



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Q.F.B.

Área: Bioquímica Clínica

**“Evaluación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de
Montanoa tomentosa en ratones CD1 et/et.”**

T E S I S

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

P R E S E N T A:

ALAN ISRAEL VALENCIA ORTEGA

Director de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor de tesis: Dr. José Luís Alfredo Mora Guevara

Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIT IG300315

Cd. Mx.

Junio 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.

“La verdadera inteligencia actúa silenciosamente. Es en la quietud donde encontramos la creatividad y la solución a los problemas.”

Eckhart tolle.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a mis padres **Esther Ortega Mondragón** y **Felipe Valencia Valencia** por todo lo que me han brindado y el apoyo incondicional que recibí de su parte.

A mis hermanas **Cindy Izchel Valencia Ortega**, **Laura Aline Valencia Ortega** y mi hermano **Kevin Aaron Valencia Ortega** porque estuvieron para ayudarme en cualquier circunstancia e incluso darme sus mejores palabras de aliento cuando las necesité.

A **Daniela Barona Toledo**, por siempre darme ese ánimo para seguir adelante, el cariño y la comprensión ante todo, además del conocimiento que hasta hoy me sigue compartiendo.

Al **Dr. Rubén Marroquín Segura** y al **Dr. Luis Mora Guevara** por permitirme realizar éste trabajo en su laboratorio y hacerlo siempre tan ameno, sin duda su paciencia y apoyo fueron excepcionales.

A mis sinodales **M en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara**, **Q.F.B. Carina Gutiérrez Iglesias** y **Q.F.B. Enrique Escalera Zúñiga** por el valioso tiempo dedicado a mis revisiones.

Al **M en C. Ángel García Sánchez** pues sus consejos siempre fueron los más adecuados y de mucha ayuda para tener el coraje necesario de concluir todo esto.

Al **M en C. Agustín Hernández Gaviño**[†] por ser la única persona en demostrarme tanta humanidad y extenderme la mano en el momento en el que más falta me hizo, el haberlo conocido cambió todas mis perspectivas tanto laborales como personales.

A mi compañero y amigo **Diego Valverde García** por la complicidad tan grande, por escucharme en cualquier situación y ese toque de diversión presente en todo momento.

Y por último pero no menos importantes, a todos mis compañeros del Laboratorio 1 de la UMIEZ, **Yaseming, Jonathan, Luis Fernando y Adrián** toda ayuda que cada uno de ustedes me brindó fue esencial para concluir con mi trabajo.

A CADA UNO DE USTEDES MIL GRACIAS POR SU APOYO Y COMPRENSION,
FUERON PARTE FUNDAMENTAL EN TODO ESTO...GRACIAS!!!

Índice

1. Introducción.....	7
2. Marco teórico.....	8
2.1 Origen de la herbolaria en México.....	9
2.2 Extractos de plantas.....	13
2.2.1 Métodos de extracción.....	13
2.2.2 Principio activo en plantas.....	15
2.3 Farmacognosia.....	16
2.4 Familia <i>Asteraceae</i>	18
2.4.1 <i>Montanoa tomentosa (Zoapatle)</i>	19
2.5 Piel y características generales.....	21
2.5.1 Colágeno.....	24
2.5.2 Heridas y cicatrización.....	25
2.5.3 Tratamiento de heridas.....	33
2.6 Técnicas empleadas para la evaluación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de <i>Montanoatomentosa</i> y sus fundamentos.....	34
2.6.1 Modelo de escisión en roedores.....	34
2.6.2 Determinación de nitritos.....	35
2.6.3 Determinación de hidroxiprolina.....	36
3. Planteamiento del problema.....	37
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivos.....	39
5.1 Objetivo general.....	39
5.2 Objetivos específicos.....	39
6. Diseño experimental.....	40
7. Métodos.....	42
7.1 Obtención del extracto acuoso de <i>Montanoa tomentosa</i>	42
7.2 Elaboración del ungüento al 4% con extracto acuoso de <i>Montanoa</i> <i>Tomentosa</i>	43
7.3 Escisión en los ratones CD1 et/et.....	44
7.4 Determinación de nitritos.....	46
7.5 Determinación de hidroxiprolina.....	50
8. Diagrama de flujo.....	54

9. Resultados y análisis de resultados.....	55
9.1 Evolución de las escisiones en ratones CD1 et/et.	55
9.2 Determinación de nitritos.	60
9.3 Determinación de hidroxiprolina.	62
10. Conclusiones.....	63
11. Propuestas.....	64
12. Literatura consultada.....	65

1. Introducción.

El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países. En México, los conocimientos sobre herbolaria se han transmitido en la población, principalmente de generación en generación.

Al paso del tiempo, desde la época del hombre primitivo hasta el siglo XIX, el ser humano ha tenido que lidiar con heridas, siendo así las plantas y algunos productos de origen animal y mineral los únicos recursos que se utilizaban para detener el sangrado, disipar el dolor, minimizar la inflamación, eliminar el tejido dañado, curar infecciones, eliminar o enmascarar los malos olores y promover la cicatrización. Hoy en día son utilizados muchos remedios tradicionales con diferentes propósitos promoviendo la automedicación, sin embargo, el aumento de su uso empírico y siendo éstos de venta libre aumenta el número de informes sobre reacciones adversas que éstos provocan ya que sus efectos únicamente se conocen como ya lo habíamos mencionado de manera empírica, de acuerdo a datos de la OMS la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional.

El uso de manera tradicional de plantas medicinales ha adquirido una relevancia muy importante gracias a los efectos benéficos que éstas presentan frente a enfermedades inmunológicas e infecciones. Algunos extractos de dichas plantas pueden llegar a favorecer la cicatrización de heridas ya que existe un incremento en la velocidad de síntesis de tejido conectivo, así como estimulación del crecimiento celular del endotelio y de los fibroblastos por medio de ciertos efectos

sobre la microcirculación o porque ejercen una acción antibacterial para prevenir infecciones en la piel y así aumentar su efecto cicatrizante.

En el presente trabajo se evaluará el efecto cicatrizante de un extracto acuoso *Montanoa tomentosa* (Zoapatle), una planta que es utilizada ampliamente para facilitar el parto y regulador menstrual en diferentes zonas del país como en la Ciudad de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz .¹

Se empleará una técnica de escisión en un grupo de ratones CD1 et/et, mediante la cual se evaluará el efecto cicatrizante de dicho extracto mediante la cuantificación de la presencia de nitritos en suero y de hidroxiprolina en piel.

2. Marco teórico.

Gracias a la tradición oral y escrita sobre la medicina popular se sabe que el hombre desde tiempo inmemorial ha conocido y aprovechado la actividad curativa de un sin número de hierbas. A pesar de los avances en la producción de la medicina “moderna”, las plantas medicinales no han perdido su importancia. Por el contrario el desarrollo de los medicamentos modernos ha sido resultado de formas cada vez más complejas de aprovechar las plantas medicinales, y su producción sigue dependiendo en gran parte del uso de estas plantas como materia prima. Así tenemos por ejemplo que una de las medicinas más comunes, *la aspirina*, se saca de la corteza del sauce, y la penicilina es un producto vegetal, lo mismo que la pastilla anticonceptiva.

También para el descubrimiento de nuevas medicinas los investigadores han recurrido al uso de las plantas medicinales.

Debido a la introducción cada vez más generalizada de las medicinas comerciales o de *patente*, en los últimos 30 años algunas personas han empezado a rechazar el uso de las plantas medicinales, por considerarlo como algo anticuado, atrasado e ineficiente.

Sin embargo, en la mayoría de los hogares del campo y en los barrios populares en ciudades las plantas medicinales siguen siendo el primer remedio para curar las enfermedades comunes, porque se sabe que son buenas y porque resultan que son muy económicas, por ello es que son cultivadas en los pequeños jardines o plantadas en macetas. Esta es una sana tradición que no debe perderse.

La gran mayoría de los trastornos comunes encuentran su remedio en hierbas medicinales. Además la curación con ellos es más natural, menos nociva o peligrosa y está al alcance de todos.²

2.1 Origen de la herbolaria en México.

El uso de plantas medicinales es tan antiguo como el hombre mismo. El proceso mediante el cual el Homo sapiens fue seleccionando los vegetales que servían para comer, curar o matar, se pierde en la larga noche del origen de la humanidad. Esta etapa de aprendizaje transcurrió lentamente, al ritmo de la evolución, pero con algunos sobresaltos. Uno de los acontecimientos que influyó de manera decisiva en el devenir de dicho proceso fue el surgimiento de la agricultura. Los primeros pobladores del territorio mexicano también aprendieron a cultivar lo que

deseaban comer, fenómeno cultural que ocurre, aparentemente, de forma sincrónica en todo el planeta.

El descubrimiento de los secretos de la reproducción vegetal a partir de las semillas y la función del agua para su germinación, es uno de los factores que debieron determinar la formación de las primeras aldeas, donde los miembros de la primitiva sociedad de cazadores y recolectores nómadas, por primera vez se dieron tiempo y espacio para intercambiar conocimientos y transmitir sus experiencias en torno al consumo de los vegetales que habían aprendido a reconocer durante sus largas migraciones desde el noroccidente de Alaska, en la enigmática Beringia (puente de tierra que unió Asia con América), hasta la tierra del fuego, en el sur patagónico, donde se detuvieron hace 13,000 años. Se acepta, casi por todos los que estudian este tema, que el hombre americano proviene de Asia y que es un recién llegado en comparación con sus congéneres africanos que tienen unos 100 mil años de antigüedad. A la zona de Mesoamérica el hombre llegó hace unos 21 mil años, según lo prueban diversos restos arqueológicos encontrados en Tlapacoya, Estado de México y en Valsequillo, Puebla. Pero las osamentas humanas más antiguas que hasta la fecha se han descubierto en México son aún más recientes ya que las halladas en las orillas del lago de Chalco tienen unos 10 mil años de antigüedad.

Los hombres que recorrieron estos territorios fueron seleccionando a su paso vegetales útiles, guardando sus hojas, raíces y semillas con las que intentaron resolver sus contingencias durante su desplazamiento.

La imitación del comportamiento de otros animales es un elemento primordial en el proceso de aprendizaje. Los humanos observan que los animales recurren a determinadas hierbas cuando se sienten enfermos o heridos, comienzan a saber que las hierbas agrias provocan el vómito, que las ortigas irritan o queman la piel, que el jugo de los árboles lechosos cauteriza las heridas, y que los aromas de las flores nocturnas provocan el sueño.

Éstas fueron las circunstancias en que se encontró el hombre durante miles de años, las cuales enriquecieron su conocimiento sobre la naturaleza, aunque hoy a nosotros nos resulte difícil imaginarlo por haber perdido esa capacidad sensorial de comunicación con el entorno animal y vegetal.

El modo de vida de los antiguos pueblos cazadores y recolectores prevaleció en México por mucho más tiempo del que los estudiosos de la evolución social del hombre primitivo quisieran reconocer. En nuestro país existieron pueblos cazadores-recolectores conviviendo en la periferia de las civilizaciones agrícolas y mantuvieron su estilo de vida durante la conquista española y más tarde aún, hasta el siglo XVIII.³

Todas las culturas han adquirido un conocimiento de las plantas o de los órganos vegetales utilizados en medicina. Los más antiguos documentos escritos, tienen aproximadamente 6000 años de antigüedad, incluyendo descripciones de las plantas utilizadas en esa época. En un principio este conocimiento era un derecho del brujo de la tribu inclusive se llegaron a establecer ritos y creencias relativas a la recolección. Antes del siglo XVIII se conocían las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y modo de aplicación. No fue posible hasta

éste siglo (s. XVIII); que con el desarrollo de las teorías de la evolución y herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de nuevas ciencias como la fitoquímica y de técnicas como el análisis instrumental, el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas medicinales.⁴El primer libro de herbolaria medicinal azteca y una de las más importantes fuentes bibliográficas históricas en América en medicina, lleva por nombre “Libro de las yerbas medicinales de los indios”, que se conociera cuatro siglos después como Códice Badiano (Códice De la Cruz-Badiano), es una obra en la que se describen más de 150 plantas nativas de México y donde se constata su uso medicinal.⁵

México es un país muy diverso, se calcula que alrededor de 18,000 a 30,000 especies de plantas habitan en nuestro territorio, aproximadamente al 15% de la flora total se le atribuyen propiedades medicinales de las cuales solo un 5% tiene validación química, farmacológica y biomédica. Actualmente una gran parte de la población en México continúa usando plantas como remedio que aprendieron de generaciones pasadas sin saber si realmente poseen los efectos esperados o si tienen algún resultado tóxico o contraproducente.^{6;7}

2.2 Extractos de plantas.

En general, se denomina extracción sólido-líquido al procedimiento consistente en poner en contacto un sólido triturado con un líquido en el que son solubles algunas de las sustancias que lo componen.

Los extractos son fundamentales para aquellas plantas medicinales que no contienen aceites esenciales, pero si otros compuestos activos con variadas propiedades. También para plantas cuya pequeña concentración de aceite esencial ofrece un rendimiento muy bajo en la destilación.

La extracción de vegetales y plantas aromáticas o medicinales es un práctica común a escala domestica e industrial, existiendo gran cantidad de procedimientos.^{8;9}

2.2.1 Métodos de extracción.

Son procesos que se realizan para la obtención directa del extracto vegetal a partir de la planta. Existen diferentes tipos de extracción:

- Extracción mecánica
- Destilación
- Extracción con gases
- Extracción con disolventes

Aunque en éste caso emplearemos como método de extracción:

- Extracción discontinua: es una técnica en la que se sumerge la planta en el disolvente, por lo que la totalidad de la planta está en contacto con el disolvente utilizado para la extracción y la difusión de los metabolitos secundarios se producirá en todas direcciones hasta alcanzar el equilibrio.

Así mismo se conocen diferentes métodos de extracción discontinua:^{12; 37}

- 1) Maceración: consiste en poner en contacto la planta seca con el disolvente utilizado para la extracción a temperatura ambiente
- 2) Digestión: es un método extractivo en el que se trabaja a temperaturas muy elevadas.
- 3) Decocción: se pone en conjunto la planta con el disolvente y se lleva a ebullición, manteniendo dicha ebullición durante 15 a 30 minutos, una vez enfriado, se filtra y se exprime el residuo.

En el presente trabajo emplearemos la técnica que se describe a continuación, con algunas variaciones, las cuales describiremos más adelante y de forma más detallada en la obtención del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa*:

- 4) Infusión: se trabaja con un disolvente, generalmente agua, a temperatura próxima a la ebullición, en el que se introduce la planta que se quiere extraer y a continuación se deja enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente.

Para que se lleve a cabo correctamente la extracción con disolventes se debe tener en cuenta diversos factores como:

- Características de la planta: se debe trabajar con plantas desecadas y con un grado de división adecuado para facilitar el máximo contacto entre los metabolitos secundarios y el disolvente.
- Naturaleza del disolvente: principalmente se utilizan en las extracciones de agua o mezclas hidroalcohólicas en porciones variables. También es posible utilizar otros disolventes orgánicos como acetona o éter etílico. El agua es un buen disolvente de muchos metabolitos secundarios de las plantas pero por esta misma razón resulta generalmente poco selectivo.
- Temperatura: el aumento de la temperatura favorece la extracción de los metabolitos secundarios porque aumenta la solubilidad, pero a su vez, puede favorecer la degradación de dichos metabolitos secundarios, por ello es necesario controlarla.^{10;11}

2.2.2 Principio activo en plantas.

Son moléculas que, producidas por el metabolismo de un organismo vegetal, se encuentran dotadas de una actividad farmacológica puntual y que genera en el organismo modificaciones en una o más de sus células, y que pueden ser empleadas en la terapéutica.

Pueden ser una sustancia simple o compleja en dependencia de la ruta metabólica que haya dado su resultado a partir de la fotosíntesis.

2.3 Farmacognosia.

El nombre farmacognosia se deriva del griego *Pharmakon*, que significa droga por definición (aunque en México el término “droga” se inclina más al consumo de una sustancia ilícita, lo cual constituye uno de los principales problemas de salud pública, por tal motivo, emplearemos el término “fármaco” en lugar de “droga”) y *Gignosco*, adquirir el conocimiento de algo. Por lo tanto, la farmacognosia es la ciencia farmacéutica que se ocupa del estudio de las fármacos y las sustancias medicamentosas de origen natural, bien sea vegetal, microbiano (hongos, bacterias) y animal. Es la ciencia encargada del estudio de las fuentes naturales de materia prima de interés farmacéutico, estudiando tanto sustancias con propiedades terapéuticas como sustancias tóxicas, excipientes u otras sustancias de interés farmacéutico, aunque su uso sea básicamente tecnológico y no terapéutico (por ejemplo, el algodón y el almidón). En general, trata sobre los aspectos botánicos, químicos, biológicos y económicos de las drogas, destinadas a la preparación de medicamentos, de aquí que muchos autores designan a la farmacognosia como “Materia médica” o “Materia Farmacéutica”. La farmacognosia es la más antigua de las ciencias médicas, ya que el hombre primitivo tuvo que aprender a distinguir los productos que le servían de alimento y los curativos de los tóxicos.¹²

La farmacognosia tiene como metas:

- a) Determinar el origen sistemático de la especie (vegetal o animal), de la cual procede la droga.

- b) Establecer las características morfoanatómicas, tanto microscópicas y macroscópicas, como organolépticas, que permitan la caracterización del fármaco.
- c) Investigar los métodos óptimos de producción de los fármacos tanto a pequeña como a gran escala: cultivo, mejora, recolección, conservación, extracción de los principios activos, entre otros.
- d) Establecer la composición química del fármaco desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, sobre todo lo que se refiere a los principios activos.
- e) Obtener extractos del fármaco que contengan los principios activos.
- f) Controlar la calidad de los fármacos buscando métodos para comprobar los contenidos requeridos de principios activos, asegurando la ausencia de ciertos productos tóxicos y evitando adulteraciones y falsificaciones.
- g) Establecer las propiedades farmacológicas de los fármacos, es decir, su actividad.
- h) Investigar nuevos principios activos que puedan constituir un punto de partida para el diseño de nuevos fármacos en el futuro. Aquí colaboran: la etnofarmacognosia (conocimiento popular de la farmacognosia), la química hemisintética (síntesis de sustancias a partir de otras conocidas) y la quimiotaxonomía (relación entre los tipos de sustancias químicas encontrados en un ser vivo y su clasificación taxonómica).¹²

2.4 Familia *Asteraceae*.

Esta familia también llamada *Compositae* es reconocida como la familia con mayor riqueza y diversidad biológica.

La familia *Asteraceae* se divide en 13 tribus y es una de las más diversas y ampliamente distribuida de las angiospermas debido a su plasticidad genética, a su capacidad de distribución y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ecológicas. También, se considera que su plasticidad química ha desempeñado un papel preponderante en su diversificación debido a la presencia de metabolitos secundarios que han sido usados como mecanismo de defensa contra depredadores y/o competidores.³⁵

2.4.1 *Montanoa tomentosa* (Zoapatle).

Planta originaria de México, habita en climas semicálido y templado, entre los 1240 y hasta los 3900 msnm. Arbusto asociado a matorral xerófilo, pastizal inducido, bosques de encino, de pino, mixto de encino-pino y bosque de juníferos.

REINO:	Plantae	Este arbusto es común en las orillas de parcelas y caminos de las regiones altas y semiáridas del centro del país. Es una planta medicinal con mucha tradición en México para "acelerar partos" (el nombre náhuatl significa "planta medicinal de la mujer), pero su uso es de cuidado.
DIVISIÓN:	Magnoliophyta	
CLASE:	Magnoliopsida	
FAMILIA:	Asteraceae	
TRIBU:	Heliantheae	
GÉNERO:	Montanoa	
ESPECIE:	Tomentosa	
SUBESPECIE:	Tomentosa	

Tabla 1. Taxonomía de *Montanoa tomentosa*

Es muy frecuente su empleo en la terapéutica de malestares propios de la mujer especialmente en varios estados del centro del país como: Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Distrito Federal y al sur, en Oaxaca.¹³

Desde la época prehispánica, entre los mexicas, el cihuapatli que significa: "medicina o remedio para la mujer" (cihuatl), ha sido una planta de suma importancia para resolver problemas relacionados con el parto. Actualmente continúa destacando su utilidad para inducirlo, acelerarlo y o facilitarlos; aunque

con frecuencia es también usado como abortivo. Por lo general se ingiere el cocimiento de las hojas, ocasionalmente junto con la raíz o se prepara con canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y chocolate, para beberlo en el momento en que empiezan las contracciones o en casos de partos difíciles. Preparado junto con raíz de maíz (*Zea mays*) y las hojas de manzano (sp. n/r), endulzado con piloncillo se ingiere en el momento en que se requiera abortar. Posterior al parto, con el objeto de limpiar la matriz y expulsar completamente la placenta, se prepara un té agregando las hojas o ramas de ruda (*Ruta* sp.), bretónica (sp. n/r) y epazote (*Chenopodium* sp.), el cual se puede endulzar con chocolate o piloncillo y tomarlo antes y después del parto.

Las parteras tradicionales señalan que, en muchas ocasiones, la mujer puede llegar al término de su embarazo y no sentir los síntomas que anuncian el parto, si ello ocurre y la parturienta no ha llevado control de la fecha probable del parto, puede suceder que se pase y muera el producto en el vientre materno. Si por el contrario, se advierte que el embarazo está a término sin contracciones, ni dilatación, la partera proporciona a la madre un baño caliente, especialmente en temazcal, entonces administra el cihuapatli u otro oxitócico, generalmente acompañado de chocolate.

Asimismo para tratar trastornos menstruales, ya sea para facilitar el flujo, normalizar el ciclo o como estimulante emenagogo, se bebe el cocimiento concentrado de las hojas, en ayunas durante tres días y como agua de uso en caso de menstruación atrasada. Para aliviar cólicos menstruales o "dolores entuertos", la infusión se hace con las yemas foliares.

Se le atribuyen otros usos medicinales como: aumentar la secreción de leche y en baños para después del parto, contra el reumatismo y la flojera. Se le considera como un eficaz pero peligroso abortivo.¹⁴

Montanoa tomentosa es un arbusto de 1.5 m o más de altura, con pelos de apariencia lanosa, tiene muchas ramas. Sus hojas son más anchas en la parte que se une al tallo y más angostas en la punta, poco partidas, borde ligeramente aserrado y áspero en el haz, cuando se estrujan son aromáticas. Tiene sus flores



Ilustración 1. Planta de *Montanoa tomentosa*

dispuestas en cabezuelas parecidas a un racimo, las flores del centro son tubulares y blancas o color crema y las de la periferia tienen una lengüeta blanca o amarillenta. Los frutos son secos de una semilla comprimida.

La mayor dificultad para delimitar las especies del género *Montanoa* es su gran variación morfológica, caracteres tales como la morfología de la hoja, cantidad y tipo de pelos, número y forma de los filarios y número de flores liguladas y del disco varían enormemente dentro y entre las especies.¹⁵

2.5 Piel y características generales.

Antes de adentrarnos al proceso de cicatrización es importante mencionar algunos aspectos generales sobre la piel y sus componentes para comprender mejor dicho proceso y la importancia que éste tiene.

La piel representa el órgano más extenso del cuerpo. En el adulto tiene una superficie de 1.5 a 2 m² y es responsable, aproximadamente, del 16% del peso corporal.

Es un órgano complejo cuya función principal es formar una barrera que protege al organismo de su entorno y al mismo tiempo permite la interacción con él, desempeña una gran cantidad de funciones que incluyen:

- ✓ Conservación de la integridad del cuerpo
- ✓ Protección frente a agresiones externas
- ✓ Regulación de la temperatura
- ✓ Absorción y secreción de sustancias
- ✓ Absorción de radiación ultravioleta
- ✓ Producción de vitamina D
- ✓ Detección de estímulos sensoriales
- ✓ Barrera de protección contra microorganismos
- ✓ Reparación de heridas y cicatrización

Estas diversas funciones están mediadas por una o varias de las capas que conforman la piel.^{16; 17}

Consta de **tres capas**:

- ✓ La más superficial: **epidermis**
- ✓ La media: **dermis**
- ✓ La profunda: **hipodermis**
(Tejido graso subcutáneo).

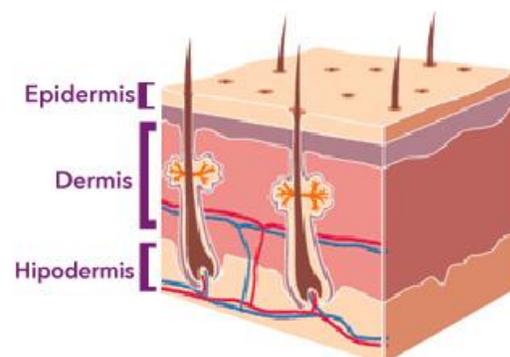


Ilustración 2. Capas de la piel.

Epidermis: Estructurada por un epitelio escamoso estratificado. Se compone principalmente por queratinocitos, también se encuentran melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

Esta capa está compuesta por cuatro estratos que representan las etapas de maduración de la queratina producida por los queratinocitos: estrato basal o germinativo, estrato espinoso, estrato granular y estrato córneo. Las células más profundas están vivas y proliferan con gran rapidez pasando gradualmente a la superficie, al hacerlo se queratinizan y finalmente se desprenden cuando la piel roza con la ropa u otras superficies.

Dermis: Situada por debajo de la epidermis, su principal componente es el colágeno que le confiere resistencia a la tensión. Interactúa con la epidermis en la reparación de heridas.

Está constituida por tejido conjuntivo que a su vez está formado por tres tipos de fibras: colágenas, elásticas y reticulares, sustancia fundamental cuyos componentes principales son los proteoglicanos y células, principalmente fibroblastos que sintetizan fibra y sustancia fundamental. También se encuentran las células cebadas, macrófagos, células dendríticas y linfocitos. En esta capa se localizan los apéndices derivados de la epidermis y las redes vasculares y nerviosas.

Tejido graso subcutáneo o Hipodermis: Está constituido por células grasas conocidas como adipocitos los cuales se disponen en lóbulos separados por tejido conectivo llamados septos o tabiques interlobulillares.^{17; 18}

2.5.1 Colágeno.

El colágeno es una proteína fibrosa que se encuentra en la piel, huesos, tendones, cartílagos, vasos sanguíneos, dientes, cornea etc.; en cada uno de estos tejidos tiene una estructura característica acorde a la función que desempeña. En la piel forma parte de la matriz extracelular del tejido conjuntivo, siendo el componente principal de la dermis como ya se ha mencionado previamente.¹⁹

Cada molécula de colágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas entrelazadas llamadas cadenas α ; las cadenas α se enroscan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. Cada tercer aminoácido de la cadena es una molécula de glicina (Gly) a excepción de los extremos, una hidroxiprolina o una hidroxilisina con frecuencia precede a una glicina de la cadena y cada glicina de la cadena suele ser seguida por una prolina (Pro).¹⁸

El tamaño de las cadenas polipeptídicas varía entre 600 y 3000 aminoácidos; el colágeno de la piel es rico en glicina (33% de los aminoácidos), prolina (13 %) y en los aminoácidos derivados 4-hidroxiprolina (9%) y 5-hidroxilisina (0.6%)^{18,40}.

Hasta ahora se han identificado por lo menos 42 tipos de cadenas α codificadas por genes diferentes y se han podido categorizar hasta 27 tipos de colágeno teniendo en cuenta las combinaciones de cadena α que contienen¹⁸. El colágeno tipo I es el más abundante y está formado por dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(II)$ por lo que su fórmula molecular $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(II)$, se encuentra en huesos, piel, tendones, tejido cicatrizado, pared intestinal y uterina, cartílago, cornea etc. El colágeno tipo II está compuesto por tres cadenas α idénticas $[\alpha 1(II)]_3$ y está

presente en los cartílagos y el colágeno tipo III $[\alpha 1(\text{III})]_3$ se encuentra en los vasos sanguíneos, piel, cicatrices y pared intestinal y uterina ^{19, 41}.

2.5.2 Heridas y cicatrización.

Una herida se define como la pérdida de continuidad de la piel o mucosa producida por algún agente físico o químico.

Las heridas se clasifican en agudas y crónicas:

- **Heridas agudas:** son de corta evolución y se caracterizan por una curación completa dentro de 6 a 12 semanas, el proceso ocurre con pocas complicaciones o ninguna y el resultado es una herida bien sanada; por lo general están causadas por un agente externo traumático.^{20;21;22}
- **Heridas crónicas:** se definen como las heridas en las que no se ha logrado llevar a cabo un proceso de cicatrización ordenado, la mayoría de las heridas que no han cicatrizado en 3 meses se consideran crónicas.²² El mecanismo más usual es la desregulación de una de las fases del proceso de cicatrización, esto ocurre con mayor frecuencia en la fase inflamatoria.²¹

Por otra parte, al producirse una herida, acontece un conjunto de procesos biológicos que utiliza el organismo para recuperar su integridad y arquitectura, que se conocen como proceso de cicatrización y que involucra tres fases:

- **Fase inflamatoria:** entre el primer y el segundo día. Se caracteriza por una respuesta vascular y otra celular, manifestadas por vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y aparición de leucocitos, formándose una costra que sella la herida. Durante este periodo, el tejido no recupera una

fuerza de tensión apreciable y depende únicamente del material de sutura para mantener su aposición. Ésta fase a su vez se divide en fase inflamatoria temprana y tardía:

- *Fase inflamatoria temprana*

Esta fase tiene muchas funciones, activa la cascada de complemento y se inicia la infiltración de neutrófilos con el propósito de prevenir la infección de la herida.

Los neutrófilos son atraídos al sitio de la herida de 24-36 horas después de la lesión por agentes quimioatrayentes incluyendo TGF- β , componentes del complemento como C3a y C5a, factores de crecimiento liberados por las plaquetas y productos de degradación de bacterias como lipopolisacáridos. Los neutrófilos se encargan de fagocitar bacterias, partículas extrañas y tejido dañado^{32, 42,43}.

- *Fase inflamatoria tardía*

Inicia después de 48-72 horas después de la herida, los macrófagos aparecen y continúan el proceso de fagocitosis, tienen una vida útil más larga que los neutrófilos y son atraídos por principalmente por la expresión de MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), así como factores de coagulación, componentes del complemento, citocinas tales como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF- β , leucotrieno B₄ (LTB₄) y el factor plaquetario IV, así como la elastina y productos de degradación del colágeno.

Los macrófagos actúan como células reguladoras y proporcionando un importante reservorio de factores de crecimiento necesarios para la formación de la matriz extracelular, particularmente TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), así como otros mediadores TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa), HB-EGF (Factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina, FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos) y colagenasa, lo cual activa queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. Las últimas células que llegan al sitio son los linfocitos, que llegan 72 horas después de la lesión por acción de la interleucina-1, componentes del complemento e IgG. La IL-1 (interleucina 1) juega un importante papel en la regulación de la colagenasa, que es necesaria más tarde para la remodelación del colágeno, la producción de componentes de la matriz extracelular y su degradación. ^{42,43}

Para que la reparación de la herida sea exitosa se requiere la resolución de la respuesta inflamatoria. Una resolución incompleta conduce a la formación de cicatrices y fibrosis, la fibrosis es una cicatrización aberrante causada el exceso de tejido fibroso conectivo. Para que la resolución suceda, los neutrófilos deben ser eliminados del sitio por apoptosis o ser fagocitados por macrófagos. Los macrófagos son inactivados por citocinas antiinflamatoria tales como la interleucina-10 (IL-10) ²⁴.

- **Fase de fibroplasia** (o de migración/proliferación). Inicia alrededor del cuarto o quinto día después de la lesión y puede durar semanas. Los eventos más importantes de esta fase son la angiogénesis, la formación de tejido de granulación, la reepitelialización y la contracción. ^{32,42}

- *Angiogénesis*

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, esto es esencial para que el proceso de cicatrización se lleve a cabo de manera exitosa ya que provee de nutrientes y oxígeno al tejido de granulación.^{24,25}

El proceso de la angiogénesis inicia con la migración de las células endoteliales al sitio de la lesión y su proliferación, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, los nuevos capilares que se forman se van ramificando e invadiendo la matriz de fibrina en el sitio de la herida, formando así una compleja red vascular ramificada, la pared vascular de los nuevos vasos se estabiliza mediante la incorporación de pericitos y células musculares lisas para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables.^{25,32}

La angiogénesis es un proceso controlado por citocinas y factores de crecimiento como PDGF, FGF-1, FGF-2, VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), TGF- α , MCP-1 y MIP-1 α (Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa); los más importantes son PDGF (especialmente PDGF-BB) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular):

- PDGF: induce la producción de otros factores angiogénicos (VEGF y FGF-2) y está involucrado en el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas.
- VEGF: el factor de crecimiento de queratinocitos es producido por queratinocitos y macrófagos en respuesta a KGF (factor de crecimiento de

queratinocitos) y TGF- α y promueve la expresión de la Óxido nítrico sintasa, el óxido nítrico es un potente inductor de la angiogénesis.

La angiogénesis es inhibida por la trombospondina 1 (TSP-1), IFN- γ (interferón gamma), IL-4, IP-10 y TIMP (Inhibidor tisular de metaloproteínas), que inhiben la migración o proliferación de células endoteliales.²⁴

- *Formación de tejido de granulación*

En respuesta al daño, los fibroblastos cercanos migran al sitio de la lesión atraídos por factores tales como TGF- β y PDGF, que son liberados por las células inflamatorias y plaquetas.⁴²

La infiltración de fibroblastos comienza después de dos o tres días que se produjo la lesión, una vez que los fibroblastos proliferan en el sitio de la herida, comienzan a sintetizar colágeno del tipo III, reemplazando el coágulo con una matriz rica en colágeno, hialuronano, fibronectina y proteoglicanos, a esta matriz se le conoce como tejido de granulación o matriz extracelular. El término "granulación" se deriva de la apariencia en general del tejido en esta fase de la formación, tras un examen minucioso, el tejido parece contener numerosos gránulos diminutos, que en realidad son los vasos sanguíneos pequeños^{24,32}.

El colágeno es un importante componente en todas las fases de cicatrización, sobre todo en las etapas de proliferación y maduración, proporciona integridad y fuerza a todos los tejidos ⁴². La síntesis de colágeno requiere la hidroxilación de residuos de prolina y de lisina. Algunos cofactores como el oxígeno, el hierro o vitamina C son necesarios para la síntesis de colágeno³².

- *Reepitelialización*

Los queratinocitos comienzan a proliferar y migran al área de la herida hasta que un nuevo epitelio cubre el área dañada. La reepitelialización se logra mediante la migración, la proliferación y diferenciación de los queratinocitos de la epidermis^{24,32}

La reepitelialización comienza unas pocas horas después de producirse una lesión cutánea, cuando se los queratinocitos que presentan proyecciones como pseudópodos se observan alrededor del área de la lesión. Dentro de 24 horas, las células epidérmicas se desprenden de la lámina basal en la que se encuentran unidas y comienzan a desplazarse hacia la matriz de la herida, este movimiento se da por la contracción y la reinserción de filamentos de actina y miosina a nivel intracelular, esta capacidad migratoria adquirida se conoce como transición epitelial-mesenquimal (EMT), en donde las células pierden adhesión e incrementan su movilidad. La migración de los queratinocitos es independiente de su proliferación, está regulada por la tensión de oxígeno en el tejido y la humedad del medio ambiente.

Horas después de la migración, los queratinocitos comienzan a proliferar, esto está mediado por factores de crecimiento liberados localmente incluyendo TNF- α , EGF (factor de crecimiento epidérmico), HB-EGF y KGF-1; en los siguientes días las células epidérmicas proliferan formando y produciendo nuevas células epidermales y permitiendo que el proceso de epitelización sea completado. Durante el proceso los queratinocitos libran IL-1 que actúa como señal que conduce a la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos y a la proliferación de fibroblasto. ^{24; 32}

- *Contracción*

La contracción de la herida es un suceso muy importante que contribuye al cierre de la herida, comienza unos pocos días después de la lesión y ocurre de forma simultánea a la fase de remodelamiento. La contracción reduce el tamaño y por lo tanto se acorta el período de cicatrización ^{24,32}, también junta las fibrillas de colágeno y las organiza de manera perpendicular a los bordes de la herida, lo que aumenta la fuerza mecánica del tejido.⁴⁴

La contracción es un proceso activo mediado por la diferenciación de las células de la herida en miofibroblastos, estas células tienen características contráctiles y expresan una α -actina que se encuentra en las células de músculo liso. No está completamente claro cuál es la principal célula progenitora de los miofibroblastos en el tejido de granulación, aunque la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos ha sido bien documentada, los miofibroblastos se pueden originar de otras células, incluyendo células madre mesenquimales, células endoteliales, pericitos, fibrocitos y células epiteliales ⁴⁴. La diferenciación de los miofibroblastos comienza cuando el tejido de granulación se encuentra bien establecido alrededor del día siete después de que se produjo la lesión, es un proceso gradual en donde ciertos factores de crecimiento como TGF- β 1 regulan la conversión de fibroblastos en miofibroblastos^{32,44}.

Un hecho importante a tomar en cuenta durante el proceso experimental es que en la piel humana la contracción puede cerrar cerca del 50 % de la herida, pero en ratones se puede cerrar hasta en un 90% ⁴⁴.

- **Fase de maduración o remodelación:** Se extiende entre el 15° día hasta que se logra la cicatrización completa (6 meses a un año). El principal evento fisiológico es la reepitelización y el aumento progresivo de la fuerza tensil de la piel (hasta 70 a 90% de la fuerza original). Posteriormente ocurre la remodelación del colágeno y la regresión endotelial, traducida clínicamente por disminución del color cicatrizal.^{23; 36}

La fase de remodelación es un proceso continuo de equilibrio dinámico entre la síntesis de colágeno tipo I y la lisis de colágeno tipo III ³², esta lenta degradación del Colágeno tipo III está mediada por metaloproteinasas secretadas por los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales que se encuentra en la matriz ⁴³.

El colágeno sintetizado inicialmente es altamente desorganizado, pero con el tiempo se ordena y adquiere una organización en red, el proceso es regulado por una serie de factores, como PDGF, TGF- β y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) siendo el más importante ⁴⁵. La creciente cantidad de colágeno estable y la alineación de las fibras aumentan gradualmente la fuerza de la cicatriz ²⁵. Las fibras de colágeno tipo I pueden recuperar aproximadamente el 80% de la resistencia original, la fuerza adquirida del tejido al final dependerá de su localización y duración del proceso, pero siempre tendrá un mayor riesgo de romperse en comparación con el tejido intacto ^{32,42}.

2.5.3 Tratamiento de heridas.

El cuidado inadecuado de una herida puede retrasar su curación haciendo que el área se infecte y posteriormente resulte en una herida crónica, los microorganismos están presentes en el 95% de las heridas crónicas y se adquieren a partir de la flora habitual de la piel del hospedero y del ambiente externo.^{26; 27}

Para reducir el riesgo de infección en pequeños cortes y quemaduras se utilizan ungüentos antimicrobianos tales como sulfadiazina de plata, mafenida, nitrato de plata, povidona yodada, mupirocina y bacitracina, sin embargo estos antimicrobianos tópicos tienen algunos efectos secundarios y son sólo parcialmente eficaces en la curación de la heridas.²⁶

La aplicación tópica de un agente antimicrobiano puede prevenir la infección de la herida evitando la entrada de microorganismos y previniendo la progresión de la infección. Un antimicrobiano es una sustancia natural o producto químico de síntesis capaz de inhibir el crecimiento y división de los microorganismos, dentro de los antimicrobianos se incluyen los antibióticos, antisépticos y desinfectantes entre otros. La selección de un agente antimicrobiano debe ser influenciada por su especificidad y eficacia, citotoxicidad en células humanas, potencial en contra de cepas resistentes y su alergenidad.^{27; 28}

Algunos productos derivados de plantas tienen potencial para controlar el crecimiento microbiano en diversas situaciones, actualmente los datos sobre la actividad antimicrobiana de numerosas plantas, hasta ahora considerados

empíricos, han sido científicamente confirmados de forma paralela con el creciente número de reportes sobre los microorganismos patógenos resistentes a algunos antimicrobianos.²⁹

2.6 Técnicas empleadas para la evaluación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* y sus fundamentos.

2.6.1 Modelo de escisión en roedores.

El método más utilizado para evaluar terapias cicatrizantes o investigar mecanismos de curación de heridas es el modelo de escisión en el dorso de roedores. Las heridas realizadas por escisión implican una pérdida de tejido mediante la eliminación completa de la piel incluyendo epidermis, dermis, tejido subcutáneo y el panículo carnoso, una capa muscular subyacente encontrada en roedores.

El modelo de escisión permite evaluar cualitativa y cuantitativamente los procesos de cicatrización incluyendo la formación de tejido de granulación, resolución de la inflamación, reepitelización y procesos de angiogénesis, así como medir la fuerza de la cicatriz y la actividad cicatrizante.

Estos procesos pueden ser analizados mediante diferentes técnicas como:

- ✓ Estudios de expresión génica
- ✓ Immunoblot
- ✓ Análisis histológicos.^{30; 31}
- ✓ Ensayos de adhesión celular a fibronectina
- ✓ Ensayos de migración celular⁴⁷

Además de los ensayos ya mencionados se puede hacer determinación de nitritos y de hidroxiprolina, las cuales fueron de elección para éste trabajo debido a la alta sensibilidad que poseen y el bajo costo que representa su realización, por lo que a continuación se describen más detalladamente sus fundamentos.

2.6.2 Determinación de nitritos.

El óxido nítrico (ON) es conocido como un potente inductor de la angiogénesis; es sintetizado a partir de del aminoácido L-arginina, a través de la enzima ON-sintasa (ONS). Es un vasodilatador y regula la proliferación y diferenciación de varios tipos de células como macrófagos, queratinocitos, fibroblastos, y células endoteliales durante la fase inflamatoria y proliferativa durante el proceso de cicatrización, por lo que afecta la angiogénesis, la deposición de colágeno y la contracción de la herida. La evidencia sugiere que un cierto aumento en la producción de ON puede ser beneficioso para el proceso de curación normal, sin embargo se requiere mayor investigación para identificar los mecanismos exactos por los que el óxido nítrico interviene en el proceso de cicatrización.^{24; 32}

La medición del óxido nítrico en sistemas biológicos necesita algunas consideraciones ya que es rápidamente oxidado a nitritos y/o nitratos por el oxígeno ³³, estos metabolitos son estables y pueden cuantificarse para determinar de manera indirecta la concentración de ON mediante la reacción de Griess, un procedimiento que consta de dos pasos, primero los nitratos son reducidos a nitritos por medio de una conversión enzimática o una reducción por cadmio metálico seguida de una reacción de diazotación con el reactivo de Griess para

formar un azocompuesto cuya concentración puede ser determinada espectrofotométricamente.³⁴

2.6.3 Determinación de hidroxiprolina.

La determinación de hidroxiprolina por medio de espectrofotometría es un método que permite determinar el colágeno en muestras de tejido. El procedimiento para determinar la hidroxiprolina está basado en empleo del reactivo de Ehrlich en una reacción de oxidación.

La muestra de tejido debe ser hidrolizada para liberar la hidroxiprolina del colágeno y después oxidarla empleando cloramina-T, la estructura de la hidroxiprolina contiene un anillo de pirrolidina que mediante deshidrogenación oxidativa se transformará a un anillo de pirrol que después puede ser determinado mediante el reactivo de Ehrlich (4-(N,N-dimetilamino) benzaldehído), el resultado es compuesto con una intensa coloración naranja que se determina por medio de un espectrofotómetro.

3. Planteamiento del problema.

Las heridas han afectado a los seres humanos a lo largo del tiempo, los primeros tratamientos se basaron en el uso de plantas y minerales, de las cuales sus propiedades únicamente eran conocidas de manera empírica. Actualmente, el tratamiento de las heridas es costoso y por lo tanto, la gente recurre al uso de plantas como principal remedio medicinal, ya que éstas se encuentran al alcance de todos, tal es el caso de *Montanoa tomentosa* o también conocida como Zoapatle, que es empleada para el tratamiento de heridas como cicatrizante, sin embargo, muchos de los efectos atribuidos a ésta planta no han sido evaluados científicamente, por lo tanto nos surge la siguiente pregunta: ¿El extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* tiene efecto cicatrizante en ratones CD1 et/et?

4. Hipótesis.

Considerando el uso empírico del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* en heridas, se espera que dicho extracto tendrá un efecto cicatrizante sobre las escisiones realizadas en los ratones CD1 et/t.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general.

- ✓ Evaluar el efecto cicatrizante del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* en modelo de ratones CD1 et/et.

5.2 Objetivos específicos.

- ✓ Obtener un extracto acuoso a partir de la planta *Montanoa tomentosa*.
- ✓ Elaborar un ungüento al 4% a partir del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa*.
- ✓ Comparar el efecto cicatrizante del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* con un fármaco cicatrizante como control positivo (Madecassol), así como un control negativo (Vaselina), en las escisiones practicadas en ratones CD1 et/et.
- ✓ Evaluar la cantidad de nitritos presentes en suero, obtenido de los ratones tratados con el extracto de *Montanoa tomentosa*.
- ✓ Evaluar la formación de colágeno mediante la determinación de hidroxiprolina en las muestras de tejido obtenidas de los ratones tratados con el extracto acuoso de la planta.

6. Diseño experimental.

Tipo de estudio: Experimental

Población de estudio: 18 ratones CD1 et/et.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:

- **Inclusión:** Ratones CD1 et/et hembras entre 30 y 40 gramos de peso de 3 a 4 meses de edad, sanos.
- **Exclusión:** Ratones enfermos, bajos de peso o muy pequeños.
- **Eliminación:** Ratones que mueran durante el experimento, se infecten las heridas o desarrollen algún tipo de tumor.

Actividad cicatrizante

Tratamiento:

1. **Vaselina** (control negativo)
2. **Madecassol** (control positivo)
3. **Ungüento** al 4% elaborado con el extracto acuoso de *Montanoa tomentosa*

Variables dependientes

- ✓ Diámetro promedio de las lesiones en los ratones.
- ✓ Estimación de colágeno por medio de la determinación de hidroxiprolina.
- ✓ Estimación de angiogénesis por medio de la determinación de nitritos.

Variables independientes

- ✓ Concentración del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa*
- ✓ Hora de administración del ungüento
- ✓ Técnica de administración del ungüento

7. Métodos.

7.1 Obtención del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa*.

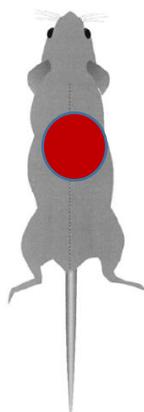
- a) Se tomó una cantidad de aproximadamente 200 g de hojas secas de *Montanoa tomentosa*, se lavaron a chorro de agua para deshacernos de la basura y/o tierra que puedan contener las hojas.
- b) Las hojas se licuaron y la mezcla homogénea se colocó en un matraz Erlenmeyer de 4 L con tapón, se le agregó agua destilada hasta completar el volumen de 2 L, se colocó el tapón y se dejó reposar durante 4 días.
- c) Después del reposo, la mezcla se filtró por gravedad a través de una gasa.
- d) Ya filtrado el extracto acuoso, el disolvente utilizado (agua destilada), se eliminó en un rotavapor a 60°C, hasta que se obtuvo un concentrado con el mínimo de humedad.
- e) El concentrado obtenido, se colocó en un vaso de precipitados y se dejó secando en la estufa a 37°C durante dos semanas.
- f) Ya que se obtuvo el extracto seco, se pulverizó con la ayuda de un mortero.
- g) El extracto se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

7.2 Elaboración del ungüento al 4% con extracto acuoso de *Montanoa Tomentosa*.

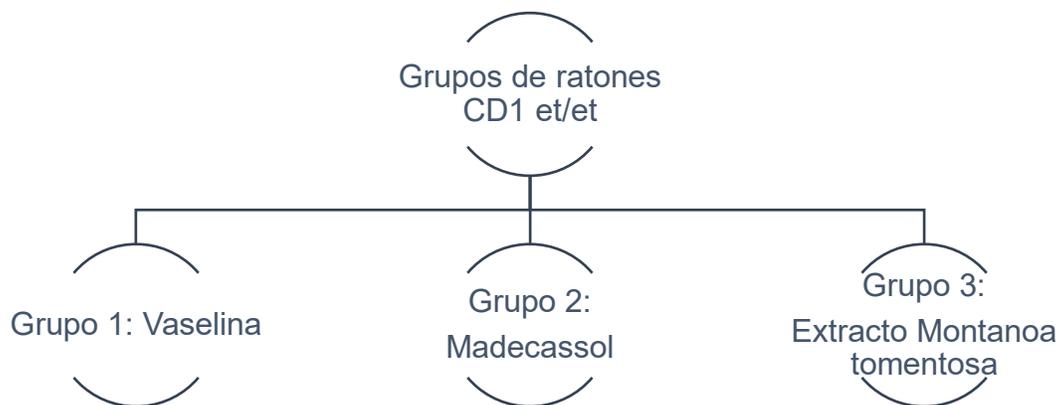
1. Se colocaron 10 g. de vaselina en un vaso de precipitados.
2. Por otra parte, se pesaron 0.4 g del extracto de *Montanoa tomentosa* y se disolvieron en 0.5-1 mL de agua (el mínimo de agua requerido para disolver).
3. Para incorporar el extracto a la vaselina, ésta última se fundió en el horno de microondas en ciclos de 30 segundos hasta que se licuó.
4. Ya que se tuvo la vaselina completamente líquida, se fue adicionando poco a poco el extracto disuelto en agua, al mismo tiempo que se fue mezclando con la ayuda de una varilla de vidrio.
5. Una vez que se tuvo bien homogenizada la mezcla, se guardó siempre protegida de la luz por si acaso era fotosensible.

7.3 Escisión en los ratones CD1 et/et.

- ✓ Se emplearon 18 ratones et/et hembras de entre 30 y 40 gramos de peso y se separaron en 3 grupos de 6 ratones cada uno.
- ✓ Uno por uno fueron anestesiados dentro de una cámara de éter para realizar la escisión circular en la región dorsal con la ayuda de un sacabocados estéril de acero inoxidable y de 1 cm de diámetro, la escisión se realizó en el área indicada por el círculo en la siguiente figura:



- ✓ Una vez realizada la escisión, se midió el diámetro de la herida de cada uno de los ratones y se aplicó uno a uno el ungüento correspondiente de acuerdo a la siguiente organización:



- ✓ Posteriormente se colocaron en jaulas con separadores para que los ratones se encontraran aislados uno del otro y así evitar mordeduras o algún tipo de lesión ocasionada entre ellos mismos.
- ✓ Durante los siguientes 11 días, se midió diariamente el diámetro de la herida de cada ratón y se les aplicó nuevamente Vaselina, Madecassol o ungüento del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa*, según el grupo al que pertenecía cada animal.
- ✓ Para el doceavo día, se anestesiaron nuevamente los ratones uno a uno, cuidando que el corazón no dejara de latir para poder obtener una muestra de sangre de cada ratón haciendo una incisión en el plexo axilar, ésta muestra se recolectó en viales cónicos (Eppendorf) para después realizar la determinación de nitritos a partir del suero.
- ✓ Después de recolectar la sangre de cada uno de los ratones, se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron muestras del tejido tratado, empleando el mismo sacabocados que se utilizó al inicio del ensayo, las muestras de piel fueron pesadas y se guardaron en viales cónicos (Eppendorf) para la determinación de hidroxiprolina.

Nota. *Todas las muestras permanecieron en congelación y bien etiquetadas hasta el día que se realizó cada determinación.*

7.4 Determinación de nitritos.

Preparación de reactivos:

- **Sulfato de zinc para desproteinizar:** Se preparó una solución de $ZnSO_4$ pesando 300 g/L o 30 g/dL.
- **Solución acuosa de ácido acético al 15% V/V.** Se prepararon 300 mL aproximadamente.
- **Reactivo de sulfanilamida:** Se prepararon 150 mL de ácido acético al 15% y se disolvieron en él 0.5 g de sulfanilamida. Se etiquetó y guardó en un frasco protegido de la luz.
- **Reactivo de NED:** En 150 mL de ácido acético al 15% previamente preparado, se disolvieron 0.2 g de *N*-(1-naftil)-etilendiaminodihlorhidrato. Se guardó y etiquetó en un frasco protegido de la luz.
- **Solución estándar de Nitrito de sodio:** Se preparó una solución de 2 $\mu\text{g/ml}$. **SU PREPARACIÓN SE REALIZÓ AL MOMENTO DEL ENSAYO.**

También se prepararon las siguientes soluciones:

- **Solución acuosa de $CuSO_4$ al 5%.**
- **Ácido clorhídrico 0.1 N.**
- **Solución acuosa de NH_4Cl al 5%** (El pH se ajustó a 9 con borato de sodio).

NOTA. Este análisis redujo los nitratos (NO_3^-) a nitritos (NO_2^-) mediante cadmio metálico plateado con sulfato de cobre (II).

Activación del cadmio para la reacción óxido-reducción en la determinación de nitritos.

1. En 18 tubos de 13X100 limpios y secos, se colocaron 0.5 g de cadmio metálico a cada uno en la campana de extracción.
2. El cadmio se plateó con la solución acuosa de CuSO_4 (2 ml por tubo aproximadamente).
3. Se puso en agitación en un rocker durante 10 minutos aproximadamente hasta que el cadmio se plateó.
4. La solución acuosa de CuSO_4 se retiró con la ayuda de una pipeta Pasteur y el cadmio plateado fue lavado con agua destilada para eliminar el cobre (*tres lavados con el tubo lleno*).
5. Después de los lavados con agua, cada tubo se volvió a lavar por duplicado con *ácido clorhídrico 0.1N* para remover todo el $\text{Cd}(\text{OH})_2$.
6. Por último el cadmio se lavó con la solución acuosa de NH_4Cl .

Procedimiento utilizado para determinación de nitritos en las muestras de suero:

- A 100 μL de plasma de ratón se le adicionaron 300 μL de agua destilada (dilución 1:4).
- Se desecharon 20 μL de la mezcla anterior y en su lugar se adicionaron 20 μL de la solución de ZnSO_4 , se mezcló bien y el precipitado se separó por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos.
- Se tomó un tubo con el cadmio activado y se le tiró el NH_4Cl , escurriendo bien. A éste tubo se le adicionó todo el sobrenadante obtenido de la muestra que se centrifugó.
- Ya juntos la muestra y el cadmio, se tapó el tubo con parafilm y se dejó en agitación en un rocker durante 15 minutos.
- Transcurrido ese tiempo se centrifugaron los tubos a 3,500 rpm durante 5 minutos y se tomaron 200 μL del sobrenadante para el ensayo.

Curva estándar para determinación de nitritos.

A continuación se muestran las diluciones y la adición de reactivos que se realizaron para obtener la curva estándar en la determinación de nitritos.

Tubo	Estándar (μL)	Agua destilada (μL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
muestra	200 (sobrenadante*)	700

✓ Se adicionaron 50 μL de sulfanilamida y, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente

✓ Se adicionaron 50 μL del reactivo de NED y se mezclaron e incubaron 30 minutos a temperatura ambiente

7.5 Determinación de hidroxiprolina.

Preparación de reactivos:

- **Buffer pH 6.5:** Se disolvieron 120 g de acetato de sodio, 46 g de ácido cítrico, 12 mL de ácido acético y 34 g de hidróxido de sodio en agua destilada y el pH se ajustó a 6.5, después se aforó a un litro con agua destilada.
- **Ácido perclórico 3.15M:** Se diluyeron 27 mL de ácido perclórico al 70% en 100 mL de agua destilada.
- **Cloramina-T:** Se disolvieron 1.41 g de cloramina-T en 20 mL de agua destilada y se añadieron 30 mL de metilcelosolve y 50 ml del buffer anterior; *fue preparada al momento del ensayo.*
- **Reactivo de Erlich (p-dimetilaminobenzaldehído al 20%):** Se preparó un poco antes del ensayo. Se disolvieron 20g de p-dimetilaminobenzaldehído en 100 mL de metilcelosolve. Se colocó en baño María a 60°C, aproximadamente 2 minutos para que se disolviera.

Curva estándar de hidroxiprolina:

- Se pesaron 0.2 g de hidroxiprolina estándar y se diluyó en 0.5 mL de HCl 0.001 N. Se calentó en baño María a 60°C hasta que se disolvió. A partir de ésta disolución se realizaron las siguientes diluciones:

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

- Se tomaron 50 µL de cada una de las diluciones preparadas anteriormente y fueron trasvasadas a tubos de ensaye de plástico de 12x75.
- A cada tubo se le adicionaron 450 µL de Cloramina-T y se dejaron oxidar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Después de dejar oxidar, se agregaron 450 µL de ácido perclórico 3.15 M y se dejaron en reposo durante 5 minutos.

- Por último se adicionaron 500 μL del reactivo de Ehrlich y se dejó incubando en baño María a 60° veinticinco minutos.
- Al retirarlos del baño María, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 5,000 rpm durante cinco minutos.
- El sobrenadante de cada tubo fue separado y se colocó en otro para después leer la absorbancia de cada uno a 557 nm en un microespectrofotómetro.

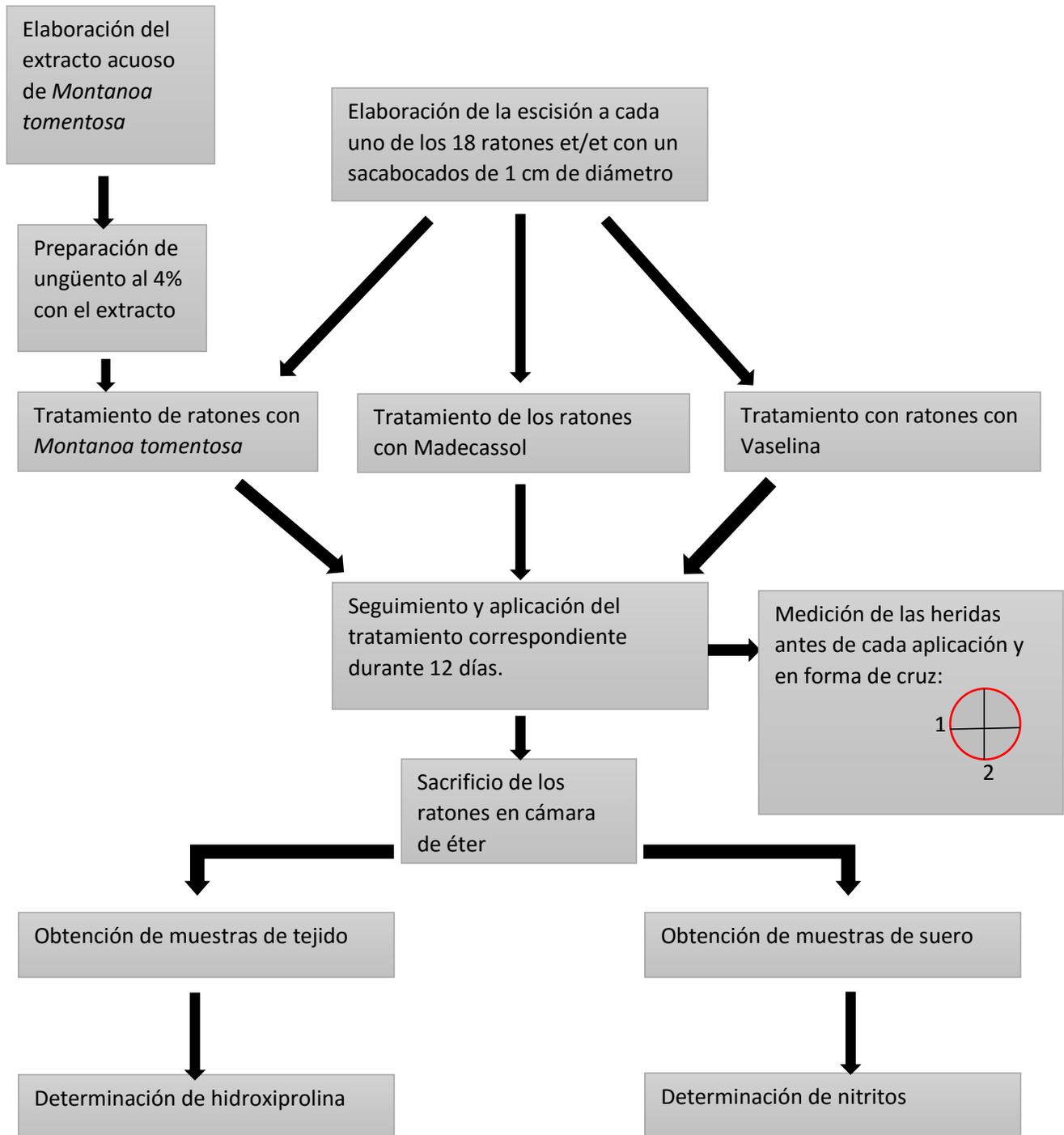
➤ **Blanco:**

- 1) En un tubo de ensaye de plástico de 12x75 se colocaron 50 μL de agua destilada.
- 2) Se le agregó 450 μL de Cloramina-T y se dejó oxidar durante 20 minutos a temperatura ambiente
- 3) Posteriormente, se adicionaron 450 μL de ácido perclórico 3.15 M y se dejó reposar durante cinco minutos
- 4) Transcurridos los cinco minutos se adicionaron 500 μL del reactivo de Ehrlich y la mezcla se dejó incubando en baño María a 60°C durante 25 minutos.
- 5) Después, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el tubo fue centrifugado a 5,000 rpm durante cinco minutos.
- 6) El sobrenadante fue separado y utilizado para ajustar el microespectrofotómetro a cero a 557 nm.

Procesamiento de las muestras de piel para la determinación de hidroxiprolina:

- ✓ A las muestras de piel previamente pesadas y ya descongeladas se les adicionaron 500 μL de hidróxido de sodio 2 N y posteriormente los viales fueron sellados con papel aluminio y se llevaron a la autoclave a 120°C durante 20 minutos
- ✓ Pasado éste tiempo, los tubos fueron sacados del autoclave y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para después meterlos a centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos
- ✓ Una vez centrifugadas las muestras y cuidadosamente sin tomar trazas del tejido digerido, en tubos de ensaye de plástico de 12x75 se apartaron 50 μL del sobrenadante de cada muestra
- ✓ Posteriormente, a cada tubo se adicionaron 450 μL de Cloramina-T y se dejaron oxidar durante 20 minutos a temperatura ambiente
- ✓ Luego, se adicionaron 450 μL de ácido perclórico 3.15 M y se dejaron reposando por cinco minutos
- ✓ Transcurrido éste tiempo se agregaron 500 μL del reactivo de Ehrlich y se pusieron a incubar en baño María a 60°C durante 25 minutos
- ✓ Después de sacar los tubos del baño María, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 5,000 rpm durante cinco minutos
- ✓ Se separó el sobrenadante y se leyeron las absorbancias a 557 nm en el microespectrofotómetro.

8. Diagrama de flujo.



9. Resultados y análisis de resultados.

9.1 Evolución de las escisiones en ratones CD1 et/et.

En las imágenes que se presentan a continuación se observa la evolución de las heridas en los ratones con diferentes tratamientos.

En las **Imágenes 1, 2 y 3** correspondientes al primer día de aplicación se pueden observar una herida brillante con bordes bien delimitados debido a que la escisión es reciente.



Imagen 1. Día 1; Vaselina



Imagen 2. Día 1; Madecassol



Imagen 3. Día 1; Extracto de *Montanoa tomentosa*

A partir del tercer día hasta el quinto, las heridas evolucionan positivamente debido a la apreciación de tejido granular (**Imágenes 4, 5 y 6**).



Imagen 4. Día 4; Vaselina



Imagen 5. Día 4; Madecassol



Imagen 6. Día 4; Extracto de *Montanoa tomentosa*

Para el sexto día de aplicación se encontró una mejora en las heridas, ya que el tejido granular disminuye y existe regeneración de tejido epitelial (**Imagen 7, 8 y 9**).



Imagen 7. Día 6; Vaselina



Imagen 8. Día 6; Madecassol



Imagen 9. Día 6; Extracto de *Montanoa tomentosa*

Finalmente, para el onceavo día, el tamaño de la herida disminuyó debido a la regeneración del tejido epitelial, se puede decir que es una herida casi regenerada ya que la tonalidad de ésta es muy semejante al resto de la piel del ratón (**Imagen 10, 11 y 12**).



Imagen 10. Día 11; Vaselina



Imagen 11. Día 11; Madecassol



Imagen 12. Día 11; Extracto de *Montanoa tomentosa*

Como se puede observar, en el análisis visual de las heridas no se apreciaron diferencias, esto sin importar el tipo de tratamiento aplicado. Además, se realizó un análisis estadístico con los promedios de los diámetros de las escisiones de cada grupo (**Cuadro 1**), en el que no se observa una diferencia significativa entre medias.

Cuadro 1. Diámetros finales en cm de las lesiones por grupo

Grupo	Vaselina	Madecassol	Extracto <i>Montanoa tomentosa</i>
Diámetro final	0.1217±0.04	0.1117±0.06	0.10±0.04

Prueba ANOVA de un factor con el 95% de confianza, los valores representan la media ± desviación estándar. La diferencia entre medias no es significativa ($p>0.05$).

Lo anterior nos sugiere que los tres ungüentos presentaron el mismo efecto cicatrizante.

9.2 Determinación de nitritos.

De las muestras de sangre obtenidas de cada ratón se extrajo el suero, el cual se utilizó para la determinación de nitritos, en el **Cuadro 2** se observa la diferencia que hubo entre los tratamientos, siendo la Vaselina la que mayor concentración presentó, seguida del Madecassol y por último el extracto de *Montanoa tomentosa*:

Cuadro 2. Comparación de concentraciones de Nitritos ($\mu\text{g/dL}$)

Grupo	Vaselina	Madecassol	Extracto <i>Montanoa tomentosa</i>
Nitritos ($\mu\text{g/dL}$)	2.2217 \pm 1.00	1.38 \pm 0.19	0.402 \pm 0.22

Prueba ANOVA de un factor con el 95% de confianza, los valores representan la media \pm desviación estándar. La diferencia entre medias es significativa ($p < 0.05$).

Como podemos observar, las concentraciones de nitritos, obtenidas del suero de los ratones tratados con Vaselina (control negativo), son las más elevadas en comparación con los otros tratamientos, esto probablemente a que la Vaselina a pesar de que no tiene actividad cicatrizante, pudo mantener la humedad adecuada en la herida al cubrirla y mantenerla sellada del entorno, favoreciendo la proliferación celular y una correcta reepitelización.

En lo que concierne al tratamiento con Madecassol (control positivo), se obtuvo una menor concentración de nitritos respecto al grupo del control negativo, en éste punto del experimento se esperaba que el Madecassol siendo el control positivo tuviese una mayor concentración de ambos compuestos ya que la *Centella asiática* (principio activo del Madecassol) es un cicatrizante utilizado comúnmente,

el cual estabiliza la producción de fibras de colágeno cuando están alteradas, en exceso, faltantes o desorganizadas y promueve la curación por estimulación del sistema reticuloendotelial y el tejido de vascularización³⁸, pero contrario a lo esperado, estuvo por debajo de lo obtenido en el tratamiento con Vaselina, lo que nos lleva a pensar que la presentación en polvo del Madecassol es obsoleta y que las concentraciones obtenidas para nitritos, fueron gracias a la acción de la Vaselina.

Las muestras obtenidas del grupo tratado con el extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* fueron las que menos concentración de nitritos presentaron, quedándose muy por debajo de lo obtenido con el Madecassol y la Vaselina, lo que nos dice que a pesar de que no se observó una diferencia significativa en el diámetro final de las heridas, el extracto acuoso no necesariamente intervino con la formación de nuevos vasos sanguíneos a pesar de que en las heridas se llegó a observar abundante tejido de granulación. El óxido nítrico (NO) siendo un potente inductor de la angiogénesis regula la diferenciación de varios tipos de células (entre ellos los macrófagos) durante la fase inflamatoria y proliferativa en el proceso de cicatrización por lo que afecta la angiogénesis²⁴, por otra parte, sabemos que los macrófagos participan en el proceso de cicatrización, produciendo óxido nítrico como mediador citotóxico³⁹, lo que nos lleva a pensar que alguno de los metabolitos presentes en el extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* pudo llegar a intervenir en la proliferación celular, ocasionando la escases de macrófagos y por consiguiente la baja producción de nitritos.

9.3 Determinación de hidroxiprolina.

En esta determinación se obtuvo un resultado similar al observado en la determinación de nitritos, siendo Vaselina el valor más alto y el extracto de *Montanoa tomentosa* el que presentó menos concentración respecto a el control negativo (Vaselina) y el control positivo (Madecassol), esto se puede observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Comparación de concentraciones de Hidroxiprolina (mg/g de piel)

Grupo	Vaselina	Madecassol	Extracto <i>Montanoa tomentosa</i>
Hidroxiprolina (mg/g)	643.73±271.54	478.48±129.34	254.22±48.07

Prueba ANOVA de un factor con el 95% de confianza, los valores representan la media \pm desviación estándar. La diferencia entre medias es significativa ($p < 0.05$).

Nuevamente se obtuvo una diferencia significativa entre las medias de cada uno de los tratamientos, pues como se pudo observar, el grupo tratado con el extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* fue el que menos concentración de hidroxiprolina presentó, dejándonos ver que la Vaselina por sí sola actuó de mejor manera en el proceso de curación incluso en la síntesis de colágeno, dándonos una concentración elevada de hidroxiprolina la cual se ha descrito como factor de reparación de la epidermis, en particular como agente cicatrizante lo que nos señala una mejor calidad de cicatrización.⁴⁰

10. Conclusiones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto acuoso al 4% de *Montanoa tomentosa* no tiene efecto cicatrizante en las lesiones practicadas en los ratones CD1 et/et.

Las lesiones tratadas con el extracto acuoso al 4% de *Montanoa tomentosa* no tuvieron un proceso de cicatrización favorable, por lo que el extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* no promueve la producción de nitritos ni de hidroxiprolina.

11. Propuestas.

- Hacer estudios fitoquímicos más completos de *Montanoa tomentosa*.
- Realizar un estudio comparativo con la elaboración de una extracto etanólico de *Montanoa tomentosa* con el fin de comprobar si mediante el uso de otro solvente ésta presenta efecto cicatrizante.
- Evaluar el efecto cicatrizante del Madecassol, exclusivamente de la presentación en polvo debido a que fue la utilizada en éste trabajo.

12. Literatura consultada.

- 1.** Villaseñor, R., J.L. y F.J. Espinosa. Catálogo de malezas de México. UNAM. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, 1998.
- 2.** Hoogesteger C. Uso de plantas medicinales. Árbol Editorial S.A. de C.V.; 1994; 9-10.
- 3.** Lozoya X. Plantas, medicina y poder. Breve historia de la herbolaria mexicana. Editorial Pax México, 1997.
- 4.** Fonnegra, R. y Jiménez, S. Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. Segunda edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia, 2007.
- 5.** Esquivel-Gutiérrez, E., Noriega-Cisneros R., Bello-González M., Saavedra-Molina, A. y Salgado-Garciglia, R. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*. México 2012; 14; 45-52.
- 6.** Biodiversidad mexicana, conocimiento y manejo de biodiversidad [Internet]. México: CONABIO; 2015 [consultado 23 marzo 2015]. Disponible en: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/planta.html
- 7.** Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. 2005; 62. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*; 2005; 62; 12-15.
- 8.** Avalos, A; Perez-Urria, E. Metabolismo secundario de plantas. Universidad complutense. España; 2009; 119-145.
- 9.** Peña, A. Que es el metabolismo. México: SEP. 2001; 184.
- 10.** Kuklinski C. Farmacognosia, estudio de las plantas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega; España. 2003; 528-535.
- 11.** Ortega C. Guillen S. Ramos G. 2010; 16. Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia brassicaceae en el control de la roya del glodiolo. *Redayc.*; 2010; 16; 16-21.
- 12.** Osorio E. Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. 2009.
- 13.** <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/montanoa-tomentosa/fichas/ficha.html>
- 14.** <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=zoapate&id=7819>.
- 15.** Funk, V. A. The systematics of *Montanoa* (Asteraceae, Heliantheae). *Mem. New York Bot. Gard.* 1982; 1-133.

- 16.** Luchas FV, Muñoz MV, Fornes PB. La cicatrización de las heridas. *Anedidic*. 2008; 2(3); 8-15.
- 17.** Gawkrödger DJ. *Dermatology an illustrated colour text*. 3a ed. Sheffield: Churchill Livingstone. 2002.
- 18.** Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial médica panamericana. 5ª ed. Madrid. 2008.
- 19.** Garrido PA, Teijón JR, Blanco GD. *Fundamentos de bioquímica estructural*. 2ª ed; Tébar; Madrid. 2006.
- 20.** Luchas FV, Muñoz MV, Fornes PB. La cicatrización de las heridas. *Anedidic*. 2008; 2(3); 8-15.
- 21.** Dohert MG, Albanese CT, Anderson TJ. *Current Diagnosis & Treatment: Surgery* [Internet]. Mc Graw Hill. 13ª ed. United States of America. 2010. [Consultado 11 de Mayo del 2015]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=24
- 22.** Brunicardi CF, Andersen KD, Billiar RT, et al. *Schwarz. Principios de cirugía* [Internet]. Mc Graw Hill; 10ª ed. United States of America. 2015. [Consultado 11 de Mayo del 2015]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=24
- 23.** Salem Ch. *Heridas. Conceptos generales*. Artículo docente. 2000. Disponible en: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/cuadcir/v14n1/art15.pdf>
- 24.** Takayama Y. *Lactoferrin and its Role in Wound Healing*. 1ª ed. Ibaraki: Springer. 2012; 1-14.
- 25.** Martínez EJ. *Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer*. *Cancerología*. 2006; 1; 83-96.
- 26.** Somboonwong J, Kankaisre M, Tantisira M, et al. *Wound healing activities of different extracts of Centella asiática in incision and burn wound models: an experimental animal study*.
- 27.** Gethin G. *Role of topical antimicrobials in wound management*. *J Wound Care*. 2009; 4-8.
- 28.** Cabello RR. 2007. *Microbiología y parasitología humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Médica Panamericana; 3ª ed. México. 2007; 51.
- 29.** Silva NC, Fernandes A. *Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity*. *J Vatt*; 2010; 16(2); 402-413.
- 30.** Winyard PG, Willoughby AD. *Inflammation protocols*. 1ª ed. New Jersey: Human Press. 2003; 251.

- 31.** DiPietro AL, Burns LA. Wound healing: methods and protocols. 1^a ed. New Jersey: Human Press; 2003; 3.
- 32.** Shai A, Maibach HI. Wound healing and ulcers skin. 1^a ed. New York: Springer; 2005; 1-15.
- 33.** Sun J, Zhang X, Broderick M. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors*; et al. 2003; 3; 276-284.
- 34.** Titheradge AM. Nitric oxide protocols. 1^a ed. New Jersey: Humana Press; 1998; 84-85.
- 35.** Romo de Vivar A. Productos naturales de la flor mexicana. México: Limusa; 1985; 140.
- 36.** Modolin M. Biología de la cicatrización de los tejidos. En: Melega J M, Zanini S A, Psillakis J M (eds), Cirugía Plástica, Reparadora y Estética. Río de Janeiro, Medsi; 1992; 9-13.
- 37.** <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2013/02/Extracci%C3%B3n.pdf>
- 38.** González J., Rodríguez R. Heridas. Métodos de tratamiento. Trabajos de revisión; Hospital Clínicoquirúrgico Docente "Dr. Joaquín Castillo Duany"; MEDISAN; 2004.
- 39.** Zhang, M., W. Liu. "Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*)."*Food Chemistry*"; et al. 2009; 115; 826-831.
- 40.** Dupuy LO, Murillo R, Bonilla JA. Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *Viguiera sylvatica* y *Decachaeta thieleana* (Asteraceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW. *Rev Bio Trop.* 2008; 56(3); 1063-1073.
- 41.** Devlin TM. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínica. 4^a ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
- 42.** Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J Int Med Res*; 2009; 37(5); 1528-1542.
- 43.** Chung CK, Gosain KA, Gurtner CG, et al. *Grabb and Smith's Plastic Surgery.* 6^a ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007; 15-21.
- 44.** Hakkienen L, Larjana H, Koivisto L. Granulation tissue formation and remodeling. *Endod Topics*; 2012; 24; 94-129.
- 45.** Guyton CG, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 12^a ed. Barcelona: Elsevier; 2012.

46. Cabrera G., Luis. Herbario Mexicano, propiedades medicinales de las plantas más conocidas de México, su aplicación correcta y eficaz. Ed. Gómez Hermanos. México; 1990; 178.

47. Hidalgo O. Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos en ratón.; Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN. México D.F. 2010.