



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del efecto cicatrizante y antimicrobiano del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. en ratones CD1

TESIS

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE
“QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA”

PRESENTA:

Ana María García Peralta

DIRECTOR: DR. Rubén Marroquín Segura

ASESOR: DR. José Luis Alfredo Mora Guevara



Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIIT IG300315

México D.F., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por aceptarme como estudiante de la carrera de Q.F.B y formar parte de esta gran institución.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, lugar donde recibí formación académica y aprendí a ser mejor persona.

A mi director de tesis, el Dr. Rubén Marroquín Segura que me apoyó desde el principio para realizar este proyecto y guiarme durante el proceso.

A mi asesor de tesis, el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara, por su paciencia y disposición para que este proyecto se llevara a cabo.

A mi revisora de tesis y sinodal, la Dra. Juana Rosado Pérez, por su tiempo y por sus oportunas observaciones y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Mtra. Yolanda Flores Cabrera, por ser mi sinodal y mostrar disponibilidad para asesorarme y contribuir a mejorar este trabajo.

A mi sinodal, el Mtro. Valentín Islas Pérez por su accesibilidad y apoyo.

Dedicatoria

A mi mamá, Leticia Peralta Millán por todo su cariño y esfuerzos que siempre me motivan a seguir adelante, agradezco su paciencia, comprensión y la confianza que ha puesto en mí y que ahora me hacen una mejor persona.

A mi papá, Luis Miguel García Carrizosa por creer siempre en mí y mostrarme su apoyo durante todo este proceso a pesar de la distancia, por sus esfuerzos desde el inicio para que yo llegara hasta este punto.

A mi hermano, Luis Eduardo García Peralta por todos los momentos buenos y malos que hemos compartido, por su apoyo y paciencia.

A Montserrat Galindo Flores, por su amistad perdurable, a pesar del tiempo y la distancia, por enseñarme a ser una persona positiva y alegre.

A Gabriela Ramírez Zea, por brindarme su amistad, la cual deseo sea duradera, por confiar siempre en mí y mostrarme apoyo incondicional.

Al Dr. Rubén Marroquín, Dr. José Luis Alfredo Mora y a la Mtra. Yolanda Flores por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por brindarme su amistad y apoyo así como momentos divertidos.

“Si no conozco una cosa, la investigaré”

Louis Pasteur

Índice

	Pág.
1. Introducción.....	6
2. Marco teórico.....	7
2.1 <i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less.	8
2.2 La piel y sus características generales.....	9
2.2.1 El colágeno, un componente importante.....	11
2.3 Las heridas	12
2.3.1 Clasificación de las heridas.....	12
2.4 El proceso de cicatrización.....	13
2.4.1 Fase de coagulación y hemostasia.....	14
2.4.2 Fase de inflamación.....	15
2.4.3 Fase de proliferación.....	17
2.4.4 Fase de remodelación.....	21
2.4.5 Factores que afectan la cicatrización.....	23
2.5 Tratamiento de heridas.....	25
2.5.1 Antimicrobianos.....	28
2.5.2 Plantas con actividad antimicrobiana.....	31
2.6 Fundamento de las técnicas empleados.....	35
2.6.1 Modelo de escisión en roedores.....	35
2.6.2 Determinación de nitritos.....	36
2.6.3 Determinación de hidroxiprolina.....	37
2.6.4 Evaluación antimicrobiana de extractos.....	37
3. Planteamiento del problema.....	39
4. Objetivos.....	40

5. Hipótesis.....	41
6. Diseño experimental.....	42
7. Material.....	44
8. Metodología.....	46
8.1 Actividad cicatrizante.....	46
8.2 Determinación de nitritos.....	48
8.3 Determinación de hidroxiprolina.....	51
8.4 Evaluación antimicrobiana.....	52
8.5 Análisis estadístico.....	55
9. Resultados.....	56
10. Análisis de resultados.....	61
11. Conclusiones.....	65
12. Propuestas.....	66
13. Referencias.....	67

1. Introducción

A lo largo de la historia el hombre ha tenido que lidiar con las heridas, desde la época del hombre primitivo hasta el siglo XIX, las plantas y algunos productos de origen animal y mineral fueron los únicos recursos empleados para detener el sangrado, reducir la inflamación, disminuir el dolor, eliminar el tejido dañado, tratar infecciones, enmascarar malos olores y promover la cicatrización. En la actualidad muchos remedios tradicionales con diferentes propósitos se utilizan para la automedicación, sin embargo a medida que aumenta el uso de medicinas tradicionales o alternativas también aumenta el número de informes sobre reacciones adversas; muchas plantas y productos medicinales tradicionales son de venta libre y sus efectos únicamente se conocen de manera empírica, de acuerdo a la OMS, la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en medicina tradicional.

En el presente trabajo se evaluó el efecto cicatrizante de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., una planta utilizada comúnmente en el occidente del país para tratar problemas dermatológicos, para evaluar la actividad cicatrizante del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. se empleó el modelo de escisión en el dorso de ratones CD1 y se determinó si el extracto presenta actividad antibacteriana y antimicótica por medio del método de difusión en pozos.

2. Marco teórico

México es un país mega 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 realmente si poseen los efectos esperados o si tienen algún resultado tóxico o contraproducente ^{1,2}.

La Familia de plantas *Asteraceae* incluye gran cantidad de especies útiles (medicinales, agrícolas, industriales, etc.), alrededor de unas 40 especies tienen importancia directa en alimentación humana (hortalizas y “semillas” oleaginosas) e indirectamente por productos obtenidos por la industria. Otras especies silvestres tienen potencial nutricional, muchas son de interés tecnológico u ornamental, y centenares rinden metabolitos secundarios de uso farmacéutico o industrial. Muchas Asteráceas son oportunistas, y un gran número resultan malezas de cultivos y/o tóxicas para el ganado ³.

Verbesina crocata (Cav.) Less. es una planta que forma parte de la familia *Asteraceae* y se emplea para el tratamiento de heridas. Se ha comprobado que el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. tiene actividad hipoglucemiante ⁴ y efecto antiinflamatorio en ratones ⁵, sin embargo hasta ahora no había sido evaluada la actividad cicatrizante, siendo que la planta es frecuentemente empleada para tratar heridas, por lo que este trabajo se enfocó

en la evaluación del efecto cicatrizante del extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. en ratones CD1 y la relación de este efecto con la actividad antimicrobiana determinada mediante el método de difusión en pozo.

2.1 *Verbesina crocata* (Cav.) Less.

Planta originaria de México, conocida comúnmente como Capitaneja, habita en clima cálido, semicálido y templado, puede encontrarse desde los 600 hasta los 1000 metros de altura y se encuentra en los estados de Durango, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla.

Este arbusto puede crecer de 1.5 a 4 metros de altura, las hojas tienen forma de lanza y algunos picos de color oscuro o verde claro. Las flores en forma de cabezuelas son de color amarillo o naranja y de tallo erguido ⁶.

El uso medicinal de esta planta al que se hace mayor referencia es en contra afecciones ginecológicas (como infecciones vaginales y la retención de placenta en el postparto). También se usa para tratar heridas en la piel y otras



Figura 2.1 *Verbesina crocata* (cav.) Less.

afecciones dermatológicas como erupciones y salpullido, se emplea para tratar úlceras en la boca, lavar heridas y enjuagar el cabello para evitar su caída.

2.2 La piel y sus características generales

Antes de hablar sobre el proceso de cicatrización es fundamental conocer algunas generalidades sobre la piel para entender mejor las etapas este proceso y comprender su importancia. La piel 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 excreción 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: la epidermis, dermis y el tejido subcutáneo ^{7, 8}. En el siguiente cuadro se muestran las principales características de estas capas.

Cuadro 2.1 Capas que conforman la piel

Capa	Características
Epidermis	<p>Estructurada por un epitelio escamoso estratificado. Se compone principalmente por queratinocitos, también se encuentran melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.</p> <p>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.</p>
Dermis	<p>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.</p> <p>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.</p>
Tejido subcutáneo	<p>Está constituido por células grasas conocidas como adipocitos los cuales se disponen en lóbulos separados por tejido conectivo llamados septos o tabiques interlobulillares, en esta capa se encuentran estructuras como nervios, vasos sanguíneos, raíces de pelo, glándulas y corpúsculos de Pacini.</p>

Cuadro 2.1 En esta tabla se resumen las principales características de las capas que conforman la piel⁸⁻¹³.

2.2.1 Colágeno, un componente importante

El colágeno es una proteína fibrosa que se encuentra en todos los tejidos y órganos a los que proporciona forma y resistencia estructural, 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 ¹⁴.

Cada molécula de colágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas entrelazadas llamadas cadenas α que se enroscan entre sí para formar una triple hélice dextrógira. 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%), sin la hidroxilación de la prolina y la lisina no pueden formarse los enlaces de hidrógeno indispensables para alcanzar la estructura definitiva del colágeno ^{13, 15}.

Hasta ahora se han identificado hasta 27 tipos de colágeno teniendo en cuenta las combinaciones de cadena α que contienen, 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 $[\alpha 1(III)]_3$ se encuentra en los vasos sanguíneos, piel, cicatrices y pared intestinal y uterina ^{13, 14, 15}.

2.3 Las heridas y su clasificación

La frecuente exposición a las agresiones del entorno hace que la piel sea un órgano susceptible a sufrir lesiones que comprometen su integridad alterando sus funciones normales ¹⁶. Una herida es definida como el daño o ruptura de la estructura anatómica y la pérdida de sus funciones normales, esto puede ser desde una simple ruptura de la estructura epitelial de la piel o ser más profundo, extendiéndose hacia el tejido subcutáneo con daño en otras estructuras como tendones, músculos, vasos, nervios, órganos parenquimatosos e incluso huesos ¹⁷.

2.3.1 Clasificación de las heridas

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 ^{7, 18, 19}.

- **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 ¹⁹. 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; otros mecanismos importantes en el desarrollo de las heridas crónicas son la hipoxia en el tejido lesionado y errores de reepitelialización debidos a traumas o desecación que puede resultar en una herida con menor espesor y fuerza mecánica ¹⁸.

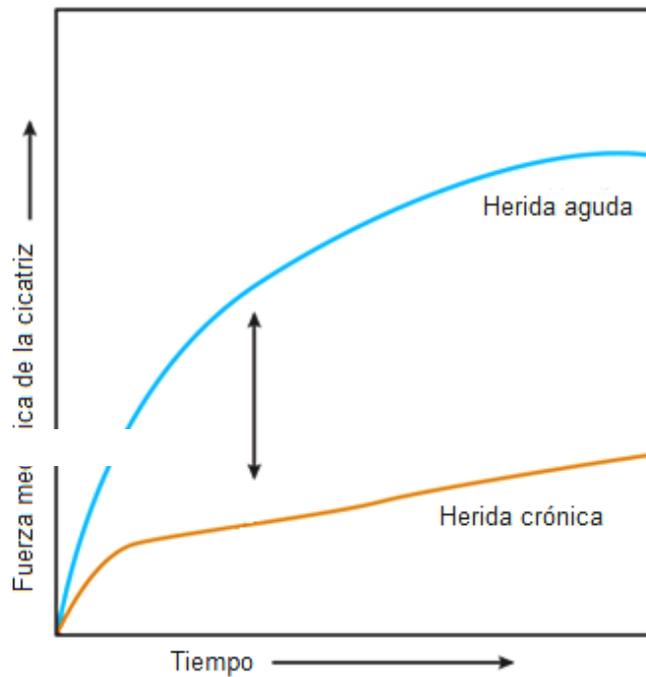


Figura 2.2 El proceso de cicatrización normal se caracteriza por un aumento constante y continuo de la fuerza e integridad mecánicas de la herida, mientras que las heridas crónicas adquieren poca fuerza mecánica ¹⁹.

2.4 El proceso de cicatrización

La cicatrización es un proceso complejo y dinámico que implica una serie de eventos coordinados cuya finalidad es recuperar la integridad del tejido dañado, permitiendo su regeneración y restaurando sus funciones. El proceso de cicatrización activado a partir del daño producido se describe por lo general

como una sucesión de eventos independientes que se divide en 4 fases: coagulación, inflamación, proliferación y maduración ^{12, 17}.

2.4.1 Fase de coagulación y hemostasia

Inicia inmediatamente después de la lesión con la finalidad de prevenir la exanguinación para proteger el sistema vascular y así mantener en funcionamiento los órganos vitales ^{17, 20}. Cuando se ha producido daño a un vaso sanguíneo, el estímulo de la pared del vaso hace que el músculo liso de la pared se contraiga, lo que reduce el flujo sanguíneo; las plaquetas se activan para formar un tapón plaquetario y junto con los componentes del tejido lesionado, incluyendo el colágeno fibrilar y el factor tisular actúan para activar la cascada de coagulación, lo que conduce a la agregación de plaquetas y la formación de un coágulo ^{17, 21, 22}.

El coágulo de sangre y las plaquetas atrapadas dentro de él, no solo son importantes para la hemostasia, también proporcionan una matriz provisional para la migración celular en fases posteriores ^{17, 20}. Durante este proceso las plaquetas se degranulan, liberando factores de crecimiento como el PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF- β (Factor de crecimiento transformante β), EGF (Factor de crecimiento epidérmico o TGF- α) y el IGF (Factor de crecimiento similar a la insulina), estas sustancias actúan como promotores en la cicatrización activando y atrayendo neutrófilos y más adelante macrófagos, células endoteliales y fibroblastos ¹⁷.

2.4.2 Fase de inflamación

El objetivo de esta fase es establecer una barrera inmunitaria contra microorganismos invasores y remover células muertas o afectadas, presenta una duración de hasta 6 días. Se divide en dos fases, una fase inflamatoria temprana y una fase inflamatoria tardía ^{16, 22}.

- **Fase inflamatoria temprana**

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

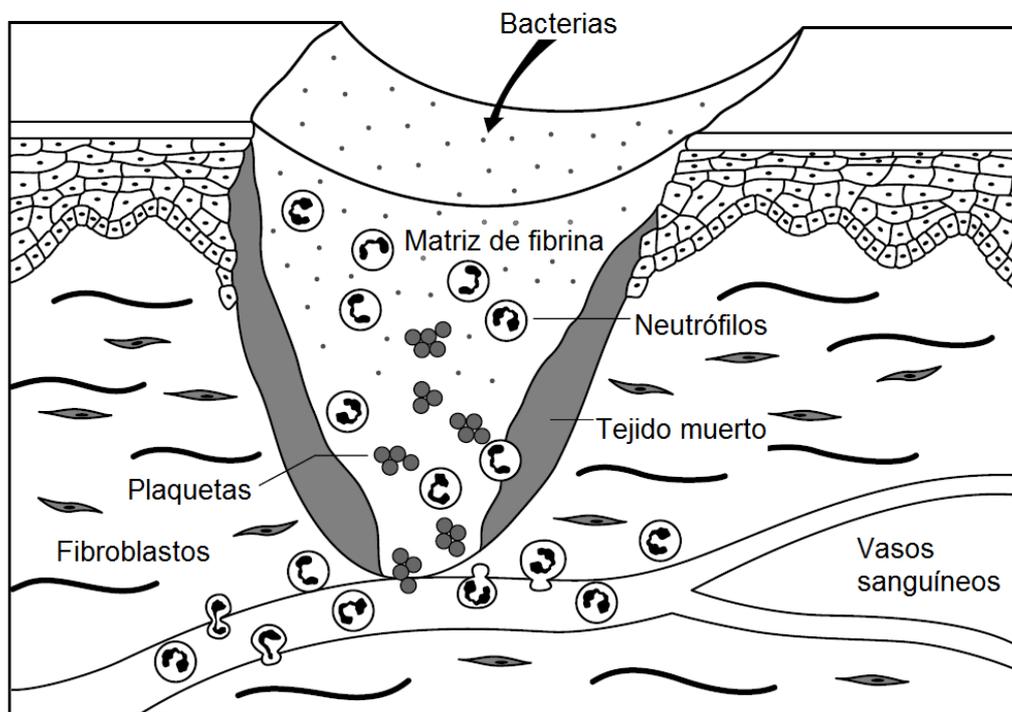
Los neutrófilos son atraídos al sitio de la herida de 24-36 horas después de la lesión por agentes quimioatrayentes incluyendo TGF- β , componentes del complemento como C3a y C5a, factores de crecimiento liberados por las plaquetas y productos de degradación de bacterias como lipopolisacáridos. Los neutrófilos se encargan de fagocitar bacterias, partículas extrañas y tejido dañado ^{17, 22, 24}.

- **Fase inflamatoria tardía**

Inicia después de 48-72 horas después de la lesión cuando los macrófagos aparecen y continúan el proceso de fagocitosis, tienen una vida útil más larga que los neutrófilos y son atraídos principalmente por la expresión de MCP-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos 1), así como factores de coagulación,

componentes del complemento, citocinas tales como PDGF y TGF- β , así como la elastina y productos de degradación del colágeno.

Los macrófagos son esenciales en el proceso de cicatrización, ya que actúan como células reguladoras y proporcionan un importante reservorio de factores de crecimiento necesarios para la formación de la matriz extracelular y la angiogénesis, particularmente TGF- β y otros mediadores como TGF- α (Factor de crecimiento transformante α), 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 IL-1 (Interleucina-1), componentes del complemento e IgG (Inmunoglobulina G) ^{17, 22}.



Fase Inflamatoria

Figura 2.3 Fase inflamatoria en el proceso de cicatrización, su objetivo es remover tejido muerto y prevenir la infección por microorganismos patógenos ²².

Para que la reparación de la herida sea exitosa se requiere la resolución de la respuesta inflamatoria, para esto los neutrófilos deben ser eliminados del sitio por apoptosis o ser fagocitados por macrófagos, un proceso continuo de inflamación en la herida puede causar una cascada de respuestas tisulares que retrasan el proceso de curación ^{17, 25}.

2.4.3 Fase de 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 de la cicatriz ^{17, 24}.

- **Angiogénesis**

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los 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 ^{25, 26}.

El proceso de angiogénesis inicia con la migración de células endoteliales al sitio de la lesión y su proliferación, eventualmente los grupos celulares se forman y organizan en estructuras tubulares, los capilares recién formados se van ramificando e invadiendo la matriz de fibrina en el sitio de la herida, formando así una compleja red vascular, 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 ²⁴⁻²⁶.

La angiogénesis es un proceso controlado por citocinas y factores de crecimiento como PDGF, FGF, VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) ²⁵.

- **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 ¹⁷. 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 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, la cual provee una plataforma para los queratinocitos. 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 vasos sanguíneos pequeños ^{24, 25}.

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 como ya se ha mencionado, su síntesis requiere la

hidroxilación de residuos de prolina y de lisina, algunos cofactores como el oxígeno, el hierro y la vitamina C ^{17, 24}.

- **Reepitelialización**

La reepitelialización se logra mediante la migración, la proliferación y diferenciación de los queratinocitos de la epidermis en el área de la herida hasta que un nuevo epitelio cubre el área dañada ^{24, 25}. Comienza unas pocas horas después de producirse una lesión cutánea, cuando alrededor del área de la lesión se observan queratinocitos que presentan proyecciones como pseudópodos que comienzan a desplazarse hacia la matriz de la herida, 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 y está regulada por la tensión de oxígeno en el tejido y la humedad del medio ambiente.

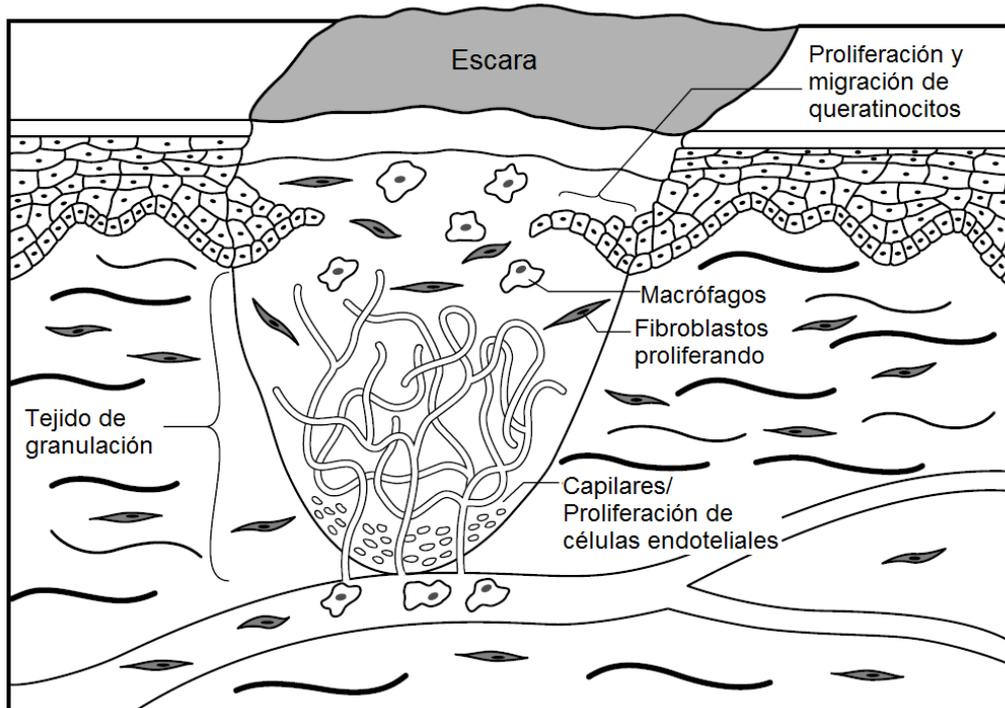
Horas después de la migración, los queratinocitos comienzan a proliferar formando y produciendo nuevas células epidérmicas, lo que permite que el proceso de reepitelialización sea completado, esto está mediado por factores de crecimiento liberados localmente incluyendo TNF- α , EGF (Factor de crecimiento epidérmico) y KGF-1 (Factor de crecimiento de queratinocitos-1) ^{24, 25}.

- **Contracción**

La contracción es un suceso muy importante que contribuye al cierre de la herida, comienza alrededor del día 7 después de la lesión y ocurre de forma simultánea a la fase de remodelación. La contracción reduce el tamaño de la herida y por tanto se acorta el período de cicatrización^{24, 25}, 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 tejido²⁷.

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 del 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. La diferenciación de los miofibroblastos es un proceso gradual en donde ciertos factores de crecimiento como TGF- β 1 regulan la conversión de fibroblastos en miofibroblastos^{24, 27}.

Un hecho importante que se tomó 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%²⁷.



Fase Proliferativa

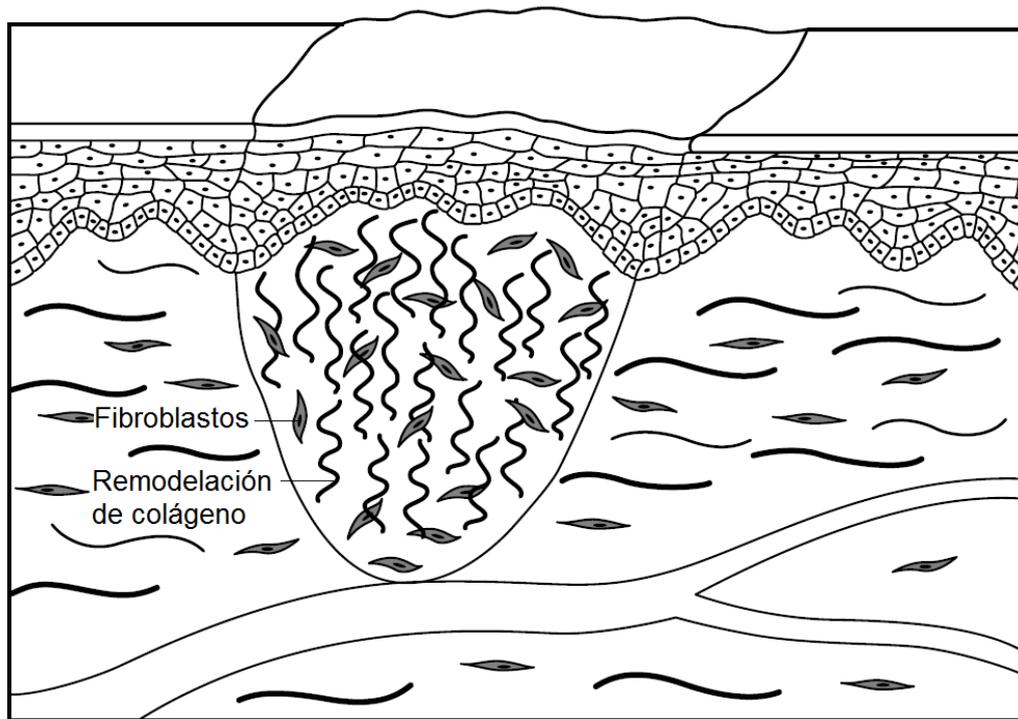
Figura 2.4 Fase proliferativa del proceso de cicatrización, el tejido de granulación llena la herida y los queratinocitos migran para restaurar la continuidad epitelial ²².

2.4.4 Fase de remodelación

Representa la última etapa del proceso de cicatrización, esta fase es la más larga del proceso de cicatrización y en los seres humanos puede durar desde 21 días hasta 1 año o 2 en condiciones normales ^{22, 24}.

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 ²⁴, esta lenta degradación del colágeno tipo III está mediada por colagenasas secretadas por macrófagos, fibroblastos y células endoteliales que se encuentran en la matriz ²². El colágeno sintetizado inicialmente es altamente desorganizado,

pero con el tiempo se ordena y adquiere una organización en forma de red, el proceso es regulado por una serie de factores, como PDGF, TGF- β y FGF siendo este último el más importante ²¹. La creciente cantidad de colágeno estable y la alineación de las fibras aumentan gradualmente la fuerza de la cicatriz ²⁶.



Fase de Remodelación

Figura 2.5 Fase de remodelación, es la fase más larga en el proceso de cicatrización ya que puede durar desde 21 días hasta 1 año ²².

Las fibras de colágeno tipo I pueden recuperar aproximadamente el 80% de la resistencia original de la piel, la fuerza adquirida del tejido al final dependerá de su localización y de la duración del proceso, pero siempre tendrá un mayor riesgo de romperse en comparación con el tejido intacto ^{17, 24}.

2.4.5 Factores que afectan la cicatrización

Existen múltiples factores que pueden afectar el proceso de cicatrización, en términos generales estos factores se dividen en dos categorías: factores locales y factores sistémicos.

Los factores locales son los que actúan directamente sobre las características de la propia herida, mientras que los factores sistémicos son los estados de salud o enfermedad de un individuo y que afectan la cicatrización ²⁸. En los siguientes cuadros se describen algunos de los factores que afectan el proceso de cicatrización.

Cuadro 2.2 Factores locales que afectan el proceso de cicatrización

Factores locales	
Oxigenación	El oxígeno es esencial en el proceso de cicatrización, los principales factores que afectan el suministro de oxígeno local incluyen la disminución de flujo sanguíneo ya sea por razones sistémicas (insuficiencia cardíaca) o debido a causas locales (insuficiencia arterial, vasoconstricción local o tensión excesiva en los tejidos).
Infección	Una infección local es donde los microorganismos se replican y comienza la respuesta tisular local y una infección invasiva es definida como la presencia de organismos replicándose dentro de la cicatriz con una lesión subsecuente. En caso de que los microorganismos no sean eliminados la fase de inflamación se prolonga, las bacterias y endotoxinas conducen al aumento sostenido de citocinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α) que alargan la fase y la herida puede entrar en un estado crónico.

Temperatura	La temperatura alrededor de la herida debe ser de 37 °C pero si disminuye provoca una vasoconstricción, dificultando el aporte de leucocitos a la herida y una alteración en el transporte de oxígeno y nutrientes. El contacto de la herida con el ambiente hace que disminuya su temperatura, tardando varias horas en recuperar su actividad reparadora y cicatricial.
--------------------	---

Desecación	Un ambiente húmedo permite que las heridas sanen más rápido que en un ambiente seco donde las células normalmente se deshidratan y mueren provocando la formación de una costra que actúa como barrera física para los queratinocitos dificultando su migración y reduciendo la proliferación celular y división, lo que retrasa el proceso de cicatrización.
-------------------	---

Cuadro 2.2 Describe brevemente algunas características de los factores locales que afectan el proceso de cicatrización ^{7, 19, 28, 29}.

Cuadro 2.3 Factores sistémicos que afectan el proceso de cicatrización

Factores sistémicos	
Edad	En el envejecimiento se producen cambios fisiológicos intrínsecos que dan lugar a una cicatrización retardada o dañada. La síntesis de colágeno no parece verse afectada con la edad, sin embargo la acumulación de proteína no colágena en los sitios de la lesión disminuye con el envejecimiento, lo que puede afectar las propiedades mecánicas de la cicatriz.
Medicación	<p>Glucocorticoides: en grandes dosis reduce la síntesis de colágeno e inhiben la fase inflamatoria.</p> <p>Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE): Inhiben procesos inflamatorios.</p> <p>Quimioterapia: afectan el proceso de cicatrización inhibiendo la proliferación celular temprana y la síntesis de proteínas y ADN.</p>

Enfermedades	<p>Diabetes: Contribuye a la infección de la herida y cuando no está controlada disminuye el proceso de angiogénesis y la síntesis de colágeno.</p> <p>Arteriosclerosis: Los depósitos de lípidos y colesterol en las paredes de los vasos producen una disminución del aporte sanguíneo.</p> <p>Hipertiroidismo: Disminuye la síntesis de colágeno.</p> <p>Hipotiroidismo: Disminuye la degradación de tejido y la síntesis de colágeno.</p> <p>Obesidad: Las personas obesas enfrentan con frecuencia complicaciones en la cicatrización, incluyendo infecciones en heridas de la piel, hematomas y formación de seromas, úlceras por presión y úlceras venosas.</p>
Nutrición	<p>Para una mejor cicatrización se debe aumentar el consumo de alimentos ricos en sales minerales como el Zn, Ca, Cu y el Fe que son esenciales para la síntesis de ADN y la división celular. La vitamina C se requiere para la conversión de prolina y lisina a hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente; la vitamina A aumenta la respuesta inflamatoria en la cicatrización.</p>

Cuadro 2.3 Muestra algunas características generales de los factores sistémicos que afectan el proceso de cicatrización ^{7, 9, 19, 28}.

2.5 Tratamiento de heridas

El cuidado inadecuado de una herida puede retrasar su curación haciendo que el área se infecte y resulte en una herida crónica, la infección es una de las complicaciones más frecuentes en heridas que no cicatrizan y puede poner en riesgo el avance del proceso de curación, lo que prolonga el tiempo de tratamiento y aumenta el uso de recursos. En el peor de los casos, el no tratar a la infección puede resultar en una amputación o una afección potencialmente mortal ^{30,32}.

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, la pérdida de integridad en la piel permite el ingreso de microorganismos a la lesión y la exposición del tejido subcutáneo proporciona un ambiente húmedo, cálido y rico en nutrientes que propicia la colonización y proliferación de microorganismos, en consecuencia el uso de agentes antimicrobianos es importante en el tratamiento de heridas ^{31,32}.

Para reducir el riesgo de infección en pequeños cortes y quemaduras normalmente se utilizan ungüentos antimicrobianos, sin embargo muchos de los antimicrobianos tópicos tienen algunos efectos secundarios y son sólo parcialmente eficaces, esto se muestra en el **Cuadro 2.4** ³⁰.

Cuadro 2.4 Antimicrobianos utilizados para tratar heridas

Antimicrobiano	Mecanismo de acción	Bacterias resistentes	Citotoxicidad local	Efectos tóxicos sistémicos	Alergenicidad
Bacitracina	Interfiere en la síntesis de la pared celular	<i>Staphylococcus aureus</i> y estreptococos β hemolíticos	-	+	+++
Mafenida	Inhibe la síntesis de ácido fólico	NA	+	++	++
Polimixina E	Rompe la membrana celular mediante la unión a fosfolípidos	<i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Klebsiella</i> spp.	+	++	+
Neomicina	Inhibe la síntesis de proteínas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	++	++	+++

Sulfadiazina de plata	Evita la síntesis de ácido fólico	Bacilos Gram negativos	++	+	+++
Gentamicina	Inhibe la síntesis de proteína uniéndose a la subunidad ribosomal 30s	Bacilos Gram negativos, <i>Staphylococcus aureus</i> y enterococos	+	+++	+
Mupirocina	Inhibe la síntesis de proteínas y de ARN	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+
Amfotericina	Destruye la membrana celular	<i>Candida albicans</i>	++	+++	+

Cuadro 2.4 Muestra algunas características de los antimicrobianos usualmente empleados para tratar lesiones ³².

(-) No detectado (+) Efecto débil (++) Efecto significativo (+++) Efecto severo

La diversidad de bacterias en heridas con problemas de cicatrización es alta, todos los estudios realizados sobre la flora microbiana en heridas crónicas concuerdan en la presencia casi universal de *Staphylococcus aureus*, también se ha encontrado que *Enterococcus fecalis* se presenta en aproximadamente el 70% de las heridas crónicas mientras que *Pseudomona aeruginosa* se encuentra aproximadamente en el 50%, en cuanto a micosis encontradas en heridas crónicas, se ha hallado que *Candida albicans* es la más común ³³. Por otro lado en heridas de pie diabético se ha reportado en el 59% de los cultivos el crecimiento de cocos Gram-positivos aerobios (en su mayoría *S. aureus* que corresponde al 24%) así como aerobios Gram-negativos en el 39%, siendo la mayoría enterobacterias como *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* ³².

2.5.1 Antimicrobianos

El uso de los agentes antimicrobianos en la terapia de enfermedades infecciosas ha constituido un acontecimiento sin precedentes, la curación y control de las infecciones permitió modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad ³⁴.

Un agente antimicrobiano es cualquier sustancia natural o sintética con la habilidad de inhibir o destruir a un microorganismo, lo que significa que la definición incluye tanto antibióticos como antisépticos y según el tipo de microorganismo al que se dirigen se conocen como antibacterianos o antimicóticos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano ^{32, 34, 35}.

- **Antibióticos**

Un antibiótico es una sustancia química de origen natural o sintético que tiene la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo ya sea bacteria, hongo o protozooario. Son nombrados bacteriostáticos si tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos o bactericidas si los destruyen. Normalmente los antibióticos son clasificados de acuerdo al mecanismo por el cual actúan sobre los microorganismos y estos se muestran en el **Cuadro 2.5** ³².

Cuadro 2.5 Mecanismo de acción de algunos antibióticos

Mecanismo de acción	Antimicrobianos
Inhibición de síntesis de la pared celular	
1. <i>Actividad antibacterial</i> (a) Inhibición de transpeptidación de peptidoglicanos	Penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, vancomicina
(b) Inhibición de otros pasos en la síntesis de peptidoglicanos	Cicloserina, bacitracina
2. <i>Actividad antifúngica</i> Inhibición de síntesis de β -glucano	Caspofungina
Inhibición de síntesis de proteínas	
Actúa sobre las subunidades ribosomales 50S	Cloranfenicol, eritromicina, clindamicina,
Actúa sobre las subunidades ribosomales 30S	Tetraciclinas y aminoglucósidos
Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos	
Inhibición de síntesis de nucleótidos	Sulfonamidas, trimetoprima
Inhibición de síntesis de ADN	Quinolonas (ejemplo, ciprofloxacino)
Inhibición de síntesis de ARNm	Rifampicina
Alteración de función de la membrana celular	
1. <i>Actividad antibacterial</i>	Polimixina, daptomicina
2. <i>Actividad antifúngica</i>	Amfotericina B, nistatinas, terbinafina, azoles (ejemplo, itraconazol)
Otros mecanismos de acción	
1. <i>Actividad antibacterial</i>	Isoniazida, metronidazol, pirazinamida
2. <i>Actividad antifúngica</i>	Griseofulvina, pentamidine

Cuadro 2.5 Muestra los mecanismos de acción por los que actúan algunos antibióticos importantes ³⁶.

- **Antiséptico**

Un antiséptico es un agente químico que se aplica sobre superficies del cuerpo o en tejidos expuestos y que inhibe el crecimiento y desarrollo de microorganismos residentes en piel, mucosas, quemaduras y heridas abiertas anulando su potencial infeccioso ³⁶.

Cuadro 2.6 Antisépticos empleados para tratar heridas

Antisépticos empleados para tratar heridas		
Antisépticos	Concentración	Características
Alcohol (Etílico, isopropílico)	70-90%	Tienen una actividad excelente frente a todos los grupos de microorganismos a excepción de esporas y no son tóxicos aunque tienden a reseca la piel por que eliminan lípidos. Se emplean para la desinfección de la piel previa a la inyección, punción venosa o intervenciones quirúrgicas
Yodóforos	1-2% de yodo	Eficaz sobre bacterias, hongos, virus, protozoos, quistes y esporas, y reduce de manera significativa las infecciones de las heridas quirúrgicas. Se debe tener precaución ya que puede producir irritación de piel y membranas mucosas, y tener efectos sistémicos.
Clorheximida	0,50%	Tienen una actividad antimicrobiana extensa, aunque destruye microorganismos a una velocidad mucho menor que el alcohol. La materia orgánica y los niveles de pH elevados reducen su eficacia. Se emplea en la desinfección de la piel y lavado de manos preoperatorios

Cuadro 2.6 Muestra algunas sustancias empleadas como antisépticos usados tratar heridas y las concentraciones en solución que muestran mayor efectividad ^{37, 38}.

La selección de un agente antimicrobiano debe ser influenciada principalmente por su toxicidad selectiva, es decir que debe inhibir selectivamente el crecimiento de los microorganismos sin dañar al hospedero, hay sitios en los microorganismos que son suficientemente diferentes de las células humanas y que sirven como base para la acción de antimicrobianos clínicamente eficaces³⁹.

2.5.2 Plantas con actividad antimicrobiana

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema que se ha ido complicando, sobre todo en las últimas décadas, porque a medida que se han ido sintetizando nuevos antimicrobianos, han ido surgiendo cepas resistentes a los mismos, la resistencia se traduce en ineficacia de los tratamientos, generando un importante impacto en la salud. En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacología, a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, las plantas son una valiosa fuente de sustancias activas con propiedades antibacterianas^{34, 40}.

En la actualidad, hay muchas plantas cuya actividad antimicrobiana ha sido confirmada, tal es el caso de *Mentha piperita* (Menta), *Rosmarinus officinalis* (Romero), *Lophophora williamsi* (Peyote), *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) entre muchas otras plantas de uso común, algunas de estas se muestran en el **Cuadro 2.7**⁴¹.

Cuadro 2.7 Plantas con actividad antimicrobiana

Planta	Compuesto	Clase	Actividad
Té verde <i>Camellia sinensis</i>	Catequina	Flavonoides	General <i>Shigella sp, Vibrio sp,</i> <i>Streptococcus mutans,</i> Virus
Oliva <i>Olea europaea</i>	Hexanal	Aldehido	General
Estragón <i>Artemisia dracunculus</i>	Ácido cafeico, taninos	Terpenoides, polifenoles	Virus, helmintos
Cebolla <i>Allium cepa</i>	Alicina	Sulfóxido	Bacterias, <i>Candida sp</i>
Menta <i>Mentha piperita</i>	Mentol	Terpenoide	General
Romero <i>Rosmarinus officinali</i>	Aceite esencial	Terpenoide	General
Peyote <i>Lophophora williamsii</i>	Mescalina	Alcaloide	General
Mazanilla <i>Matricaria chamomilla</i>	Ácido anthemico	Ácido fenólico	<i>Mycobacterium tuberculosis,</i> <i>Sallmonella typhimurium,</i> <i>Staphylococcus aureus,</i> helmintos, virus
Eucalipto <i>Eucalyptus globulus</i>	Taninos	Polifenoles	Virus, bacterias

Cuadro 2.7 Algunos ejemplos de plantas con actividad antimicrobiana, los principales compuestos responsables de su actividad y microorganismos a los que inhibe ⁴².

Los compuestos activos producidos durante el metabolismo vegetal secundario son generalmente responsables de las propiedades biológicas de algunas especies de plantas utilizadas en todo el mundo para varios propósitos,

incluyendo el tratamiento de las enfermedades infecciosas ⁴⁰⁻⁴². Se ha descubierto que los aceites esenciales de algunas especias y plantas medicinales poseen actividad antimicrobiana, los aceites esenciales son metabolitos secundarios producidos dentro los tejidos de diversas plantas, son mezclas complejas de compuestos volátiles tales como terpenos (en especial monoterpenos y sesquiterpenos), compuestos fenólicos y alcoholes, varios de estos compuestos aparasen en el **Cuadro 2.8**, donde se muestran las principales clases de compuestos con actividad antimicrobiana que se pueden encontrar en plantas ⁴³.

Cuadro 2.8 Principales clases de compuestos antimicrobianos encontrados en plantas

Clase	Ejemplo
Fenoles	
Fenoles simples	Catecol, epicatequina
Ácidos fenólicos	ácido cinámico, ácido cafeico
Quinonas	Hipericina
Flavonoides	Crisina
Flavonoles	Totarol
Flavona	Abisinona
Taninos	Elagitaninos
Cumarina	Warfarina
Terpenoides y aceites esenciales	
	Capsaicina, mentol
Alcaloides	
	Berberina y piperina
Lectinas y polipeptidos	
	Lectina manosa-específica Fabatina
Poliacetilenos	

Cuadro 2.8 Principales clases y subclases de compuestos con actividad antimicrobiana que se encuentran en plantas y algunos ejemplos ⁴¹.

Los mecanismos de acción de los compuestos obtenidos de plantas se muestran en la **Figura 2.7**. No todos los mecanismos de acción trabajan en objetivos específicos y algunos sitios pueden ser afectados por otros mecanismos ³⁹.

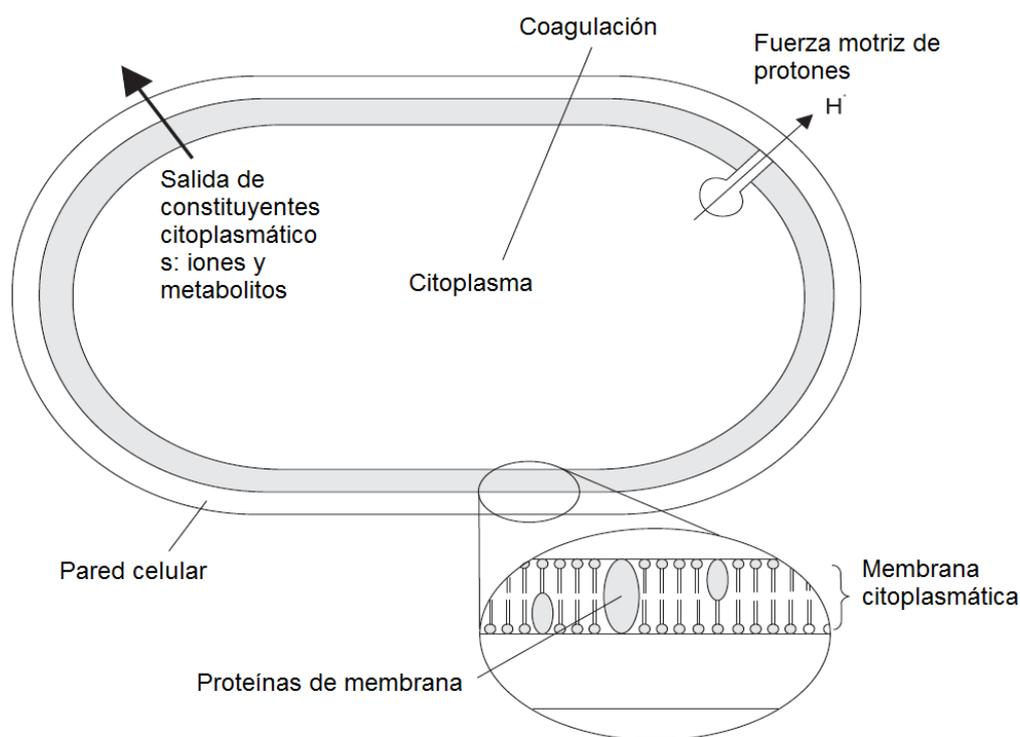


Figura 2.7 Sitios en una bacteria donde los compuestos obtenidos de plantas son activos.

En el caso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. (Capitaneja), ya se ha mencionado que pertenece a la familia *Asteraceae*, los metabolitos secundarios aislados de esta familia son muy variados, algunos flavonoides y aceites volátiles (con di- y triterpenos) son comunes en casi todas las especies. En general este grupo está caracterizado por la presencia de ácidos iso- y clorogénico, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos y diversos derivados acetilénicos mientras que carecen de alcaloides (salvo los

de núcleo pirrolizidínico) de iridoides, aminoácidos no proteícos y taninos verdaderos³.

Para comprobar si *Verbesina crocata* (Cav.) Less. (Capitaneja) tenía efecto antimicrobiano, se empleó como control positivo en el modelo de escisión de ratones un extracto de *Centella asiática*, planta cuyo efecto cicatrizante ha sido comprobado en heridas por quemadura e incisiones³⁰, el extracto se empleó en su forma farmacéutica conocida como Madecassol.

2.6 Fundamento de las técnicas empleadas

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, reepitelialización 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, inmunoblot y análisis histológicos^{44, 45}.

2.6.2 Determinación de nitritos

El óxido nítrico (NO) es conocido como un potente inductor de la angiogénesis; es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, a través de la enzima óxido nítrico 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 NO puede ser beneficioso para el proceso de curación normal, sin embargo se requiere mayor investigación para identificar los mecanismos exactos por los que interviene en el proceso de cicatrización ^{25, 26}.

La medición del óxido nítrico en sistemas biológicos necesita algunas consideraciones ya que es rápidamente oxidado a nitritos y/o nitratos por el oxígeno ⁴⁶, estos metabolitos son estables y pueden cuantificarse para determinar de manera indirecta la concentración de NO 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 ⁴⁷.

2.6.3 Determinación de Hidroxiprolina

La determinación de hidroxiprolina por medio de espectrofotometría es un método que permite determinar indirectamente 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 en un anillo de pirrol que después puede ser determinado mediante el reactivo de Ehrlich (4-(N,N-dimetilamino) benzaldehído), el resultado es un compuesto con una intensa coloración naranja que se determina por medio de un espectrofotómetro.

2.6.4 Evaluación antimicrobiana de extractos

Como se mencionó anteriormente, los componentes microbianos alteran el proceso de cicatrización de una herida mediante la inducción de una respuesta inflamatoria persistente, para que la reparación de la herida sea exitosa se requiere la resolución de la respuesta inflamatoria ²⁶, por lo que un compuesto o extracto con actividad antimicrobiana puede mejorar el proceso de cicatrización.

La actividad antimicrobiana de un extracto se determinó por medio del método de difusión en pozo, para esto se emplearon tres cepas: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* para determinar la actividad antibacterial en un microorganismo Gram positivo y uno Gram negativo, y *Candida albicans* para determinar actividad antifúngica.

El método de difusión en pozos permite observar los halos de inhibición producidos por el efecto de un extracto en diferentes concentraciones frente a un microorganismo sembrado masivamente y en concentración conocida, lo que permite calcular el porcentaje de inhibición:

$$\% \text{Inhibición: } \frac{\text{Media diámetro halo de inhibición}}{\text{Diámetro halo de inhibición control positivo}}$$

Las cepas se emplean en una suspensión de 1×10^5 UFC/mL, preparada a partir de una suspensión de concentración equivalente al tubo 1 de la escala de Mc Farland ⁴⁸.

3. Planteamiento del problema

Las heridas han afectado a los seres humanos a lo largo de la historia, los primeros tratamientos se basaron en el uso de plantas y minerales cuyas propiedades eran conocidas de forma empírica. En la actualidad, el tratamiento de las heridas es costoso, por lo que la gente recurre a remedios tradicionales en su mayoría herbolarios y que están al alcance de todos, tal el caso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. o comúnmente llamada Capitaneja que se emplea para el tratamiento de heridas, sin embargo muchos de los efectos atribuidos a estas plantas incluyendo la Capitaneja no han sido evaluados científicamente.

Por otra parte las heridas no atendidas son un problema de salud y necesitan ser tratadas para evitar complicaciones, la infección es una de las complicaciones más frecuentes que puede retrasar el proceso de cicatrización, el uso inapropiado de antimicrobianos, en especial antibióticos puede producir la resistencia de ciertas cepas, por lo que los extractos de algunas plantas con actividad antimicrobiana pueden ser una buena alternativa para el tratamiento de heridas.

Actualmente en nuestro país, son escasos los estudios respecto a plantas empleadas en herbolaria como es el caso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., por lo que nos planteamos las siguientes preguntas: ¿El extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less presenta efecto cicatrizante en ratones CD1? ¿El extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. tiene actividad antimicrobiana?

4. Objetivos

Objetivos generales:

- Evaluar el efecto cicatrizante del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. en ratones CD1
- Determinar si el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. posee efecto antimicrobiano

Objetivos particulares:

- Evaluar la actividad cicatrizante de un ungüento al 4% elaborado con el extracto acuoso de *Verbesina Crocata* (Cav.) Less. En ratones CD1.
- Estimar la formación de colágeno por medio de la determinación de hidroxiprolina en las muestras de tejido obtenidas de los ratones tratados con el extracto de *de Verbesina Crocata* (Cav.) Less.
- Estimar el proceso de angiogénesis por medio de la determinación de nitritos a partir del suero obtenido de los ratones tratados con el extracto de *de Verbesina Crocata* (Cav.) Less.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. en concentraciones de 125 µg/µL, 250 µg/µL y 500 µg/µL en *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -) y *Candida albicans*.

5. Hipótesis

Considerando el uso empírico del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. así como las evidencias que demuestran que tiene un efecto en la fase aguda de la inflamación y la presencia de terpenoides y ácidos fenólicos en las plantas de la familia *Asteracea*, suponemos que el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. tendrá efecto antimicrobiano y cicatrizante sobre escisiones realizadas en ratones CD1.

6. Diseño experimental

▶ **Tipo de estudio:** Experimental

▶ **Población de estudio:** 18 ratones CD1

▶ **Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:**

- **Inclusión:** Ratones CD1 machos de entre 35 y 40 gramos de peso, sanos.
- **Exclusión:** Hembras, ratones enfermos, ratones pequeños y bajos de peso.
- **Eliminación:** Ratones que mueran durante la experimentación, se infecte o desarrollen tumores.

▶ **Variables:**

Variables independientes

● **Tratamiento:**

- 1) Madecassol (Control positivo)
- 2) Vaselina (Control negativo)
- 3) Ungüento al 4% elaborado con el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (cav.) Less.

● **Concentración del extracto:**

- 1) 125 µg/µL
- 2) 250 µg/µL
- 3) 500 µg/µL

- **Cepa:**

- 1) *Staphylococcus aureus* (microorganismo Gram positivo)
- 2) *Escherichia coli* (microorganismos Gram negativo)
- 3) *Candida albicans* (Levadura)

Variables dependientes

- **Actividad cicatrizante** (Determinada a través del modelo de escisión en roedores):

- 1) Diámetro promedio de las lesiones
- 2) Valoración de colágeno (por medio de la determinación de Hidroxiprolina)
- 3) Estimación de angiogénesis (por medio de la determinación de nitritos).

- **Actividad antimicrobiana** (Por medio del método de difusión en pozos)

- 1) Halos de inhibición (mm)

7. Material

Material	Equipo e instrumentos
Sacabocados 1cm de diámetro	Sonicador Vibra cell (Sonics)
Martillo	Centrifuga Vanguard V6500 (Hamilton Bell)
Cámara de éter	Rocker platform (Bellco Glass Inc.)
Jaulas	Campana de extracción
Separadores de madera	Incubadora (Shel Lab)
Regla	Espectrofotómetro 6305 Uv/Vis (Jenway)
Tijeras de disección	Espectrofotómetro Spectronic 20 (Thermo scientific)
Bisturí	Vortex -2 Gene
Sacabocados (Gimelmex 5/16´)	Balanza analítica (Adam)
Pinzas	Bomba de vacio (Feli Welch)
Tubos Eppendorf	Microondas (Sharp Carousel)
Pipetas automáticas de 100 y 1000 µL	
Puntillas de 100 y 1000 µL	
Vasos de precipitado	
Matraces aforados de 10 y 100 mL (Pirex)	
Cajas Petri de plástico y vidrio (Pirex)	
Tubos de ensayo de 13x100 con tapa-rosca (Pirex y Kimax)	
Gradillas	
Celdas de vidrio	
Pipetas graduadas de 1,2,5,10 y 20 ml (Pirex y Kimax)	
Baño maría	
Mechero	
Termómetro de -10 a a15 °C	
Papel parafilm	
Temporizador	
Espátula	
Papel glacim	

Reactivos	Sustancias	Material biológico
Cadmio granular (Merck)	Vaselina (Vaseline)	18 Ratones CD2
Ác. clorhídrico (J.T.Baker)	Madecassol (SANOFI)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Cloruro de amonio (J.A.Elmer)	Alcohol 70%	<i>Escherichia coli</i>
Sulfato de cobre (Panreac)	Agar nutritivo (BD Bioxon)	<i>Candida albicans</i>
Sulfato de zinc (Merk)	Agar PDA (BD Bioxon)	
Metilcelosolve	Solución salina	
Ác.perclórico	Agar Nutritivo (Dibico)	
Reactivo de NED		
Sulfanilamida (J.T.Baker)		
Nitrito de sodio (Merck)		
Hidroxiprolina (Sigma)		
Acetato de sodio (Merck)		
Ac. Cítrico (J.T.Baker)		
Ac. Acético 15% (J.T.Baker)		
Hidróxido de sodio (Merck)		
Reactivo de Ehrlich		
Cloramina T (Alpha chemika)		

8. Metodología

8.1 Actividad cicatrizante

- **Obtención del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.**

El extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. fué proporcionado en el laboratorio 1 de la planta alta en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza. Se obtuvo a partir de 200 gramos de la planta, se maceró y se dejó reposar durante 24 horas en 1 litro de agua, posteriormente se filtró al vacío, se colocó en un rotavapor para eliminar el agua. Se dejó secar a 37 °C, se recolectó el extracto y se pulverizó, se guardó en refrigeración para su posterior uso⁸.

- **Elaboración de ungüento al 4% con extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.**

Se pesaron 0.4 g del extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. y se disolvieron en 3 mL de agua destilada, se utilizó un Sonicador hasta disolver completamente. El extracto se adicionó a 10 mL de vaselina previamente fundida en un horno de microondas a ciclos de 60 segundos, con ayuda de un agitador de vidrio se incorporó la mezcla hasta que solidificó y su aspecto fue homogéneo.

- **Elaboración de la escisión**

Fueron empleados 18 ratones CD1 machos de entre 35 a 40 gramos de peso, los cuales fueron anestesiados en una cámara de éter y se les realizó una escisión circular, en la región dorsal con ayuda de un sacabocado estéril de acero inoxidable de 1 cm de diámetro, la escisión se realizó en el área de **A** a **B** como se observa en la **Figura 8.1**.

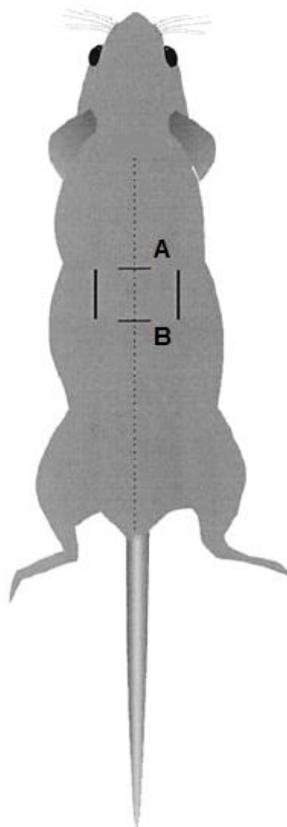
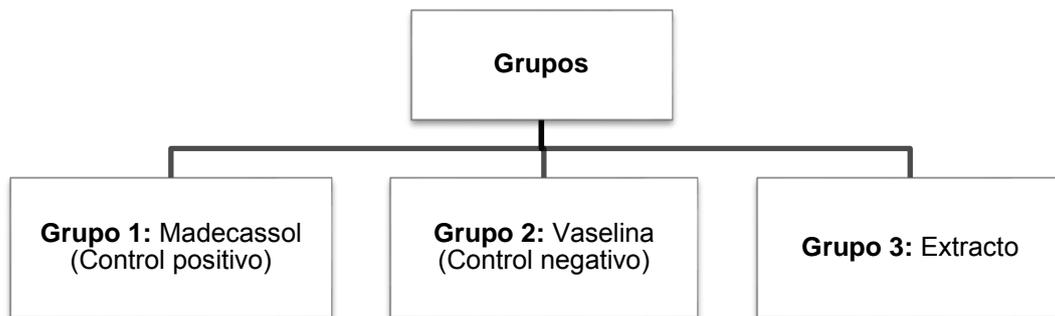


Figura 8.1 Muestra la zona en donde se practicó la escisión

Los 18 ratones fueron divididos en 3 grupos de 6 ratones cada uno y se les marcó para identificarlos, se mantuvieron en jaulas con separadores de madera para evitar que los ratones se lastimaran. Los grupos de ratones quedaron organizados de la siguiente manera:



Se midió el diámetro de la lesión practicada a todos los ratones con ayuda de una regla y empleando guantes se les aplicó Madecassol a los ratones del grupo 1 (control positivo), al grupo 2 se le aplicó vaselina (control negativo) y al grupo 3 se le aplicó ungüento al 4% preparado con el extracto acuoso de la Capitaneja. Esto se llevó a cabo durante los siguientes 14 días, el día 15 los ratones fueron sacrificados, se les anestesió en una cámara de éter y se obtuvieron muestras de sangre del plexo axilar, la sangre fue colectada en viales cónicos para obtener suero y también se obtuvieron muestras de tejido de la zona en donde se practicó la lesión empleando el mismo sacabocado con el que se realizaron las heridas el día 1 y se guardaron en viales.

8.2 Determinación de nitritos

- **Activación del cadmio**

Se emplearon 18 tubos limpios de 13x100 en los que se colocaron 0.500 g de cadmio metálico en cada uno, el cadmio se plateó con 2 ml de solución acuosa de CuSO_4 al 5% y se agitó durante 10 minutos aproximadamente con ayuda de un Vortex, después de la agitación, se llevaron a cabo 3 lavados llenando el

tubo con agua destilada y retirándola con ayuda de una bomba de vacío con el fin de eliminar el cobre, enseguida se hicieron 2 lavados con HCl 0.1N con el tubo lleno para remover todo el $\text{Cd}(\text{OH})_2$ y se realizó un último lavado con una solución acuosa de NH_4Cl al 5% (pH ajustado a 9 con borato de sodio), esta solución se retiró del tubo antes de adicionar la muestra previamente tratada.

- **Tratamiento de las muestras**

Este procedimiento se llevó a cabo por cada una de las muestras de plasma obtenido a partir de la sangre colectada de los 18 ratones empleados en el modelo de escisión. Todas las muestras fueron tratadas en viales y tubos nuevos para evitar la contaminación con nitritos de otras fuentes.

A 100 μL de plasma se le adicionaron 300 μL de agua destilada para obtener una dilución de 1:4, se agitó la dilución con un Vortex para homogeneizar, se retiraron 20 μL de dilución y se agregaron 20 μL de solución de ZnSO_4 al 30% para desproteínizar la muestra, se agitó con un Vortex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos para separar el precipitado. Todo el sobrenadante separado se adicionó a un tubo con cadmio activado y se dejó en agitación en un Rocker durante 15 minutos, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm y se tomaron 200 μL de sobrenadante para el ensayo.

- **Curva estándar de nitrito**

Se preparó inicialmente una solución estándar de nitrito de sodio en

concentración de 2µL/mL y se realizaron las diluciones que a continuación se muestran para realizar la curva estándar.

Cuadro 8.1 Curva estándar de nitritos

Tubo	Estándar (µL)	Agua destilada (µL)	Concentración (µg/mL)
1	0	900	0
2	100	800	0.2
3	200	700	0.4
4	300	600	0.6
5	400	500	0.8
6	500	400	1

- **Ensayo**

Para llevar a cabo la determinación de nitritos espectrofotométricamente se preparó el reactivo de sulfanilamida disolviendo 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15% y el reactivo de NED disolviendo 0.2 gramos de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato en 150 ml de ácido acético al 15%.

A los 200 µL del sobrenadante obtenido en la preparación de las muestras y a los tubos de la curva estándar se les adicionaron 50 µL del reactivo de sulfanilamida y se les dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se adicionaron 50 µL del reactivo NED y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en un Rocker. Se leyeron las absorbancias a 540 nm.

8.3 Determinación de Hidroxiprolina

- **Tratamiento de las muestras**

Con un sacabocados Gimelmex 5/16' se tomaron muestras a partir del tejido obtenido de los ratones el día en que se sacrificaron, las muestras se pesaron y colocaron en tubos Eppendorf y se les adicionaron 500 μ L de NaOH 2N, se colocaron en la autoclave a 120 °C durante 20 min, cuando las muestras alcanzaron temperatura ambiente se centrifugaron a 5000 rpm y el sobrenadante se traspaso a un tubo nuevo.

- **Curva estándar de hidroxiprolina (Hyp)**

Se disolvieron 200 mg de Hidroxiprolina estándar en 0.5 ml de HCL 0.001N, para disolver completamente se calentó en baño María a 60 °C, a partir de esta disolución **A**, se realizaron disoluciones consecutivas como se muestran en el **Cuadro 8.2**.

Cuadro 8.2 Curva estándar de hidroxiprolina

Tubo		Hyp (μL/mL)
A	200mg std + 500 μ L de HCL 0.001N	400
B	250 μ L A + 250 μ L H ₂ O	200
C	250 μ L B + 250 μ L H ₂ O	100
D	250 μ L C + 250 μ L H ₂ O	50
E	250 μ L D + 250 μ L H ₂ O	25

- **Procedimiento de ensayo**

Antes de comenzar el ensayo se preparó reactivo de Erlich disolviendo 20 gramos de p-dimetilaminobenzaldehído en 100 mL de metilcelosolve, reactivo de cloramina T que se preparó disolviendo 1.41g de cloramina T en 20 ml de agua destilada, se añadieron 30 mL de metilcelosolve y 50 mL de buffer de acetatos pH 6.5; también se preparó una solución de ácido peryódico 3.15 M.

Se tomaron 50 μ L de cada tubo de la curva estándar y 150 μ L de cada una de las muestras previamente tratadas y se les adicionaron 450 μ L de Cloramina-T, se dejaron oxidar por 20 minutos a temperatura ambiente y se les adicionaron 450 μ L de ácido perclórico (3.15M), se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente; por último se adicionaron 500 μ l del reactivo de Ehrlich y los tubos se dejaron incubando en baño María a 60 °C durante 25 minutos. Las muestras se colocaron en un baño de agua fría y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm, se leyeron las absorbancias de todos los tubos a 557 nm.

8.4 Evaluación antimicrobiana

- **Preparación del control positivo (100 μ g/100 μ L)**

Para el control positivo en la prueba antimicrobiana con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se preparó una solución de ciprofloxacino en concentración de 100 μ g/100 μ L y para *Candida albicans* se preparó una

solución de terbinafina de la misma concentración. Las soluciones se esterilizaron con un filtro milipore de 0.45 µm y se almacenaron en tubos Eppendorf estériles.

- **Preparación del extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.**

Se pesaron 50 mg del extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. y se disolvieron en 10 mL de agua destilada, se empleó un Sonicador hasta disolver completamente el extracto, a partir de esta solución se obtuvieron 3 diluciones del extracto en concentración de 500 µg/mL, 250 µg/mL y 125 µg/mL. Las soluciones obtenidas se esterilizaron empleando un filtro milipore de 0.45 µm y se conservaron en tubos Eppendorf estériles.

Cuadro 8.3 Disoluciones realizadas con el extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.

Solución	Agua	
Solución madre	50 mg de extracto	10 mL
Extracto (500 µg/mL)	0.5 mL de Solución madre	4.5 mL
Extracto (250 µg/mL)	2 mL de Extracto (500 µg/mL)	2 mL
Extracto (125 µg/mL)	1 mL de Extracto (250 µg/mL)	1 mL

- **Preparación de solución de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* en una concentración de 1×10^5 UFC/mL**

Se preparó una suspensión del microorganismo reactivado en solución salina estéril ajustando con el tubo número 1 en la escala de Mc Farland que equivale a una concentración de 3×10^8 UFC, todo esto en condiciones de esterilidad. A partir de esta suspensión se realizaron las siguientes diluciones para obtener una concentración final de 1×10^5 UFC/mL. Esto se hizo con las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

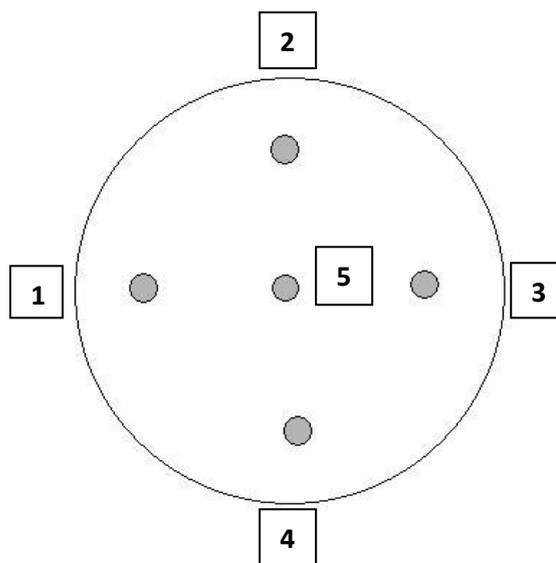
Cuadro 8.4 Disoluciones realizadas para preparar suspensión de un microorganismo en concentración de 1×10^5 UFC/mL

Concentración de la suspensión (UFC/mL)	Suspensión (mL) + Solución salina (mL)
3×10^6	0.1 mL suspensión 3×10^8 + 9.9 mL solución salina
3×10^5	0.1 mL suspensión 3×10^6 + 0.9 mL solución salina
1×10^5	1 mL suspensión 3×10^5 + 2 mL solución salina

- **Ensayo antibacterial**

Se utilizaron 6 cajas Petri de plástico con 20 ml de Agar nutritivo para sembrar *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y 3 cajas Petri de vidrio con Agar papa dextrosa para *Candida albicans*.

El microorganismo se sembró de forma masiva usando un hisopo estéril y se realizaron 5 pozos en el agar con ayuda de un sacabocado (5 mm de diámetro) previamente flameado, se colocaron 50 μ l de cada solución tal y como se muestra en la **Figura 8.2**.



- 1) Extracto 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 2) Extracto 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 3) Extracto 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 4) Ciprofloxacino/Terbinafina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Control positivo)
- 5) Solución salina (Control negativo)

Figura 8.2 Se muestra el orden de los pozos realizados en las cajas Petri.

Una vez realizado esto, las placas con *E. coli* y *S. aureus* se dejaron en incubación a 36° C y se observaron después de 24 horas, mientras que las placas sembradas con *Candida albicans* se dejaron incubar por más de 72 horas. Después del tiempo de incubación se observaron las caja a contra luz para observar si había inhibición y se midió el diámetro de los halos de inhibición, el procedimiento se hizo por triplicado para cada microorganismo empleado.

8.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con ayuda del programa SPSS por medio de análisis de varianza (ANOVA) con 95% de confianza y también se realizó la prueba post-hoc de Tuckey.

9. Resultados

El diámetro de las lesiones realizadas en los tres grupos de ratones fue observado y medido durante 15 días, en el **cuadro 9.1** se comparan los diámetros finales de las lesiones en los tres grupos, como se observa, no hay diferencias significativas entre los grupos.

Cuadro 9.1 Comparación de los diámetros finales (mm) de las lesiones

Diámetros finales (mm) de las lesiones por grupo			
Parámetros	Madecassol (+)	Vaselina (-)	<i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less.
	n=6	n=6	n=6
Diámetro final (mm)	0.35 ± 0.18	0.30 ± 0.06	0.29 ± 0.11

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

En el décimo día después de producida la escisión, el grupo de Madecassol (control positivo) muestra una notable reducción en la lesión tal como se puede ver en la **figura 9.1**, también se puede observar el crecimiento de pelo alrededor del área de la costra, mientras que en el grupo al que se aplicó vaselina (**figura 9.2**), se observa una disminución en el diámetro de la herida, sin embargo el pelo no ha crecido en la zona. En el grupo de ratones tratados con el extracto también se observó que el diámetro de las heridas se redujo, no obstante se observó enrojecimiento alrededor de la lesión, además de zonas con pérdida de pelo en donde no se practicó la lesión tal y como se muestra en la **figura 9.3**, esto se percibió en la mitad de los ratones tratados.



Figura 9.1

Ratón del grupo de Madecassol al décimo día de producida la lesión.

Figura 9.2

Ratón del grupo al que se aplicó Vaselina, día 10 después de la escisión.

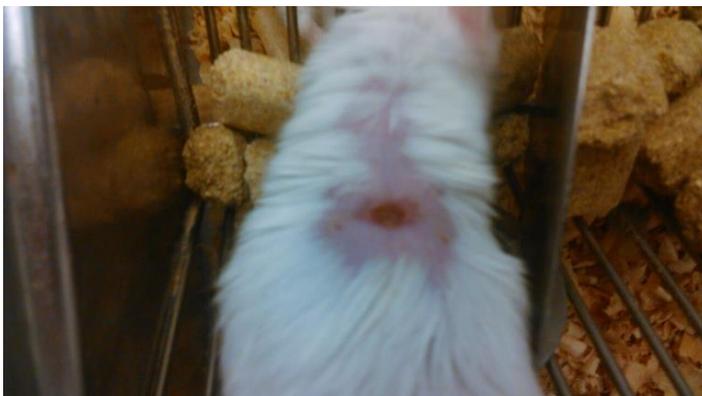


Figura 9.3

Día 10, ratón perteneciente al grupo al que se aplicó extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.

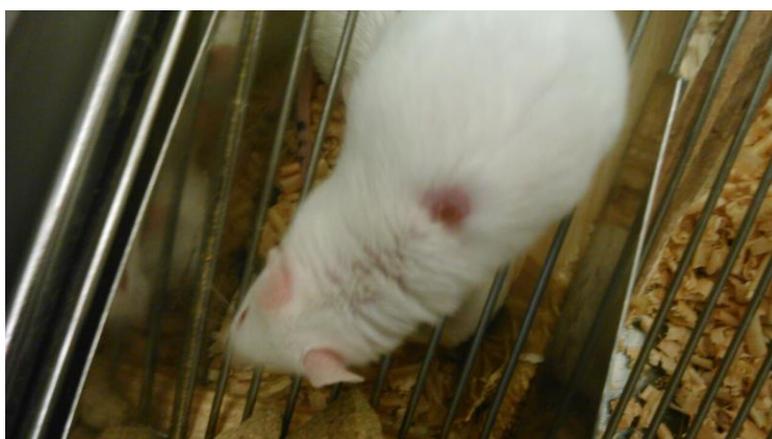
El día previo al que fueron sacrificados, se encontró que en el grupo control positivo (Madecassol) había crecimiento de pelo en las zonas donde se practicaron las lesiones, las cuales eran muy pequeñas y prácticamente no se notaban como se observa en la **figura 9.4**, lo mismo sucedió para el grupo control negativo (Vaselina). En cuanto al grupo tratado con el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., a pesar de que se redujo el diámetro de las

lesiones en los ratones, en la mitad del grupo no observó crecimiento de pelo como en el caso de los otros grupos, por lo que la lesión aún era visible tal y como se muestra en las **figuras 9.5 y 9.6**.



Figura 9.4

Día 14, ratón del grupo tratado con Madecassol.



Figuras 9.5 y 9.6

Ratones del grupo tratado con extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less en el día 14.

El modelo de escisión en el dorso en ratones CD1 permitió obtener muestras de tejido para determinar hidroxiprolina, el análisis de varianza (**Cuadro 9.2**)

muestra diferencias significativas en la cantidad de hidroxiprolina (mg/g) que se encuentra en las muestras de tejido de los tres grupos ($p < 0.05$).

Cuadro 9.2 Comparación de Hidroxiprolina (mg/g)

Hidroxiprolina en mg por g de tejido			
Parámetros	Madecassol (+)	Vaselina (-)	<i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less.
	n=6	n=6	n=6
Hidroxiprolina (mg/g)	116.75 ± 38.13*	96.35 ± 27.00	59.00 ± 21.53*

Prueba ANOVA de un factor (95% de confianza) con prueba post hoc de Tuckey, los valores corresponden a media ± desviación estándar. La diferencia de medias es significativa $p < 0.05$.

El grupo de ratones tratados con el extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. muestra mayores niveles de nitritos que los ratones de los grupos tratados con Madecassol y Vaselina, los cuales muestran resultados semejantes.

Cuadro 9.3 Comparación de nitritos determinados en suero (µg/dL)

Nitritos en µg por dL de suero			
Parámetros	Madecassol (+)	Vaselina (-)	<i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less.
	n=6	n=6	n=6
Nitritos (µg/dL)	129.79 ± 50.10	121.57 ± 56.50*	236.86 ± 61.14*

Prueba ANOVA de un factor (95% de confianza) con prueba post hoc de Tuckey, los valores corresponden a media ± desviación estándar. La diferencia de medias es significativa $p < 0.005$

Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto por medio del método de difusión en pozos para comprobar si el posible efecto cicatrizante de la planta se debía a este efecto antimicrobiano, sin embargo no se observó ningún tipo de actividad antibacterial o antimicótica sobre las cepas empleadas que fueron *Staphylococcus aureus* (Gram positivo), *Escherichia coli* (Gram negativo) y *Candida albicans* (Levadura).

Cuadro 9.4 *Diámetro de los halos de inhibición (mm) por el métodos de difusión en pozos*

Diámetro de los halos de inhibición (mm)									
Concentración del extracto (µg/mL)	Halo de inhibición (mm)								
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Candida albicans</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
125	—	—	—	—	—	—	—	—	—
250	—	—	—	—	—	—	—	—	—
500	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Control (+)	18	17	17	33	32	28	16	14	13

10. Análisis de resultados

Actualmente el tratamiento de las heridas es costoso, por lo que la gente recurre a remedios tradicionales en su mayoría herbolarios que son fáciles de encontrar, tal es el caso de la Capitaneja o *Verbesina crocata* (Cav.) Less., sin embargo muchas de las propiedades atribuidas a la mayoría de las plantas empleadas en herbolaria son conocidas de forma empírica y requieren de estudio.

Es bien conocido que las plantas son productoras de un gran número de metabolitos secundarios, que suelen ser usados en las industrias farmacéutica, alimenticia y de cosméticos entre otras, esto debido a sus variadas propiedades. Actualmente se conocen muchas plantas con efecto cicatrizante, de las cuales algunas producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, dichos metabolitos como terpenoides y ácidos fenólicos (ácido isoclorogénico y clorogénico) se han encontrado en plantas de la familia *Asteracea*, por lo que se esperaría encontrar efecto antimicrobiano en el extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., no obstante los resultados demostraron que no es así, lo que nos lleva a suponer que la planta no produce estos metabolitos, sin embargo hay que tomar en cuenta el solvente empleado, en este caso, el agua es capaz de extraer algunos terpenoides pero no polifenoles como lo harían el etanol y el metanol ⁴¹, sería interesante realizar otro tipo de extracción pero cabe de destacar que la Capitaneja se prepara comúnmente hirviéndola en agua, por lo que se descarta la relación del efecto

antimicrobiano de la planta con la actividad cicatrizante reportada empíricamente.

De acuerdo a los resultados respecto al efecto cicatrizante, el diámetro final de las lesiones en los tres grupos de estudio no mostró diferencias significativas, aunque el grupo tratado con Madecassol (control positivo) mostró una rápida mejoría, el diámetro final es semejante al del grupo control negativo (Vaselina), esto probablemente se debe a que la vaselina, aunque no tiene actividad cicatrizante, puede mantener la humedad de la herida al cubrirla y fomentar la reepitelialización, lo que también pudo haber sucedido con el extracto 4% de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., el cual fue elaborado a base de vaselina y que podría haber alterado los resultados, sin embargo esto no resultó así, los ratones tratados con Madecassol y Vaselina muestran una mayor producción de colágeno sobre el grupo tratado con el extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., lo que indicaría que a pesar de que el diámetro final de las lesiones de los tres grupos fue semejante estadísticamente, la calidad en la reparación de tejido en el grupo de ratones tratados con el extracto no fue la mejor, pudiéndose ver afectadas la fase proliferativa y de remodelación donde comienza la síntesis de colágeno, la clave podría encontrarse en el hecho de que los ratones de este grupo (extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.) muestran mayores niveles de nitritos que los ratones de los otros grupos, estos niveles tan altos no necesariamente muestran que el extracto interviene en el proceso de cicatrización favoreciendo la angiogénesis a pesar de que se observó tejido de granulación en las heridas, el óxido nítrico (NO) también es un radical libre y cuando se producen grandes cantidades de NO, éste se

considera como un agente tóxico, el cual al incrementar su concentración favorece reacciones oxidantes y puede actuar de forma perjudicial en los tejidos ^{49, 50}, lo que a su vez explicaría el por qué la mitad del grupo de ratones tratados con el extracto presentó pérdida de pelo alrededor de la zona de la lesión, también es bien sabido que los macrófagos participan en el proceso de cicatrización en parte produciendo óxido nítrico como mediador citotóxico y se ha demostrado en experimentos *in vitro* que esta actividad citotóxica provoca la disminución de la vida media de los macrófagos ⁵¹, y dado que estos han sido descritos como “indispensables” para que se lleve a cabo exitosamente el proceso de cicatrización se sugiere que la sobre estimulación en la producción de óxido nítrico podría reducir la cantidad de macrófagos presentes en la lesión lo que disminuye la cantidad de factores necesarios para que se lleve a cabo correctamente el proceso de curación.

Probablemente alguno de los metabolitos extraídos de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. tiene la capacidad de estimular la producción de óxido nítrico y su efecto es dependiente de la dosis, ya que se ha comprobado que el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. posee actividad antiinflamatoria en ratones CD1 a una concentración de 50mg/kg en el proceso inflamatorio agudo ⁵ y se esperaría que este efecto antiinflamatorio participara favoreciendo el proceso de cicatrización, actualmente se ha reportado que muchas plantas de la familia *Asteraceae* contienen lactonas sesquiterpénicas, componentes activos con actividad antiinflamatoria y se ha encontrado que tienen un papel modulador sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos ⁵¹, estas moléculas han llamado la atención de los científicos por el amplio espectro de

actividades biológicas que presentan, no solo antiinflamatoria si no también antitumoral, citotóxica, antibacterial, antimalaria y actividad neurotóxica y alérgica ⁵². Dado que el extracto se empleó en una concentración al 4%, se esperaría observar diferentes efectos con diferentes concentraciones concentraciones.

11. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. al 4% no tiene actividad cicatrizante sobre lesiones practicadas en ratones CD1.

Las heridas tratadas con el extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. al 4% no tuvieron un mejor desarrollo en el proceso de curación, el extracto por sí solo no tiene la capacidad de incrementar la producción de colágeno y probablemente aumenta los niveles de óxido nítrico a niveles perjudiciales para el proceso de sanación además de que no tiene efecto antimicrobiano contra bacterias Gram positivas, Gram negativas ni en levaduras.

12. Propuestas

- Determinar la actividad cicatrizante empleando Madecassol en forma de ungüento preparado con vaselina.
- Realizar estudios de toxicidad ya que la mitad de los ratones tratados con el extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. presentaron caída de pelo.
- Evaluar la actividad cicatrizante en ratones CD1 con extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. preparado a otras concentraciones.
- Evaluar la actividad cicatrizante de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. realizando un extracto etanólico.
- Evaluar la producción de NO en macrófagos con diferentes concentraciones del extracto de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.

13. Referencias

1. 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
2. Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*. 2005;62:12-15.
3. Del Vitto AL, Petenatti ME. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*. 2009;18:87.115.
4. Perez RM, Ocegueda A, Muñoz JL, Ávila JG, Morrow WW. A study of the hypoglycemic effect of some mexican plants. *J Ethnopharmacol* 1984; 12(3):253-262.
5. Rodriguez LH. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. (Capitaneja) en ratón CD1 [tesis para licenciatura]. México D.F: Universidad Nacional autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2014.
6. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana [Internet]. México: UNAM; 2009 [consultado 21 ene 2015]. Disponible en:

[http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=V
erbesina%20crocata&id=7043](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbesina%20crocata&id=7043)

7. Luchas FV, Muñoz MV, Fornes PB. La cicatrización de las heridas. *Anedidic*. 2008;2(3):8-15.
8. Gawkrödger DJ. *Dermatology an illustrated colour text*. 3ª ed. Sheffield: Churchill Livinstone; 2002.
9. Paul AJ, Kolarsick BS, Kolarsick BM. Anatomy and physiology of the skin. *J Dermatol Nurses Assoc* 2011;3(4):203-213.
10. Navarrete FG. Histología de la piel. *Rev Fac Med* 2003;46(4):131-33.
11. Rassner G. *Manual y atlas de dermatología*. 5ª ed. Madrid: Harcout; 1999. p 35.
12. Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Fitzpatrick *Dermatología en medicina general*. 7ª ed. Madrid: Editorial médica panamericana; 2003. p 57-72.
13. Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª ed. Madrid: Editorial médica panamericana; 2008.
14. Garrido PA, Teijón JR, Blanco GD, et al. *Fundamentos de bioquímica estructural*. 2ª ed. Madrid: Tébar; 2006.

15. Devlin TM. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínica. 4ª ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
16. Guarín CC, Quiroga SP, Landínez PN. Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas. Rev Fac Med 2013;61(4):441-448.
17. 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.
18. Dohert MG, Albanese CT, Anderson TJ, et al. Current Diagnosis & Treatment: Surgery [Internet]. 13ª ed. . United States of America: Mc Graw Hill; 2010 [Consultado el 11 de Mayo del 2015]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=24
19. Brunicardi CF, Andersen KD, Billiar RT, et al. Schuartz, Principios de cirugía [Internet]. 10ª ed. United States of America: Mc Graw Hill; 2015 [Consultado 11 de Mayo del 2015]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=24
20. Valencia BC. Cicatrización: proceso de reparación tisular. aproximaciones terapéuticas. Andina 2010;12(20):85-98.

21. Guyton CG, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 12^a ed. Barcelona: Elsevier; 2012.
22. Chung CK, Gosain KA, Gurtner CG, et al. Grabb and Smith's Plastic Surgery. 6^a ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007. p 15-21.
23. Bain JB, Lewis SM, Laffan AM. Practical Haematology. 11^a ed. London: Elsevier; 2011. p 396-398.
24. Shai A, Maibach HI. Wound healing and ulcers skin. 1^a ed. New York: Springer; 2005. p 1-15.
25. Takayama Y. Lactoferrin and its Role in Wound Healing. 1^a ed. Ibaraki: Springer; 2012. p 1-14.
26. Martinez EJ. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. Cancerología. 2006;1:83-96.
27. Hakkienen L, Larjana H, Koivisto L. Granulation tissue formation and remodeling. Endod Topics 2012;24:94-129.
28. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. J Dent Res 2010; 89(3):219-229.

29. Thomass HC. Checklist for Factors Affecting Wound Healing. *Advances in Skin & Wound Care* 2011;24(4):192.
30. Somboonwong J, Kankaisre M, Tantisira M, et al. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *Bio Med central* 2012;15(103).
31. Gethin G. Role of topical antimicrobials in wound management. *J Wound Care*. 2009;4-8.
32. Gottrup F, Apelqvist J, Bjansholt T, et al. EWMA Document: Antimicrobials and Non-healing Wounds Evidence, Controversies and Suggestions. *J Wound Care* 2013;22(5): 1-92.
33. Hatz RA, Niedner R, Vanscheid W, et al. Wound healing and wound management. 1ª ed. Berlin: Springer Verlag, 1994. p122.
34. Cordiés JL, Machado RL, Hamilton CM. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica* 1998;8(1):13-27.
35. Forbes B, Sahm FD, Weissfeld SA. Bailey & Scott: Diagnóstico microbiológico. 13ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2007. p 172.

36. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, et al. Velázquez: farmacología básica y clínica. 18ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2008.
37. Organización Mundial de la Salud: Portal de Información - Medicamentos Esenciales y Productos de Salud Un recurso de la Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2004 [consultado el 1 de Octubre del año 2015]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/19.html#Js5422s.19.1>
38. Murray RP, Rosenthal SK, Pfaller M. Microbiología Médica. 7ª ed. Bacerlona: Elsevier Sauders, 2014. P 12.
39. Levinson W. Review of Medical Microbiology and Immunology [Internet]. 13ª ed. United States of America: Mc Graw Hill; 2015 [Consultado el 3 de Junio del 2015]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=24
40. Cruz CA, Rodríguez NN, Rodríguez CE. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*. Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient 2010; 13 (2): 117-124.
41. Murphy CM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev 1999;12(4): 564–582.

42. Silva NC, Fernández A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins* 2010; 16(3):402-413.
43. Rezvanpanah S, Karamatollah R, Taghi GM, et al. Antibacterial properties and chemical characterization of the essential oils from summer savory extracted by microwave-assisted hydrodistillation. *Braz J Microbiol* 2011; 42:1453-1462.
44. Winyard PG, Willoughby AD. *Inflamation protocols*. 1ª ed. New Jersey: Human Press; 2003. p 251.
45. DiPietro AL, Burns LA. *Wound healing: methods and protocols*. 1ª ed. New Jersey: Human Press; 2003. p 3.
46. Sun J, Zhang X, Broderick M, et al. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 2003; 3:276-284.
47. Titheradge AM. *Nitric oxide protocols*. 1ª ed. New Jersey: Humana Press; 1998. p 84-85.
48. Álvarez LM, Isaza MG, Echeverry LH. Efecto antibacteriano in vitro de *Austroeupatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia amarga*) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (*Clavo de laguna*). *Biosalud* 2005;(14):46-55.

49. Silva DG, Rico PJ, Partata ZE. El papel del óxido nítrico en la modulación del proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal. Acta Odontológica Venezolana 2011;14(4): 1-9.
50. Barrios GP, Hernández GK, Martínez VA. Efecto tóxico temprano del nitroprusiato de sodio en el hipocampo de rata: implicaciones de óxido nítrico. XXI Congreso de Investigación [Internet]. 2010. Disponible en: <http://acmor.org.mx/cuamweb/reportescongreso/2010/biologia/211-%20ENP%20No1-Efecto%20Toxico%20delNitroprusiato%20de%20Sodio-%20rata.pdf>
51. 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.
52. Ruiz RE, Suarez Margarita. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista cenic 2015; 46(1):9-24.