4.5. Queloides.

Los queloides se definen como cicatrices que se forman por arriba del nivel de la piel y crecen más allá de los confines de la herida original, rara vez remiten de manera espontánea; ocurren con una frecuencia 15 veces mayor en individuos de piel oscura, así como en individuos de etnias africanas, hispanas y asiáticas. ^{4, 24}

Histológicamente, los queloides casi no tienen haces de colágeno y las fibras se unen de manera aleatoria en hojas laxas con una orientación desordenada respecto al epitelio, las fibras de colágeno son más grandes y gruesas, y por lo general no existen miofibroblastos. ²⁴

Los fibroblastos queloidales tienen parámetros de proliferación normales, pero sintetizan colágeno a un índice 20 veces mayor del que se observa en fibroblastos dérmicos normales y tres veces más alto que los fibroblastos derivados de las HTS. Ésta perturbación de la actividad de síntesis de colágeno se debe a que tanto los fibroblastos de los queloides

como los fibroblastos de las cicatrices hipertróficas (HTS) responden a concentraciones más bajas de TGF- β , comparándose con los fibroblastos normales de la dermis.^{4, 25}

Los mecanismos que originan las HTS y los queloides se desconocen, sin embargo, la formación de éste tipo de cicatrices está siempre precedida de una prolongación y/o exageración de la fase inflamatoria de la cicatrización, por lo que cualquier mecanismo (tensión mecánica, irritación, infección) que promueva el aplazamiento de la respuesta inmune/inflamatoria pueden conducir a la producción de concentraciones anormales de citocinas profibróticas, lo que se traduce en un aumento de síntesis de matriz extracelular, lo cuál es la base en la fisiopatología de éstos desórdenes.²⁷

2.5. PLANTAS MEDICINALES

Si bien la medicina moderna está bien desarrollada; grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen del uso de plantas medicinales y los medicamentos herbarios para resolver sus problemas de salud. El interés por las plantas medicinales y el reconocimiento de su valor farmacéutico ha aumentado en los países industrializados, debido a la importancia que éstas han adquirido en la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo porque los constituyentes de éstas plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos.²⁸

De acuerdo a la OMS (1978) una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. La OMS promovió el estudio de las plantas medicinales como fuente de medicamentos dentro del programa "Salud para todos" en el año 2000, donde se concertó impulsar la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, estableciéndose que las prácticas peligrosas se eliminarían y sólo se promoverá lo que fuese seguro y eficaz, ya que el hecho de que los principios activos de las plantas medicinales sean de origen natural no significa siempre que sean inocuos.²⁹

En México las plantas medicinales han formado parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas; el uso y aplicación de estos remedios constituyen un

conocimiento que aún se transmite de generación en generación como parte de una tradición, sin embargo, no se cuenta con estudios suficientes para comprobar la eficacia de las plantas utilizadas para fines medicinales ni de los remedios derivados de éstas. Tal situación representa un problema en el sector salud debido a que gran parte de la población que tiene acceso limitado o nulo a la atención médica y medicamentos, continúa haciendo uso de remedios herbolarios con base solo en conocimientos empíricos.

Las plantas tienen la capacidad de sintetizar una amplia variedad de compuestos orgánicos, la mayoría de ellos son metabolitos secundarios, de los cuales al menos 12 000 han sido aislados, lo que es equivalente a menos del 10% del total. En muchos casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa para las plantas contra microorganismos nocivos, insectos y herbívoros; algunos de estos componentes están relacionados con las propiedades farmacológicas atribuidas a las plantas medicinales.³⁰

Entre los componentes fitoquímicos con acciones farmacológicas que pueden mejorar o favorecer el proceso de la cicatrización se encuentran algunos **componentes fenólicos** como los ácidos fenólicos y los flavonoides, los cuales han mostrado tener efectos antimicrobianos; algunos flavonoides además de tener efectos antimicrobianos también tienen actividad inhibidora sobre enzimas como la lipooxigenasa, las ciclooxigenasas y la sintasa de óxido nítrico inducible, enzimas que regulan la respuesta inflamatoria, por lo que los flavonoides son considerados como agentes antiinflamatorios; asimismo algunos **triterpenos** (compuestos constituidos por varias unidades de isopreno), además de mostrar actividad antimicrobiana y antiinflamatoria también se les ha relacionado con la estimulación de la síntesis de glucosaminocanos y colágeno en estudios hechos en ratas.^{30, 31}

2.5.1. La *Centella asiática* y el Madecassol.

La búsqueda y el aislamiento de nuevos principios activos a partir de plantas medicinales ha proporcionado herramientas firmes para el progreso de la farmacología; ciencia en la que la farmacognosia ha contribuido con el desarrollo de nuevos fármacos a partir de principios activos de origen vegetal o fitoquímicos, mismos que como se mencionó con anterioridad, sirven de base para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Un ejemplo de ello es la *Centella asiática*, planta utilizada en las medicinas tradicionales asiáticas y africanas por sus propiedades cicatrizantes, analgésicas, antimicrobianas y antivirales. Ésta planta pertenece a la familia *Apiaceae*, es originaria de la zona tropical del océano Índico (India, China, Indonesia, Australia, Srilanka, Madagascar, África del Sur). Se trata de una planta perenne, herbácea, polimorfa de aproximadamente 20cm de altura con hojas en forma de riñón; las inflorescencias (de tres a seis flores sésiles) son de color rojizo aunque algunas variedades pueden ser blanquecinas (Fig. 2.4); a dicha planta se le han comprobado varias propiedades farmacológicas asociadas con la aceleración y mejora del proceso de cicatrización, basadas en experimentos *in vivo*, tales como el aumento de hiperplasia celular y la producción de colágeno en lesiones realizadas en roedores, así como el aumento de los niveles de tejido de granulación, proteínas y colágeno total; dichos procesos son de vital importancia durante el proceso de cicatrización de las heridas.³²



Fig. 2. 4. *Centella asiática* con inflorescencias blanquecinas.

Entre los componentes con actividad farmacológica que han sido identificados de *Centella asiática* se encuentran compuestos triterpénicos como el ácido asiático, el ácido asiaticósido y el madecásico; además de algunos flavonoides como el kampferol y la quercetina. El Madecassol es un fármaco cuyo principio activo es el extracto de las hojas de *Centella asiática*, el cual es utilizado como cicatrizante en presentaciones farmacéuticas semisólidas y en polvo de aplicación tópica con concentraciones que van del 1 al 2%.^{32,33}

2.5.2. *Oenothera rosea*.

Oenothera rosea es una hierba perenne de 10 a 15 cm de alto, con hojas elípticas de bordes enteros o denticulados, de floraciones rosadas o lilas con pétalos de 5 a 10 mm de longitud; usualmente es conocida como “hierba del golpe”. (Fig. 2. 5) La infusión acuosa de ésta planta es usada para aliviar dolores hepáticos y problemas renales; también es frecuente su uso como antiinflamatorio, desinfectante y cicatrizante en afecciones de la piel; en estos casos se utiliza el cocimiento o la infusión de manera local como cataplasmas, emplastos o en lavados, aunque en ocasiones se emplee de ambas formas. ^{34, 35}



Fig. 2.5. *Oenothera rosea*.

Por tales motivos es que ésta planta ha sido objeto de estudio y se ha demostrado que posee ácidos fenólicos, flavonoides como la miricetina, la quercetina y el kaempferol; además de antocianinas como la cianidina, éstos componentes fitoquímicos suelen asociarse a efectos farmacológicos en algunas plantas medicinales como los descritos al inicio de ésta sección. ^{29, 36}

Además se han realizado estudios para evaluar su efecto antiinflamatorio mediante el modelo del granuloma en ratas wistar, así como el efecto antibacteriano en *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Vibrio cholerae*, en donde los resultados mostraron que tanto el extracto acuoso y metanólico de la planta lograron disminuir e inhibir significativamente el proceso inflamatorio y el desarrollo bacteriano, respectivamente. ^{37, 38}

Las plantas medicinales en México forman parte importante de la historia y cultura del país; el uso y aplicación de los remedios herbolarios constituyen un conocimiento que aún se transmite de generación en generación como parte de una tradición; sin embargo, no se cuenta con estudios suficientes que comprueben la eficacia de gran parte de las plantas utilizadas para fines medicinales ni de los remedios derivados de éstas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos factores afectan el proceso de cicatrización de las heridas; por ejemplo, dicho proceso se ve considerablemente afectado por factores como la irrigación sanguínea y la provisión de oxígeno, los cuales determinan la resistencia de la herida a una posible infección. En algunos individuos el proceso de reparación tisular resulta alterado, generando complicaciones en las que la cicatrización se extiende más allá de los límites de la herida original, o bien, se generan heridas crónicas que conducen a la ulceración del tejido. Por ello, el hallazgo y estudio de agentes que puedan favorecer el proceso de cicatrización es de vital importancia.

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes patologías sigue siendo una alternativa para atender los problemas de salud primarios entre la población mundial. Diversos productos derivados de plantas han mostrado tener un resultado favorable en el tratamiento de heridas; por ejemplo, el proceso de cicatrización se ha visto beneficiado por constituyentes fitoquímicos como los ácidos fenólicos y los flavonoides, los cuales poseen efectos antimicrobianos y antiinflamatorios; asimismo algunos triterpenos, además de tener tales efectos, han mostrado promover la síntesis de matriz extracelular la cual sustituirá el tejido dañado en una lesión.

El uso principal de *Oenothera rosea* abarca el tratamiento de diversos padecimientos o lesiones que se manifiestan en la piel; la infusión o el cocimiento de esta planta suele utilizarse de forma oral o local como antiinflamatorio, aunque también es común su uso como desinfectante y cicatrizante. Se han realizado estudios que comprueban la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos en *O. rosea*; también se han realizado experimentos para evaluar el efecto antiinflamatorio así como el efecto antibacteriano sobre algunas enterobacterias, pero aún no hay estudios que demuestren la actividad cicatrizante de *O.*

rosea, así como tampoco existen estudios que extiendan la evaluación antimicrobiana de la planta sobre microorganismos distintos a las enterobacterias; por lo tanto, nos hemos planteado la siguiente pregunta:

¿El extracto acuoso de *Oenothera rosea* mostrará actividad cicatrizante, así como actividad antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*?

4. HIPÓTESIS

Con base al conocimiento empírico y a la evidencia experimental que indica que *Oenothera rosea* posee componentes fitoquímicos los cuales pueden ser los responsables de que el extracto acuoso y metanólico de la planta muestre propiedades antibacterianas y antiinflamatorias; se espera que el extracto acuoso de *Oenothera rosea* presentará efecto cicatrizante sobre lesiones expuestas realizadas en ratones macho CD1, así como actividad antimicrobiana *in vitro* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

Evaluar la actividad cicatrizante y antimicrobiana del extracto acuoso de *Oenothera rosea*.

5.2. Objetivos Particulares:

- Determinación de Hidroxiprolina en el tejido cicatrizado de los ratones CD1.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Oenothera rosea* en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar la actividad antimicótica del extracto acuoso de *Oenothera rosea* en una cepa de *Candida albicans*.
- Determinación de Nitritos en el suero de los ratones.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño (Tipo de estudio).

Experimental.

6.2. Universo (Población o muestra).

18 Ratones macho CD1.

6.3. Variables.

6.3.1. Variable independiente:

Tratamiento	}	Madecassol®
		Vaselina
		Ungüento al 4% del extracto acuoso de <i>O. rosea</i>

6.3.2. Variables dependientes:

Diámetro inicial y final de las lesiones.

Cantidad de Hidroxiprolina en los tejidos.

Cantidad de Nitritos en suero.

Diámetro de la zona de inhibición.

6.4. Técnicas.

6.4.1. Obtención del Extracto acuoso de *Oenothera rosea*.

Material:

Material de laboratorio

Matraz Erlenmeyer 2L

Vaso de precipitados 100mL

Gasa no estéril

Papel filtro

Mortero con pistilo

Equipo e Instrumentos

Balanza granataria OHAUS

Balanza analítica ADAMS

Rotavapor RE300 Yamato

Bomba de vacío Koblenz

Estufa ShellLab

Reactivos

Agua destilada

100g de *O. rosea* seca

Procedimiento:

Se pesaron 106g de la planta completamente seca; los cuales fueron molidos con agua hasta completar 1.5L. La infusión resultante se dejó reposar durante 5 días, durante éste tiempo dicha mezcla se conservó en refrigeración.

Pasado éste tiempo, se procedió a filtrar la mezcla por gravedad sobre una malla de gasa con la finalidad de remover el material fibroso; al líquido obtenido se le filtró nuevamente al vacío sobre papel filtro; luego se procedió a destilar a presión reducida en un rotavapor marca Yamato a una temperatura de 50° C.

Una vez eliminada la mayor cantidad de agua y ya que el extracto tuvo un aspecto viscoso, se detuvo la destilación. El producto viscoso fue removido del matraz bola para colocarlo en un vaso de precipitados; en donde se dejó secar dentro de una estufa a una temperatura de 37°C.

Cuando el extracto se secó completamente, éste fue desprendido de las paredes del vaso para colocarlo en un mortero, en donde los grumos fueron molidos para finalmente pesar el polvo resultante. Se calculó el rendimiento del proceso, obteniéndose 13.1326g de extracto seco equivalentes a un 12.38% de rendimiento.

Nota: El ejemplar de *Oenothera rosea* utilizado en este trabajo, fue autenticado y una muestra de dicha planta se encuentra registrada con el folio 15835 dentro del Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FESZA), UNAM.

6.4.2. Preparación del unguento al 4% del extracto acuoso de *Oenothera rosea*.

Material:

Material de laboratorio	Equipo e Instrumentos	Reactivos
Vasos de precipitados 5, 10 y 25mL	Balanza granataria OHAUS Balanza analítica ADAMS	Vaselina Extracto acuoso de <i>O. rosea</i>
Pipetas graduadas 5 y 10mL	Horno de microondas SONICS	
Varilla de vidrio	Sonicador SONICS	Agua destilada
Espátula		

Procedimiento:

En un vaso de precipitados de 25mL se colocaron aproximadamente 10g de vaselina, la cual fue fundida en un horno de microondas en ciclos de sesenta segundos cuidando que la vaselina no se proyectara.

En otro vaso de precipitados de 5mL se colocaron 400.0mg del extracto acuoso de *Oenothera rosea* los cuales fueron disueltos en 2mL de agua destilada, se hizo uso del sonicador para lograr disolver el polvo.

En otro vaso se colocaron 10mL de vaselina fundida y antes de que solidificara se agregó la disolución acuosa del extracto la cual se mezcló con una varilla de vidrio procurando que la composición quedara homogénea.

6.4.3. Evaluación del efecto cicatrizante en ratones macho CD1.**Material:**

Material de laboratorio	Equipo e Instrumentos	Material biológico
Sacabocado de 10mm de diámetro.	Microcentrífuga Z233M-2 Hermle.	18 ratones macho CD1
Tubos Eppendorf de 2mL	Micropipeta Socorex Swiss 5-50µL	
Jaulas para roedores de laboratorio.	Reactivos	
Bebederos para roedores.	Éter	
Guantes de latex.	Vaselina (Vasenol ®, Unilever)	
Bisturí	Madecassol ® (Sanofi Aventis)	
Hojas para bisturí del No. 10	Ungüento al 4% del extracto acuso de <i>O. rosea</i> .	
Puntas para micropipeta de 10- 100µL	Rodent Lab Chow 5001 Purina®	

Procedimiento:

Se ocuparon 18 ratones machos CD1 con un peso entre 22 y 30 gramos; los animales fueron alimentados con Rodent Lab Chow 5001 Purina ® y agua *ad libitum*; el cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el uso y cuidado de los animales de laboratorio.

Los ratones fueron divididos en tres grupos de seis individuos; un grupo fue tratado con Vaselina (Vasenol ® de Unilever) como control negativo; otro grupo fue tratado con Madecassol ® en pomada (Sanofi Aventis) como control positivo, mientras que el último grupo fue tratado con el ungüento al 4% de extracto, éste último fue el grupo de experimentación.

Para realizar las lesiones se procedió a anestésiar a los ratones en una cámara de éter y posteriormente se les realizó una escisión en la región dorsal con un sacabocado de acero inoxidable de 10mm de diámetro. Los ratones permanecieron separados para evitar que se dañaran la lesión entre ellos.

Después de identificarlos de acuerdo al grupo al que pertenecían se procedió a medir el diámetro de las lesiones, dichas medidas fueron registradas. Durante 15 días los ratones fueron trabajados de acuerdo al tratamiento asignado haciendo uso de guantes para evitar la contaminación de la herida durante la aplicación; y diario, antes de aplicar el tratamiento se midieron los diámetros de las heridas tomando nota de las medidas realizadas.

El día 15 los tres grupos de ratones fueron sacrificados, para esto se procedió a anestésiar a los animales en una cámara de éter y antes de que el animal muriera, se obtuvieron muestras de sangre a partir de una incisión realizada en el plexo axilar con un bisturí; las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf perfectamente identificados y limpios para la determinación de nitritos. Una vez obtenida la muestra se sacrificó a cada ratón mediante dislocación cervical. Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 10000rpm durante cinco minutos; después se retiró la mayor parte del suero de cada muestra, las cuales fueron colocadas en nuevos tubos Eppendorf.

También se obtuvieron muestras del tejido cicatrizado de cada ratón, esto se realizó empleando el mismo sacabocado con el que se realizaron las heridas; las muestras de tejido se guardaron en tubos Eppendorf para la determinación de Hidroxiprolina.

Ambas muestras, tejido y suero, permanecieron en congelación hasta el día en que se realizaron las determinaciones.

6.4.4. Determinación de Hidroxiprolina en tejido cicatrizado.

Material:

Material de laboratorio	Equipo e Instrumentos	Reactivos
Probetas de 25, 50 y 100mL	Balanza granataria OHAUS	Acetato de sodio
Vasos de precipitados de 25, 50, 100, 500, 1000mL	Balanza analítica ADAMS	Ácido cítrico
Matraz aforado 1000mL	Baño metabólico PRECISION	Ácido acético glacial
Tubos Eppendorf de 2mL	Centrífuga Hamilton Bell	Hidróxido de sodio
Tubos de ensaye de plástico 12 x 75	Micropipeta Socorex Swiss 5-50µL	Ácido perclórico
Puntas 10- 100µL	Micropipeta Labsystems 40-200µL	Metilcelosolve
Puntas 100-1000µL	Autoclave	p-dimetilaminobenzaldehído
Gradillas	Microespectrofotómetro UV/VIS Jenway 6305	Cloramina-T
		4- Hidroxiprolina
		Ácido clorhídrico
		Agua destilada

Preparación de Reactivos:

- **Buffer pH 6.5**

Se disolvieron 120g de Acetato de Sodio, 46g de Ácido Cítrico, 12mL de Ácido Acético y 34g de Hidróxido de Sodio en agua destilada. Se ajustó el pH a 6.5 y se aforó el volumen a un litro con agua destilada.

- **Ácido perclórico 3.15M**

Para preparar una solución a 3.15M, se diluyeron 27mL de ácido perclórico al 70% en 100mL de agua destilada.

- **Reactivo de Erlich**

Una solución al 20% se preparó poco antes del ensayo mediante la adición de 100mL de Metilcelosolve (metoxietanol) a 20g de p-dimetilaminobenzaldehído; se colocó la solución en un baño maría a 60°C para disolver el polvo.

- **Cloramina- T**

Éste reactivo fue preparado poco antes del ensayo disolviendo 1.41g de Cloramina-T en 20mL de agua destilada; posteriormente se añadieron 30mL de metoxietanol y 50mL del Buffer a pH 6.5.

- **Solución estándar de Hidroxiprolina**

La solución estándar de Hidroxiprolina se preparó pesando 0.2g de Hidroxiprolina estándar los cuales fueron diluidos en 0.5mL de HCl 0.001N, la solución se colocó en baño maría a 60° C para disolver el polvo.

Esta fue la solución más concentrada (Tubo A) y a partir de ésta se realizaron las siguientes diluciones:

Tubo	Dilución	Concentración Hyp
A	0.2g Hyp+0.5mL HCl 0.001N	200mg
B	250µL de A + 250µL de agua	100mg
C	250µL de B + 250µL de agua	50mg
D	250µL de C + 250µL de agua	25mg
E	250µL de D + 250µL de agua	12.5mg
F	250µL de E + 250µL de agua	6.25mg
G	250µL de F + 250µL de agua	3.125mg

Tabla 6. 1. Relación de diluciones para la determinación de Hidroxiprolina.

Procedimiento: ³⁹

- **Blanco**

Se colocaron 50µL de agua destilada en un tubo de ensaye de plástico 12 x 75, a los cuales se les agregó 450µL de Cloramina-T dejando oxidar durante veinte minutos a temperatura ambiente; posteriormente se adicionaron 450µL Ácido Perclórico 3.15M dejando reposar

cinco minutos. Después fueron añadidos 500µL del Reactivo de Erlich y se dejó incubar la mezcla en baño maría a 60°C durante veinticinco minutos.

Después de dejar enfriar la solución del tubo se centrifugó a 5000 rpm durante cinco minutos. Con ésta solución se procedió a calibrar el microespectrofotómetro a 557nm.

- **Curva Estándar**

Se tomaron 50µL de cada una de las diluciones preparadas anteriormente, éstos fueron trasvasados a tubos de ensaye de plástico 12 x 75; a cada tubo se le adicionaron 450µL de Cloramina-T, se dejó oxidar durante veinte minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron agregados 450µL de Ácido perclórico 3.15M dejando reposar durante cinco minutos. Después se adicionaron 500µL del Reactivo de Erlich y se dejó incubar en baño maría a 60°C durante veinticinco minutos.

Después de permitir que los tubos se enfriaran se procedió a centrifugar a 5000 rpm durante cinco minutos, se separó el sobrenadante de cada tubo y se leyó la absorbancia de cada uno a 557nm en un microespectrofotómetro.

- **Muestras**

Las muestras de las escisiones de cada ratón fueron pesadas y colocadas en tubos Eppendorf, se mantuvieron en congelación hasta el día en que se realizó el ensayo.

A éstas muestras se le adicionaron 500µL de Hidróxido de sodio 2N y posteriormente se sometieron a una temperatura de 120°C en una autoclave durante veinte minutos; pasado este tiempo los tubos fueron sacados de la autoclave y después de permitir que se enfriaran, las muestras fueron centrifugadas a 5000rpm durante diez minutos.

Cuidadosamente, sin tomar trazas del tejido digerido, se apartaron 50µL del sobrenadante de cada muestra, los cuales fueron colocados en tubos de ensaye de plástico 12 x 75. A cada tubo se le adicionó 450µL de Cloramina-T dejando oxidar durante veinte minutos a temperatura ambiente; posteriormente se añadieron 450µL de Ácido perclórico 3.15M dejando reposar cinco minutos. Pasado éste tiempo, fueron adicionados 500µL del Reactivo de Erlich dejando incubar en baño maría a 60°C durante veinticinco minutos.

Después de dejar enfriar los tubos, se centrifugó el contenido a 5000 rpm durante cinco minutos, se separó el sobrenadante y se leyeron las absorbancias a 557nm en el microespectrofotómetro.

6.4.5. Determinación de Nitritos.

Material:

Material de laboratorio	Equipo e Instrumentos	Reactivos
Tubos de ensaye 12x75	Balanza analítica ADAMS	Cadmio metálico
Probeta de 50, 100, 250mL	Rocker platform Bellco	Sulfato cuproso
Vasos de precipitados 500mL	Glass	Ácido clorhídrico
Pipeta volumétrica 1mL	Micropipeta Labsystems 40-	Cloruro de amonio
Matraz aforado 100mL	200µL	Sulfato de Zinc
Puntas estériles 10- 100µL	Micropipeta Socorex Swiss	Ácido acético glacial
Puntas estériles 100-1000µL	5-50µL	Sulfanilamida
Gradillas	Microcentrífuga Hermle	N-(1-naftil)-etilendiamino
	Z233M-2	Nitrito de sodio
	Microespectrofotómetro	Agua destilada
	UV/VIS Jenway 6305	

Preparación de Reactivos:

- **Cadmio.**

Para preparar el cadmio se colocaron aproximadamente 0.5g de Cadmio en tubos de ensaye de 12x75, dicho proceso se realizó en una campana de extracción. El Cadmio se plateo con 2mL de una solución acuosa de Sulfato Cuproso al 5%, se agitó en un rocker durante diez minutos y después se lavó exhaustivamente con agua destilada para eliminar el cobre (tres lavados con el tubo lleno); después se lavó dos veces a tubo lleno con Ácido Clorhídrico 0.1N, para remover todo el Hidróxido de Cadmio II. Finalmente se lavó con una solución de Cloruro de Amonio al 5% cuyo pH fue ajustado a 9.

- **Sulfato de Zinc.**

Se preparó una solución de Sulfato de Zinc disolviendo 30g en 100mL de agua destilada.

- **Ácido acético al 15% v/v.**

Para preparar la disolución de Ácido Acético se midieron 45mL de ácido acético glacial y se disolvieron en 255mL de agua destilada.

- **Reactivo de Sulfanilamida**

Se disolvieron 0.5g de Sulfanilamida en 150mL de ácido acético al 15%, el reactivo fue almacenado en un frasco ámbar protegido de la luz.

- **Reactivo de NED**

Se disolvieron 0.2g de N-(1-naftil)-etilendiamino en 150mL de ácido acético al 15%; el reactivo fue guardado en un frasco ámbar protegido de la luz.

- **Solución estándar de Nitrito de Sodio.**

Para preparar el estándar, se pesaron y disolvieron 0.02g de Nitrito de Sodio en 100mL de agua destilada, después se tomó 1mL de la solución y éste fue diluido en 100mL de agua. Este reactivo se preparó en el momento en que se realizó el ensayo.

Método: ⁴¹

A 100µL de plasma de ratón se le adicionaron 300µL de agua destilada (dilución 1:4), se desecharon 20µL y se le adicionaron 20µL de la solución de ZnSO₄, se mezcló bien y el precipitado se separó por centrifugación a 10000rpm durante 5 minutos. Se desechó el cloruro de amonio de un tubo con cadmio activado y después se le adicionó todo el sobrenadante de la muestra dejando en agitación en un rocker durante 15 minutos (esto se realizó con las 18 muestras de suero).

Posteriormente se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante cinco minutos y se tomaron 200µL* del sobrenadante para el ensayo el cual se realizó según la siguiente tabla:

Tubo	Estándar	Agua destilada
Blanco	0	900 µL
1	100 µL	800 µL
2	200 µL	700 µL
3	300 µL	600 µL
4	400 µL	500 µL
5	500 µL	400 µL
Muestras	200 µL del sobrenadante*	700 µL

Tabla 6.2. Relación de diluciones para la determinación de nitritos.

A todos los tubos, incluido el blanco y los tubos con el estándar para la curva, se le adicionaron 50µl del reactivo de Sulfanilamida y posteriormente se les dejó incubar durante diez minutos a temperatura ambiente. Pasado éste tiempo se procedió a adicionar a cada tubo 50 µL del reactivo NED, se mezcló y se dejó incubar durante treinta minutos a temperatura ambiente. Finalmente se calibró el microespectrofotómetro a 540nm con el estándar, para después determinar la absorbancia de las muestras.

Se tomó nota de las absorbancias; se graficó la curva estándar y con base a estos datos se calculó la concentración de nitritos que hay en cada muestra de suero de ratón.

6.4.6. Ensayo Antibacteriano.

Material:

Material de laboratorio	Equipo e Instrumentos	Reactivos
Cajas Petri de vidrio	Balanza analítica	Agar nutritivo
Hisopos estériles	ADAMS	Agar-agar
Pipeta volumétrica 10mL	Micropipeta Labsystems	Caldo nutritivo
Pipeta graduada estéril 10mL	40-200µL	Solución inyectable estéril
Filtros millipore estériles	Micropipeta Socorex	0.9%
Puntas estériles 10- 100µL	Swiss 5-50 µL	Cápsulas de ciprofloxacino
Puntas estériles 100-1000 µL	Sonicador SONICS	500mg (Ciprofloxi®,
Tubos de ensaye con tapón de baquelita estériles (14x100, 18x180)	Sacacorchos estéril de 5mm de diámetro	Senosian)
Tubos Falcon® estériles de 5mL	Estufa ShellLab	Agua destilada estéril
Lápiz punta diamante	Espectrofotómetro	Extracto acuoso de <i>O. rosea</i>
		Solución yodo-alcohol

Material biológico

*Staphylococcus aureus**

*Escherichia coli**

* Ambas bacterias se encontraban conservadas en capilares mediante el método de criopreservación.

Preparación de Reactivos:

- **Reactivación de la cepa.**

En área estéril con una solución yodo-alcohol se limpiaron los capilares sellados con la bacteria, se cortaron los extremos del capilar con ayuda de pinzas y un lápiz punta diamante para después vaciar el contenido de los capilares en un tubo de ensaye que contenía 10mL de caldo nutritivo estéril; se dejó incubar por 24 horas a 37°C. De la suspensión anterior se sembró la bacteria en tubos con agar nutritivo pico de flauta estériles, dejando incubar a 37°C por 24 horas.

- **Preparación del antibiótico.**

Se pesó el contenido de una cápsula con dosis de 500mg de Ciprofloxacino (Ciproflox® de Laboratorios Senosian) y se realizó el cálculo para pesar la cantidad de polvo equivalente a 100mg de Ciprofloxacino. Estos 100mg de activo fueron disueltos en 10mL de agua destilada haciendo uso del sonicador para evitar la presencia de grumos. Una vez que la mayor parte del polvo se disolvió, se procedió a filtrar la solución con filtro millipore estéril, de ésta solución se tomaron 0.1mL y se diluyeron en 9.9mL de agua destilada estéril en un tubo de ensaye estéril. De éste modo se obtuvo una solución de Ciprofloxacino con una concentración de 100µg/100µL.

- **Preparación del extracto.**

Se pesaron 50mg del extracto acuoso de *Oenothera rosea* y se diluyeron en 10mL de agua, ésta solución fue esterilizada con filtro millipore y recolectada en un tubo de ensaye estéril.

De ésta solución se tomaron 0.4mL, los cuales fueron disueltos en 3.6mL de agua destilada estéril; la concentración de esta solución fue de 500µg/mL.

Después se tomaron 2mL de la solución anterior y se diluyeron en 2mL de agua destilada estéril, la concentración de esta solución fue de 250µg/mL.

Finalmente fueron tomados 2mL de la solución anterior y se diluyeron en 2mL de agua destilada estéril, la concentración de ésta última dilución fue de 125µg/mL.

Método: ⁴⁰

Con una de las cepas que creció en agar nutritivo se procedió a preparar una suspensión bacteriana con aproximadamente 3mL de solución inyectable estéril al 0.9%; dicha

suspensión fue trasvasada a un tubo de ensaye estéril y se ajustó a la concentración del tubo 1 de la escala de MacFarland cuya concentración corresponde a 3×10^8 UFC con solución salina al 0.9%. Posteriormente se corroboró que la concentración de la suspensión preparada coincidiera con la turbidez del tubo 1 de la escala de MacFarland midiendo la absorbancia de ambas soluciones; las mediciones deben ser iguales o cercanas para asegurar que la suspensión microbiana tiene una concentración igual o cercana a 3×10^8 UFC.

A partir de la suspensión bacteriana anterior se realizaron diluciones para preparar una suspensión bacteriana de concentración 3×10^6 UFC y a partir de ésta última se realizaron las diluciones correspondientes para preparar una suspensión de concentración 1×10^5 UFC.

Con la suspensión de concentración 3×10^6 UFC se procedió a sembrar masivamente con hisopo estéril dos cajas con agar nutritivo, lo mismo se hizo con la suspensión de concentración 1×10^5 UFC; luego se realizaron 5 pozos sobre el agar ya sembrado de cada caja empleando un sacacorchos estéril con diámetro de 5mm.

Usando una micropipeta, se colocaron 50 μ L de las diferentes concentraciones del extracto de la planta previamente preparadas (125, 250, 500 μ g/mL) en tres pozos de la placa. En otro de los pozos se colocaron 50 μ L de solución salina como control negativo y en el último fueron colocados 50 μ L de la solución 100 μ g/100 μ L de Ciprofloxacino como control positivo. Las placas fueron puestas en una incubadora boca arriba a 37°C por 24 horas; el diámetro de las zonas de inhibición fue medido y registrado en milímetros.

Nota: Para que los 50 μ L de cada pozo no se derramen sobre el medio de las placas es necesario que cada una tenga un volumen de agar exacto, dependiendo del material de las cajas; si la caja es de vidrio es necesario que el volumen sea de 25mL, si la caja es de plástico el volumen debe de ser de 20mL. Para el ensayo es necesario que el agar de las placas tenga una consistencia firme, para ello se ajustó la cantidad de agar-agar presente en el medio al 2%.

6.4.7. Ensayo Antimicótico.

Material:

Material de laboratorio	Equipo e Instrumentos	Reactivos
Cajas Petri de vidrio	Balanza analítica ADAMS	Caldo PDA
Hisopos estériles	Micropipeta Labsystems 40-	Agar Saboraud
Pipeta volumétrica 10mL	200µL	Agar-agar
Pipeta graduada estéril 10mL	Micropipeta Socorex Swiss	Solución inyectable estéril
Filtros millipore estériles	5-50 µL	0.9%
Puntas estériles 10- 100µL	Sonicador SONICS	Tabletas de Terbinafina
Puntas estériles 100-1000 µL	Sacacorchos estéril con	250mg (Medimart®,
Tubos de ensaye con tapón	5mm de diámetro	Laboratorios Serral)
de baquelita estériles	Estufa ShellLab	Agua destilada estéril
(14x100, 18x180)	Espectrofotómetro	Extracto acuoso de <i>O. rosea</i>
Tubos Falcon® estériles 5mL		Solución yodo-alcohol
Lápiz punta diamante		

Material biológico*Candida albicans**

* La levadura se encontraba conservada en capilares mediante el método de criopreservación.

Preparación de Reactivos:

- **Reactivación de la cepa.**

En área estéril con una solución yodo-alcohol se limpiaron los capilares sellados con *Candida albicans*; se cortaron los extremos del capilar con ayuda de pinzas y un lápiz punta diamante, después se vació el contenido de los capilares en un tubo de ensaye que contenía 10mL de caldo PDA estéril y se dejó incubar por 24 horas a 37°C. De la suspensión anterior se sembró la levadura en tubos con agar PDA pico de flauta estériles y se dejó incubar a 37°C por 24 horas.

- **Preparación del antimicótico.**

Se pulverizaron dos tabletas con dosis de 250mg de Terbinafina en un mortero (Terbinafina Medimart de Laboratorio Serral), se pesó el total del polvo para después realizar el cálculo que permitió pesar el equivalente a 100mg de Terbinafina.

El polvo equivalente a 100mg de activo fue disuelto en 10mL de agua haciendo uso del sonicador para evitar la presencia de grumos en la solución. Una vez que el polvo se disolvió, la solución fue filtrada con filtro millipore estéril; de ésta solución se tomaron 0.1mL los cuales fueron disueltos en 9.9mL de agua destilada estéril en un tubo de ensaye estéril. De éste modo se obtuvo una solución estéril de Terbinafina con una concentración de 100µg/100µL.

- **Preparación del extracto.**

La preparación de las soluciones del extracto se realizó del mismo modo que en el ensayo antimicrobiano.

Método:

Con una de las cepas que creció en agar PDA se procedió a preparar una suspensión microbiana con solución inyectable estéril al 0.9%, dicha suspensión se ajustó a la concentración del tubo 1 de la escala de MacFarland cuya concentración corresponde a 3×10^8 UFC. Después se corroboró que la concentración de la suspensión preparada coincidiera con la turbidez del tubo 1 de la escala de MacFarland midiendo la absorbancia de ambas soluciones; las mediciones deben ser iguales o cercanas para asegurar que la suspensión microbiana tiene una concentración igual o cercana a 3×10^8 UFC.

Posteriormente, a partir de la suspensión microbiana de concentración 3×10^8 UFC se realizaron diluciones para preparar una suspensión de concentración 3×10^6 UFC y a partir de ésta última se realizaron las diluciones correspondientes para preparar una suspensión con concentración 1×10^5 UFC.

Con la suspensión de concentración 3×10^6 UFC se procedió a sembrar masivamente con un hisopo estéril dos cajas con agar Saboraud, lo mismo se hizo con la suspensión de concentración 1×10^5 UFC. Luego se realizaron 5 pozos sobre el agar ya sembrado de cada caja Petri, esto se hizo con un sacacorchos estéril con diámetro de 5mm. Usando una micropipeta, se colocaron 50µL de las diferentes concentraciones del extracto de la planta previamente preparadas (125, 250, 500 µg/mL) en tres pozos de la placa, en otro de los

pozos se colocaron 50µL de solución salina como control negativo y en el último se colocaron 50µL de la solución 100µg/100µL de Terbinafina como control positivo. Las placas fueron incubadas boca arriba a 37°C por 24 horas; el diámetro de las zonas de inhibición fue medido y registrado en milímetros.

Nota: Para que los 50µL de cada pozo no se derramen sobre el medio de las placas es necesario que cada una tenga un volumen de agar exacto, dependiendo del material de las cajas Petri; si la caja es de vidrio es necesario que el volumen sea de 25mL, si la caja es de plástico el volumen debe de ser de 20mL.

Para el ensayo es necesario que el agar de las placas tenga una consistencia firme, para ello se ajustó la cantidad de agar presente en el medio al 2%.

6.5. Análisis estadístico.

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 21; los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de Hidroxiprolina y Nitritos, así como las medidas de los diámetros de las heridas para la evaluación del efecto cicatrizante de *O. rosea* se analizaron mediante una prueba de ANOVA teniendo como intervalo de confianza un 95%.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación del efecto cicatrizante en ratones macho CD1. (Diámetros finales de las lesiones).

Durante 15 días las lesiones de los ratones fueron trabajadas con tres tratamientos; Madecassol como control positivo, Vaselina como control negativo y el ungüento con 4% de extracto acuoso de *O. rosea*, con la finalidad de determinar si el extracto de la planta mostró efecto cicatrizante.

En la tabla 7.1 se muestran las medias de los diámetros finales de las lesiones tras el tratamiento (no hubo diferencia significativa en los diámetros iniciales). Para determinar si el extracto acuoso de *Oenothera rosea* favoreció el proceso de cicatrización, se compararon las medias de los diámetros de las lesiones de los tres tratamientos mediante un análisis de varianza, obteniéndose un valor de $p=0.002$ lo que indica que existe diferencia significativa entre las medias de los diámetros finales, por lo que para identificar cual tratamiento tuvo un efecto distinto sobre las lesiones en comparación con los demás, se hizo uso del método de Tukey por comparaciones entre pares de medias.

Como se puede observar en la Tabla 7.1, la prueba de Tukey indicó que los diámetros finales del extracto mostraron una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los diámetros finales derivados de los tratamientos con Madecassol® y Vaselina.

7.2. Determinación de Hidroxiprolina y Nitritos.

La tabla 7. 1 muestra las medias \pm desviación estándar de las concentraciones obtenidas de Hidroxiprolina en los tejidos, así como las medias de las concentraciones de nitritos en el suero de los ratones agrupados por tratamiento.

En dicha tabla, se puede observar que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de Hidroxiprolina y Nitritos de los tres grupos.

Tabla 7.1. Diámetros finales, Concentraciones de Hidroxiprolina y Nitritos de los Grupos de tratamiento.

	Madecassol n= 6	Vaselina n= 6	Extracto n= 6
Diámetro final de lesiones (cm)	0.378 ± 0.024*	0.425 ± 0.042*	0.548 ± 0.105*
Hidroxiprolina (mg/g de tejido)	70.71 ± 19.60	65.68 ± 11.60	73.28 ± 11.04
Nitritos (µg/mL)	1.93 ± 0.45	2.31 ± 1.62	2.04 ± 0.82

Se muestra media ± DS

*Prueba ANOVA con post hoc Tukey sig. 95%, **p= 0.002**; Prueba de Tukey: Extracto vs Madecassol p= 0.001; Extracto vs Vaselina p= 0.016

7.3. Ensayo Antibacteriano.

El ensayo antibacteriano se realizó por duplicado para cada bacteria y probando dos suspensiones bacterianas con concentraciones de 1×10^5 UFC y 3×10^6 UFC. Se observó que el crecimiento apropiado para realizar el ensayo antimicrobiano fue en las cajas sembradas con la suspensión de concentración 3×10^6 UFC.

Las siguientes imágenes muestran los resultados obtenidos *in vitro* sobre agar nutritivo inoculado con las suspensiones bacterianas de concentración 3×10^6 UFC, en donde se observa que el crecimiento de ambas bacterias se dio en los pozos donde se colocaron las soluciones del extracto, así como en el pozo donde se colocó el control negativo; por otra parte, se puede observar la zona de inhibición del crecimiento bacteriano producido por la acción antibacteriana del Ciprofloxacino. El diámetro del halo fue de 3.2 x 3.2cm para *E. coli* mientras que para *S. aureus* fue de 1.5 x 1.6cm.



Figura 7. 15. Caja Petri inoculada con una solución bacteriana de *E. coli* de concentración 3×10^6 UFC; donde: **A.** Ciprofloxacino $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, **B.** Extracto $125 \mu\text{g}/\text{mL}$, **C.** Extracto $250 \mu\text{g}/\text{mL}$, **D.** Extracto $500 \mu\text{g}/\text{mL}$, **E.** Solución Salina. Se observa el crecimiento bacteriano en el medio cercano a los pozos donde se colocaron las soluciones del extracto, así como en el control negativo. En rojo se encuentra marcado el halo de inhibición generado por el control positivo (Ciprofloxacino).

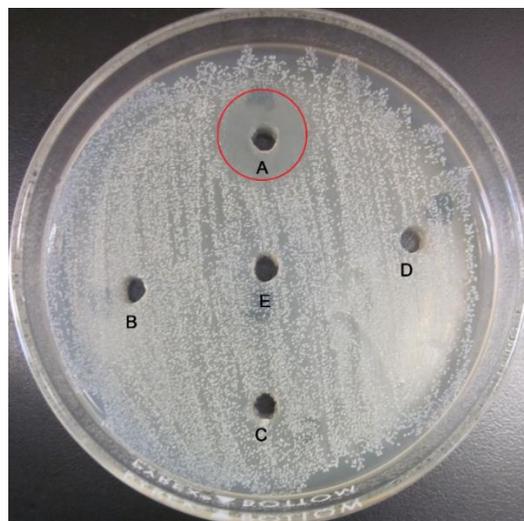


Figura 7. 16. Caja Petri con agar nutritivo inoculada con una solución bacteriana de *S. aureus* de concentración 3×10^6 UFC. **A.** Ciprofloxacino $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, **B.** Extracto $125 \mu\text{g}/\text{mL}$, **C.** Extracto $250 \mu\text{g}/\text{mL}$, **D.** Extracto $500 \mu\text{g}/\text{mL}$, **E.** Solución Salina; se observa el crecimiento bacteriano en el medio cercano a los pozos donde se colocaron las soluciones del extracto, así como en el control negativo. En rojo se encuentra marcado el halo de inhibición generado por el control positivo (Ciprofloxacino).

7.4. Ensayo Antimicótico.

El ensayo se realizó una primera vez, sin observar inhibición alguna, incluso sobre el área cercana al control positivo (Terbinafina); por lo que se procedió a repetir el experimento con una nueva solución de Terbinafina distinta a la utilizada en el inicio. Se llegó a la conclusión de que la primera solución de Terbinafina perdió efecto debido a que las tabletas con las que se preparó habían caducado.

Cabe mencionar que en el primer intento en que se llevó a cabo el ensayo antimicótico, se observó que las cajas sembradas con la suspensión microbiana 1×10^5 UFC de *Candida albicans* no mostraban un crecimiento masivo suficiente para evaluar la posible inhibición de las soluciones de prueba, por lo que la segunda vez que se realizó el ensayo, éste se hizo únicamente con la suspensión microbiana 3×10^6 UFC de *C. albicans*.

En la siguiente imagen se muestran los resultados obtenidos *in vitro* en el ensayo antimicótico sobre una caja Petri con agar Saboraud.

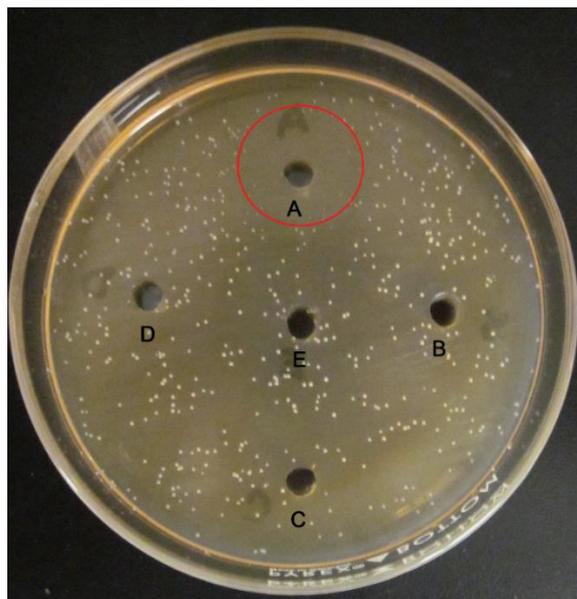


Figura 7. 17. Caja Petri con agar Saboraud inoculada con una solución microbiana de *C. albicans* de concentración 3×10^6 UFC. **A.** Terbinafina $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, **B.** Extracto $125 \mu\text{g}/\text{mL}$, **C.** Extracto $250 \mu\text{g}/\text{mL}$, **D.** Extracto $500 \mu\text{g}/\text{mL}$, **E.** Solución Salina. Se observa el crecimiento de la levadura en el medio cercano a los pozos donde se colocaron las soluciones del extracto, así como en el control negativo. En rojo se encuentra marcado el halo de inhibición generado por el control positivo (Terbinafina).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Inicialmente se estableció que el extracto acuoso de *Oenothera rosea* podría tener efecto cicatrizante debido a la presencia de componentes fitoquímicos los cuales han sido relacionados con efectos farmacológicos que podrían favorecer el proceso de cicatrización; además del conocimiento empírico, el cual nos indicaba que la planta es usada por la población mexicana para mejorar hematomas, así como desinfectante y cicatrizante, en forma de cataplasmas e infusiones sobre heridas.

Para ello, como se ha mencionado a lo largo de éste trabajo, se evaluó y comparó el efecto de un ungüento al 4% del extracto acuoso de la planta frente al Madecassol, como control positivo, y a la Vaselina, como control negativo, los cuales fueron aplicados durante 15 días sobre lesiones expuestas de ratones macho CD1; de este modo, se realizaron cuatro pruebas para comprobar si la planta tenía el efecto esperado.

8.1. Evaluación del efecto cicatrizante en ratones macho CD1.

Con ésta prueba, se monitoreó la evolución de las lesiones de los tres grupos de tratamiento midiéndose el diámetro de las heridas diariamente, con la finalidad de observar algún cambio significativo al terminar los 15 días de tratamiento. Una de las características más evidente que nos indica una mejora significativa en el proceso de cicatrización es la reducción del diámetro de la lesión, otras características evidentes son el cierre total de la herida y la sustitución del tejido de granulación por piel y pelo.

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, se deduce que el ungüento al 4% del extracto acuoso de *O. rosea* no posee efecto cicatrizante ya que las lesiones tratadas con el extracto no mostraron una mejoría visible durante los 15 días de tratamiento, ya que de acuerdo al análisis estadístico, los diámetros de las lesiones trabajadas con el extracto fueron los más amplios; mientras que la media de las lesiones tratadas con el control negativo y el control positivo, fueron significativamente menores (Tabla 7.1).

Esto se puede confirmar al observar la Figura 11. 2 del Anexo, en donde se puede apreciar que las lesiones tratadas con el ungüento al 4% del extracto acuoso de *O. rosea* no mostraron una mejoría considerable al décimo día de tratamiento, pues aunque el diámetro

de las lesiones se redujo en comparación con el mostrado al cuarto día (Figuras 11. 1), se puede observar la presencia de una costra gruesa de color oscuro. Tal característica no se observó en las lesiones tratadas con Vaselina, por ejemplo la Figura 11. 5 muestra una lesión tratada con Vaselina al décimo día y a diferencia de las trabajadas con el ungüento, se observa la epitelización de la herida y la ausencia de la costra desarrollada en las lesiones trabajadas con el extracto. Por otra parte las lesiones trabajadas con Madecassol® mostraron una mejoría notable, por ejemplo en la Figura 11. 7 muestra una lesión tratada con Madecassol® al décimo día y puede apreciarse la epitelización de la herida y el crecimiento de pelo alrededor de las lesión, así como una reducción importante del diámetro de las lesiones en comparación con el tamaño observado al cuarto día con dicho tratamiento (Figuras 11. 6).

Aunque, de acuerdo a la prueba de Tukey, no existe diferencia significativa entre los valores de las medias de los diámetros de las lesiones tratadas con Vaselina y Madecassol®, podemos decir que, las lesiones con diámetros más reducidos fueron los resultantes a partir del tratamiento con Madecassol, nuestro control positivo (Tabla 7.1).

En el laboratorio 1 de la UMIEZ, en la FES Zaragoza, UNAM; se han comparado los resultados obtenidos a partir de ensayos realizados con dos presentaciones de Madecassol® una en polvo y otra en pomada, utilizados sobre lesiones expuestas de ratones macho CD1. Se ha observado que las lesiones de ratones trabajados con la Madecassol® en polvo mostraron un retraso en el proceso de cicatrización al finalizar el período de tratamiento al desarrollar evidentes procesos infecciosos, además de no mostrar una reducción significativa en los diámetros de las lesiones; en comparación con los tejidos de ratones trabajados con la presentación de Madecassol® en pomada, los cuales mostraron una mejoría notable al reducirse significativamente el diámetro de las lesiones además de observarse la epitelización de la herida.

Se cree que dichos resultados puedan deberse a que la presentación en polvo del Madecassol® provocó la desecación de las heridas, ya que contrario a lo que se piensa, aún en breves períodos de sequedad, el proceso de cicatrización (en especial la etapa de epitelización) se ve afectado, pues el exudado de heridas superficiales no infectadas, contiene factores de crecimiento y lactato, lo que recapitula el ambiente de crecimiento que se encuentra en la base de la herida; mientras que la presentación en pomada, la que

además de contener el principio activo, contiene bases oleaginosas como la vaselina, la cual funciona como un apósito, previniendo la desecación y la infección de la herida proporcionando el ambiente ideal para la cicatrización de las lesiones. Debido a esto es que se considera que la Vaselina utilizada como control negativo, también favorece la cicatrización de las heridas.^{4,7}

8.2. Determinación de Hidroxiprolina.

La Hidroxiprolina es un aminoácido que se encuentra específicamente en la proteína colágeno; ésta proteína es sintetizada por los fibroblastos durante el proceso que se conoce como depósito de matriz para sustituir el tejido dañado por tejido conjuntivo, el cual compone la dermis. En ésta prueba se esperaba que las concentraciones de Hidroxiprolina se encontrarían significativamente altas en aquellos tejidos en los que la cicatrización se vio favorecida por alguno de los tratamientos; sin embargo, al no existir una diferencia significativamente estadística entre las medias de las concentraciones de Hidroxiprolina de los tres grupos de tratamiento, se deduce que la síntesis de colágeno para los tres grupos de ratones fue similar independientemente del tratamiento aplicado sobre las lesiones, es decir, ningún tratamiento favoreció el depósito de colágeno.

No obstante, las concentraciones visiblemente más altas de Hidroxiprolina fueron las resultantes de los tejidos tratados con el extracto, mientras que las concentraciones más bajas fueron las obtenidas de los tejidos trabajados con Vaselina (Tabla 7. 1).

Es importante mencionar, que una de las principales características de la cicatrización excesiva, es que los fibroblastos de éste tipo de cicatrices responden a concentraciones bajas de TGF- β , factor de crecimiento que induce la síntesis de colágeno, por lo tanto, éstas células producen más colágeno que los fibroblastos dérmicos normales; y, en éstos casos una cantidad alta de colágeno, no implica que la cicatrización de una herida haya sido sana. Una de las causas que dan lugar a la cicatrización excesiva, es una etapa inflamatoria prolongada, ejemplos de este tipo de cicatrización son las cicatrices hipertróficas y los queloides.^{24, 25}

8.3. Determinación de Nitritos en Suero.

El óxido nítrico es una molécula endógena sintetizada por diferentes células tales como: macrófagos, células endoteliales, neuronas, células musculares lisas y cardiacas; a partir del aminoácido L- arginina por acción de la enzima óxido nítrico-sintetasa. Posee propiedades vasodilatadoras y antimicrobianas, tiene una vida media de 3 a 50 segundos, su labilidad es debida a su rápida conversión a nitritos y nitratos por el oxígeno presente en la sangre, estos últimos son sus metabolitos estables. ^{6, 43}

Se han descrito dos isoformas de óxido nítrico- sintetasa, la constitutiva y la inducible; la forma constitutiva se activa por aminoácidos excitatorios, la acetilcolina y el calcio; da lugar a pequeñas cantidades de óxido nítrico durante cortos periodos de tiempo. La forma inducible es promovida por estímulos inmunológicos o inflamatorios y da lugar a grandes cantidades de óxido nítrico por parte de macrófagos, neutrófilos y células endoteliales durante períodos de tiempo prolongados. ^{6, 43}

Como se dijo anteriormente, los nitratos y nitritos son los metabolitos estables del óxido nítrico, por lo tanto, las concentraciones altas de éstas moléculas son un indicador del nivel de inflamación en el organismo así como de procesos infecciosos y se pueden cuantificar usando la reacción de Griess, en donde los nitratos presentes en la sangre son reducidos a nitritos, para cuantificar de manera indirecta el óxido nítrico presente en el suero de los ratones.

En éste caso, se esperaba hallar diferencias en la concentración de nitritos en los sueros de los ratones en los que la aplicación de alguno de los tratamientos interviniera con el proceso inflamatorio, el cual juega un papel importante en el proceso de cicatrización de las heridas por contribuir en la defensa del organismo contra procesos infecciosos que pudieran alterar la evolución de la cicatrización, sin embargo, con base al análisis estadístico realizado a las medias de las concentraciones de nitritos de los tres grupos de ratones, se deduce que la concentración de dicho metabolito no se vio afectada por la aplicación de alguno de los tratamientos en específico.

No obstante, las concentraciones de nitritos en suero evidentemente más bajas fueron las obtenidas de los sueros de los ratones tratados con Madecassol; mientras que las más altas fueron las pertenecientes a los sueros de los ratones trabajados con Vaselina y el

Extracto (Tabla 7.1), por lo que, se puede considerar que estos dos grupos de ratones desarrollaron un proceso inflamatorio más marcado el cual elevó los niveles de óxido nítrico en el suero de dichos ratones.

8.4. Ensayo Antibacteriano y Antimicótico.

El epitelio intacto previene la entrada de los contaminantes bacterianos que suelen encontrarse en la piel a los tejidos profundos, una herida, altera el epitelio intacto y permite el acceso de bacterias a estos tejidos y al torrente sanguíneo. Las infecciones de heridas aún representan un problema médico mayor debido a que afectan el resultado final de procedimientos quirúrgicos pues las infecciones suelen originar cierres deformantes, desagradables o tardíos.

La incidencia de infección de la herida se aproxima al 5 - 10%, la fuente de patógenos para la infección suele ser la flora endógena de la piel, las mucosas o las vísceras del paciente, los microorganismos que más a menudo causan infecciones de la herida en orden de frecuencia son especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* coagulasa negativos, enterococos y *Escherichia coli*.⁴

En las últimas décadas, el uso de antibióticos de forma indiscriminada ha dado lugar al surgimiento de bacterias resistentes a múltiples fármacos, tal hecho ha impulsado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Una de las fuentes más estudiadas han sido los vegetales; de los que se han aislado componentes fitoquímicos como ácidos fenólicos, quinolonas, flavonoides y productos alcalinos con posibles propiedades antimicrobianas; algunos de los cuales, ya están siendo probados en humanos.³⁰

Aunque la información recabada indicaba que el extracto acuoso de *Oenothera rosea* tenía propiedades antibióticas contra algunas enterobacterias, los resultados del ensayo aquí realizado no mostraron inhibir el desarrollo microbiano de *Escherichia coli*. También se realizaron ensayos antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*; en estos casos los resultados fueron los mismos, ninguna concentración del extracto inhibió el desarrollo de éstos microorganismos.

9. CONCLUSIONES

En éste proyecto se realizaron distintas pruebas para comprobar la posible actividad cicatrizante del extracto acuoso de *Oenothera rosea* sobre lesiones expuestas en ratones CD1 observándose que para cada prueba los resultados indicaban que la planta no tiene la capacidad de favorecer la cicatrización, ya que:

- Las lesiones tratadas con el ungüento de concentración al 4% del extracto no mostraron una reducción significativa en el diámetro de las lesiones, comparándose con los diámetros del control positivo y del control negativo; éste análisis estadístico también dejó ver que el Madecassol en pomada y la Vaselina exhibían propiedades cicatrizantes similares.
- La concentración de Hidroxiprolina en los tejidos cicatrizados de los tres grupos de ratones fue estadísticamente similar, por lo que no se puede señalar que haya existido una mejoría en el depósito de colágeno con el uso de alguno de los tres tratamientos.
- Del mismo modo, se observó que la concentración de nitritos en el suero de los tres grupos de ratones fue estadísticamente similar, por lo que no se observó diferencia alguna que pudiera indicar que alguno de los tratamientos alterara la concentración de óxido nítrico en el suero de los animales.
- Por otra parte, aunque la información consultada indicaba que el extracto acuoso y metanólico de *Oenothera rosea* poseía efecto antibacteriano, los resultados del ensayo aquí realizado mostraron que ninguna concentración del extracto inhibió el desarrollo de los microorganismos de prueba

En la actualidad existen en el mercado tratamientos farmacéuticos que favorecen el proceso de cicatrización, sin embargo, los remedios herbarios son un recurso importante en la medicina tradicional mexicana, los habitantes de las zonas urbanas y rurales siguen utilizando plantas medicinales como alternativa para resolver sus problemas de salud. Por tal motivo, se considera importante realizar estudios que comprueben la efectividad de las propiedades medicinales que se le atribuyen a ciertas plantas, así mismo, es importante que los resultados obtenidos de dichos estudios sean difundidos entre la población.

10. PROPUESTAS

- Realizar estudios de toxicidad del extracto acuoso de *Oenothera rosea*, ya que de acuerdo con los resultados, se observó que las lesiones tratadas con el ungüento mostraron un grado de irritación que provocó el desarrollo de una costra gruesa en vez de contribuir con el proceso de cicatrización.

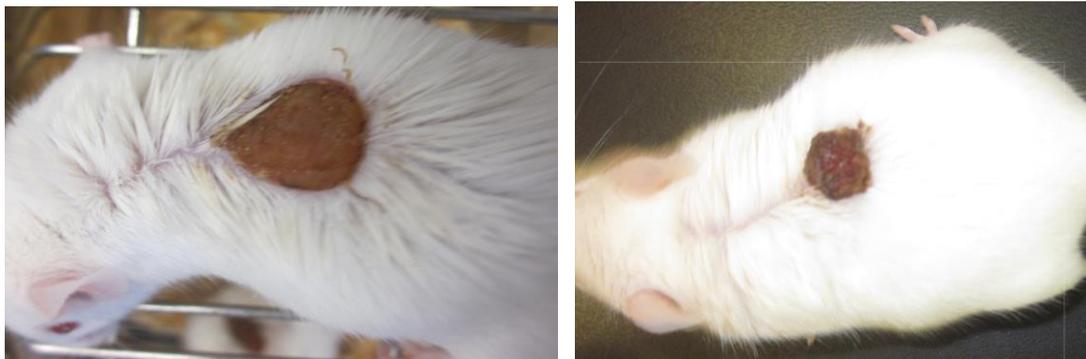
11. ANEXO

Evolución de las lesiones al cuarto y décimo día.

Las ilustraciones que a continuación se presentan, muestran la evolución de las lesiones al cuarto y al décimo día, mientras que la Figura 7.1 muestra un ratón con una lesión recién realizada, observándose la remoción completa de las capas de la piel.



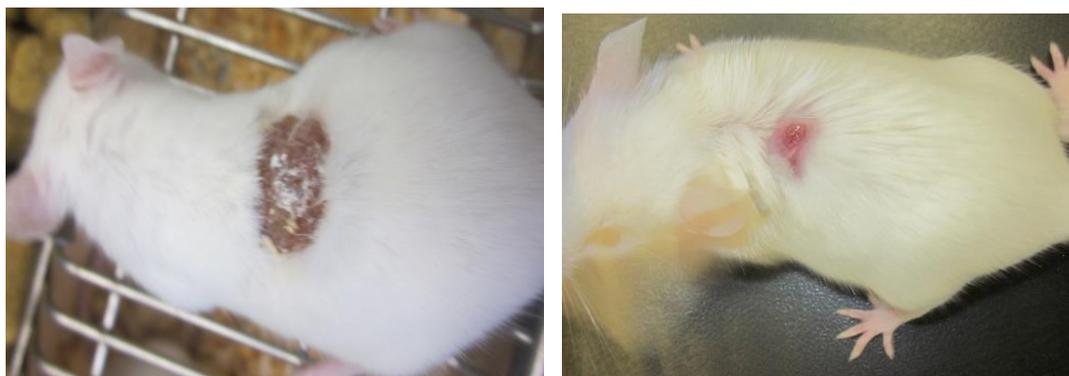
Fig. 11.1. Ratón día 1 con lesión recién realizada.



Figuras 11. 2 y 11. 3. A la izquierda se muestra una lesión tratada con Extracto de *O. rosea* al cuarto día; a la derecha se muestra la misma herida al décimo día.



Figuras 11. 4 y 11. 5. A la izquierda se muestra una lesión tratada con Vaselina al cuarto día; a la derecha se muestra la misma herida al décimo día.



Figuras 11. 6 y 11. 7. A la izquierda se muestra una lesión tratada con Madecassol al cuarto día, a la derecha se muestra la misma herida al décimo día.

12. REFERENCIAS

1. Herranz P, Santos HX. Cicatrices, guía de valoración y tratamiento. Madrid: Publicidad Just in Time S.L.; 2012.
2. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 13a ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2013.
3. Way LW. Diagnóstico y tratamiento quirúrgico. 7a ed. México: Editorial El Manual Moderno; 1995.
4. Bardul A, Efron DT. Cicatrización de heridas. En: Brunicardi CF, editor. Principios de cirugía. 9a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2011. p. 209-234.
5. Ingraham JL, Ingraham CA. Introducción a la microbiología Vol.2. Barcelona: Editorial Reverté; 1998.
6. Jordán GI. Óxido nítrico espirado y nitritos y nitratos en sangre en el recién nacido con alto riesgo de infección perinatal. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2004.
7. Doherty GM, Thompson NW. Diagnóstico y tratamiento quirúrgicos. 13a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2011.
8. Lehninger AL. Bioquímica, las bases moleculares. 2a ed. Barcelona: Ediciones Omega; 1995.
9. Lehninger AL. Principios de bioquímica. 6a ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2015.
10. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano. regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 349-363.
11. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol 1993; 122(1): 103-111.
12. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. J Dent Res 2010; 89(3): 219-229.
13. Johnson FR, McMinn RMH. The cytology of wound healing of the body surface in mammals. Biol Rev 1960; 35(3): 364-410.
14. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. Lab Invest 1999; 79(12): 1479-1487.

15. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1219-1222.
16. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 1998; 111(5): 850-857.
17. Yue DK, McLennan S, Marsh M, Mai YW, Spaliviero J, Delbridge L, et al. Effects of experimental diabetes, uremia, and malnutrition on wound healing. *Diabetes* 1987; 36(3): 295-299.
18. Williams JZ, Bardul A. Nutrition and wound healing. *Surg Clin North Am* 2003; 83(3): 771-596.
19. Erlich HP, Hunt TK. Effects of cortisone and vitamin A on wound healing. *Ann Surg* 1968; 167(3): 324-328.
20. Anstead GM. Steroids, retinoids and wound healing. *Adv Wound Care* 1998; 11(6): 277-286.
21. Ahn C, Mulligan P, Salcido RS. Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Adv Skin Wound Care* 2008; 21(5): 227-236.
22. Sorensen LT, Jorgensen S, Petersen LJ, Hemmingsen U, Bulow J, Loft S, et al. Acute effects of nicotine and smoking on blood flow, tissue oxygen, and aerobic metabolism of the skin and subcutis. *J Surg Res* 2009; 152(2): 224-230.
23. Reyes VE. Evaluación de la actividad cicatrizante del extracto acuoso de *Ipomoea murucoides* (cazahuate) en un modelo de ratón CD1 [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2014.
24. Tredget EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A. Hypertrophic scars, keloids and contractures: the cellular and molecular basis for therapy. *Surg Clin North Am* 1997; 77(3): 701-730.
25. Tuan TL, Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Molecular medicine today* 1998; 4(1): 19-24.
26. Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104(5): 1435-1458.
27. Salem ZC, Vidal VA, Mariangel PP, Concha MM. Cicatrices hipertróficas y queloides. *Cuad Cir* 2002; 16(1): 77-86.

28. Miranda OMA, Bermúdez A, Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia* 2005; 30(8):453-459.
29. Cañigueral S, Vanaclocha B. *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. 4a ed. Barcelona: Elsevier; 2003.
30. Cowan MM, Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4):564-582.
31. Hernández AG. *Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Vol.2. 2a ed. Barcelona: Editorial Médica Panamericana; 2010.
32. Alonso MJ. *Centella asiatica*, una planta con historia e interesantes propiedades. *Fitoterapia*. 2009; 28(5):98-104.
33. Maquart FX, Chastang F, Simeon A, Birembaut P, Gillery P, Wegrowski Y. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. *Eur J Dermatol*. 1999;9(4):289-296.
34. González BJ, Lechuga CAM, Serrano FCA. Estudio Fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (Yawar Chong'a). SITUA [en línea].2001 [fecha de acceso 20 de marzo de 2015], 9(17). URL disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2001_n17/indice.htm
35. Sumitra SD, Rupinder K, Sudendra KS. Evaluation of *in vitro* anthelmintic activity of *Oenothera rosea* L'Hér. ex Aiton stem and root. *J Nat Prod Plant Resour*. 2012;2(4):534-539.
36. Zinsmeister HD, Bartl S. The fenolic compounds of *Oenothera*. *Phytochemistry*. 1971; 10:3129- 3132.
37. Márquez FYK, Montellano RH, Campos AME, Meléndez CE. Anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Oenothera rosea* L' Hér. ex Ait in the rat. *Rev Mex Cienc Farm*. 2009; 40(3):11- 16.
38. Gómez FR, Reyna MR, Tamez GP. Antibacterial activity of *Oenothera rosea* (L'Hér) leaf extracts. *Br J Med Med Res*. 2012; 2(3):396-404.
39. Rojas VEA. Determinación de hidroxiprolina para evaluar la actividad cicatrizante del extracto acuoso de *Helietta parvifolia* en ratones CD1. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.

40. Savitri S, Sundara RS, Sujan GPS, Ravi SBE, Dhananjaya BL. Evaluating the antimicrobial activity of methanolic extract of *Rhus succedanea* leaf gall. *Bioimpacts*. 2013; 3(4):195-198.
41. Carreón SR, Marroquín SR, Mora GJLA, Valadez SCS, Flores CY, Flores PM, Hernández AVJ. Estudio del extracto etanólico de *Eryngium hetrophyllum* (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y antiinflamatoria. *Rev Mex Cienc Farm* 2013; 44(2):41-45.
42. Mendenhall W, Beaver R J, Beaver B M. Introducción a la probabilidad estadística. 10^a ed. México: Cengage Learning; 2009.
43. San Miguel A, Iglesias R, Alonso N, Calco B, Martín-Gil FJ. Síntesis e implicaciones fisiológicas del óxido nítrico. *Diagnóstico* 2006; 4(76): 2-17