



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

Caracterización de los compuestos presentes en
***Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad**
cicatrizante en modelo murino

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:
L.F. LUIS RUBÉN MARTÍNEZ CUEVAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERA LUCÍA PETRICEVICH
CODIRECTOR DE TESIS: DR. RODOLFO ABARCA VARGAS

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO, 2021



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 6 de Inflamación y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en el periodo enero 2019 – diciembre 2020. Cuernavaca, Morelos, México.

Miembros del comité tutorial:

Directora: Dra. Vera Lucia Petricevich

Co-tutor: Dr. Rodolfo Abarca Vargas

Tutor Personal: Dr. José Santos Angeles Chimal

Dr. Arturo Villavicencio Rivero

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dr. Juan José Acevedo Fernández

Miembros de la comisión revisora de tesis y jurado de examen:

Presidente: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Secretario: Dr. Julio Chávez Vela

1er Vocal: Dr. Arturo Villavicencio Rivero

2do Vocal: Dra. Vera Lucia Petricevich

3er Vocal: Dr. Rodolfo Abarca Vargas

Agradezco de manera especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 2019-000002-01NACF-08344 con el No. 962341 otorgada para la realización de este trabajo, la cual sin ella no hubiera sido posible.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jose Luis Martínez Sámano y Rossi Cuevas Castrejón por todo el apoyo brindado durante mis estudios, por darme ánimos de seguir adelante y nunca rendirme y por estar siempre presentes, siempre serán lo mejor que me ha dado la vida.

A la Dra. Vera Petricevich por aceptarme en su equipo de trabajo del L-6, por toda la confianza, por todos los momentos, aprendizajes y consejos brindados durante la maestría. Tiene toda mi admiración y respeto, sin duda fue un gusto poder conocerla y considerarla como si fuera de mi propia familia, no hay palabras que expresen lo mucho que disfrute la maestría bajo su dirección. Es y siempre será una gran Doctora.

Al Dr. Rodolfo por todo el apoyo y conocimientos brindados, siempre estuvo pendiente de que todo, fue y será siempre para mí un gran compañero y amigo dentro del laboratorio, gracias Doc por todos los momentos que pasamos, usted tiene toda mi admiración y respeto, un gran ejemplo a seguir.

A la Ing. Mayra Cedillo por todo su apoyo dentro del laboratorio, por todo los aprendizajes y conocimientos que compartimos en este trayecto, por todos los momentos que pasamos, sin duda fuiste siempre parte importante y de gran ayuda para este proyecto, eres una gran amiga sin duda. A L.F. Lizbeth Medina, que gusto que podamos ser equipo de laboratorio nuevamente, ahora de maestría, gracias por brindarme tu apoyo y amistad todos estos años, tú sabes muy bien todo el cariño y aprecio que te tengo.

A la Técnico Grecia, la Maestra Claudia y la futura Médica Tania, miembros, compañeras y amigas del laboratorio 6 de Inflamación y Toxicología, con las cuales compartí grandes momentos e hicieron más amena mi estancia dentro del laboratorio.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



A mis compañeros y amigos de maestría: Ana Victoria, Aislinn, Omar y Gueorgi, con los cuales compartí momentos de alegría, pláticas constructivas y sabiduría en la maestría, gracias por el apoyo, por estar siempre presentes y no distanciarse, siempre seremos la mejor generación, se tenía que decir y se dijo.

A mis compañeros y amigos de carrera L.F. Melissa Hernández y Kevin Avilés, ustedes saben muy bien cuanto los estimo, los quiero y aprecio, son como parte de mi familia, gracias por todos los momentos de alegría y el apoyo que me han brindado durante la maestría, siempre es un gusto poder platicar y convivir con ustedes.

A mis amigos personales: Lic. Williams Soriano, Dr. Anuar Salazar y Dr. Fernando Rojas por todo el apoyo y conocimientos que me brindaron durante la maestría, sin duda me ayudaron a crecer académica y personalmente, por todos los ánimos que me dan para seguir adelante en mis estudios y por todos los momentos de alegría que compartimos siempre, sin duda tienen toda mi admiración y respeto.

Al Dr. Angel Oliva, porque fuiste parte importante para que pudiera continuar con mis estudios, por qué estuviste presente dándome ánimos siempre para no rendirme y por qué sigues estando siempre que te necesito, tú sabes que siempre estaré agradecido contigo, gracias por el apoyo que me has dado todo este tiempo.

A mis hermanos: Rossy, Nena y Fernando y sobrinos: Grecia, Luis, Katia, Rosy, Michelle por todo el apoyo me que me han dado, gracias por la fuerza y cariño que siempre me dan, sin duda son parte de mi motor para seguir adelante.

A los miembros del comité tutorial y de titulación, gracias por todos los conocimientos que me brindaron para mejorar el proyecto y hacer un buen trabajo.



LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Bxb</i>	<i>Bougainvillea x buttiana</i>
CCL	Quimiocina ligada
CDC	Centro de control de enfermedades
CIByC	Centro de investigación en biodiversidad y conservación
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
DCM	Diclorometano
DKM	Acetona
<i>EABxb</i>	Extracto de acetona de <i>Bougainvillea x buttiana</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GC-MS	Cromatografía de gases - Espectrometría de masas
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
IL	Interleucina
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LPS	Lipopolisacárido
M1	Macrófagos tipo 1
M2	Macrófagos tipo 2
MEC	Matriz extracelular
MeOH	Metanol
MF	Macrófagos
PA	Plasminógeno
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMN	Polimorfonucleares
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLC	Cromatografía en capa fina
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM	Moléculas de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Capas y componentes de la piel humana.	6
Figura 2. Células de la epidermis.	8
Figura 3. Composición de la dermis.	10
Figura 4. Composición de la hipodermis.	11
Figura 5. Modelo del mecanismo molecular y celular que se genera en las heridas cutáneas.	14
Figura 6. Fases de la cicatrización y sus principales células involucradas en cada una de ellas.	17
Figura 7. Representación de la fase de coagulación.	19
Figura 8. Representación de la fase de inflamación.	21
Figura 9. Representación de los mecanismos celulares y moleculares en la fase inflamatoria.	23
Figura 10. Representación de la fase de proliferación.	24
Figura 11. Representación de los mecanismos celulares y moleculares de la fase de proliferación.	26
Figura 12. Representación del mecanismo celular y molecular de la angiogénesis.	27
Figura 13. Representación del periodo de maduración de una cicatriz.	28
Figura 14. Representación del mecanismo celular y molecular de la fase de maduración.	30
Figura 15. Flores y brácteas de <i>B. x buttiana</i> (Var. Rosa).	35
Figura 16. Distribución de <i>Bougainvillea</i> en la república mexicana.	36
Figura 17. Ubicación de la vena superficial temporal para la punción submandibular.	49
Figura 18. Macerado de <i>B. x buttiana</i> en acetona.	51
Figura 19. Eliminación del disolvente con el rotavapor.	51
Figura 20. Fraccionamiento primario del extracto de acetona de <i>B. x buttiana</i> .	51



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



- Figura 21.** Fracciones recolectadas de la columna cromatográfica. **53**
Primera hilera de izquierda a derecha (vial 1 al 10), segunda hilera (vial 11 al 20), tercera hilera (vial 21 al 30) y cuarta hilera (vial 31 al 39).
- Figura 22.** Cromatografías en capa fina de las 39 fracciones y sus agrupaciones. **53**
- Figura 23.** Cromatografías en fase normal de los grupos de fracciones 1 al 4 a diferentes longitudes de onda UV (A y B) y con un revelador de terpenos (C). **57**
- Figura 24.** Cromatografías en fase reversa de los grupos de fracciones 5 al 11 a diferentes longitudes de onda UV (A y B) y con un revelador de flavonoides (C y D). **59**
- Figura 25.** Cromatograma HPLC del grupo de fracción 5 del extracto cetónico de *Bxb*. **61**
- Figura 26.** Cromatograma HPLC del grupo de fracción 7 del extracto cetónico de *Bxb*. **62**
- Figura 27.** Cromatograma HPLC del grupo de fracción 8 del extracto cetónico de *Bxb*. **63**
- Figura 28.** Cromatograma HPLC del grupo de fracción 9 del extracto cetónico de *Bxb*. **64**
- Figura 29.** Cromatograma HPLC del grupo de fracción 10 del extracto cetónico de *Bxb*. **65**
- Figura 30.** Cromatograma HPLC del grupo de fracción 11 del extracto cetónico de *Bxb*. **66**
- Figura 31.** Comparación macroscópica del cierre de la herida entre los diferentes grupos experimentales de los días correspondientes a las fases de la cicatrización (días: 0, 2, 6, 9, 11 y 13). **70**
- Figura 32.** Cinética del cierre del tamaño de la herida de los días 1 al 14 (Datos crudos). **71**
- Figura 33.** Cinética del cierre del tamaño de la herida de los días 1 al 14 (Datos normalizados). +EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (* $p < 0.05$). **72**



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



- Figura 34.** Área bajo la curva del primer periodo (fase de hemostasia). **74**
Los valores corresponden a la media (n=6, +EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).
- Figura 35.** Área bajo la curva del segundo periodo (fase de inflamación). **75**
Los valores corresponden a la media (n=6, +EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).
- Figura 36.** Área bajo la curva del tercer periodo (fase de granulación). **77**
Los valores corresponden a la media (n=6, +EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (* $p < 0.05$).
- Figura 37.** Área bajo la curva del cuarto periodo (fase de maduración). **82**
Los valores corresponden a la media (n=6, +EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).
- Figura 38.** Velocidad de cicatrización de los diferentes grupos experimentales durante 13 días destacando los días correspondientes a las fases de cicatrización: A) Representación de la velocidad de cicatrización de los grupos de fracciones F1-F4, B) Representación de la velocidad de cicatrización de los grupos de fracciones F5-F8, C) Representación de la velocidad de cicatrización de los grupos de fracciones F9-F11, D) Comparación de la velocidad de cicatrización del grupo de fracción con mayor velocidad (F2) con el control positivo (KitosCell), control negativo, vehículo (crema base) y Extracto integro (EaBxb). **85**
- Figura 39.** Producción de citocinas proinflamatorias: A) TNF- α , B) IFN- γ y C) IL-6 de la fracción más activa (F-2 Bxb) y el control negativo (CN) sin tratamiento. Los valores corresponden a la media (n=5, +EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). **87**



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



- Figura 40.** Producción de citocinas antiinflamatorias: A) IL-4, B) IL-5 y C) IL-10 de la fracción más activa (F-2 *Bxb*) y el control negativo (CN) sin tratamiento. Los valores corresponden a la media (n=5, +EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).
- Figura 41.** Balance de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α e IFN- γ /IL-10 de la F-2 y el CN.



LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Descripción de las principales funciones de la piel.	12
Tabla 2. Principales factores de crecimiento durante la cicatrización.	18
Tabla 3. Algunas de las plantas con comprobado efecto cicatrizante.	33
Tabla 4. Plantas medicinales pertenecientes a la familia nyctaginaceae con actividad cicatrizante.	37
Tabla 5. Actividad farmacológica de los componentes químicos identificados en <i>B. x buttiana</i> por GC-MS.	38
Tabla 6. Composición de la crema base utilizada como vehículo.	47
Tabla 7. Sistemas empleados como fase móvil para la obtención de los diferentes grupos de fracciones obtenidos del extracto de acetona de <i>B. x buttiana</i> .	52
Tabla 8. Agrupaciones de cada una de las fracciones de acuerdo con la TLC.	54
Tabla 9. Peso y rendimiento del extracto de acetona de <i>B. x buttiana</i> y de sus grupos de fracciones.	55
Tabla 10. Diseño experimental para la evaluación tópica de los diferentes tratamientos problema.	68
Tabla 11. Porcentaje de contracción de la herida de cada uno de los grupos experimentales.	80
Tabla 12. Significado de los valores obtenidos como resultado del análisis del balance con IL-10.	93



RESUMEN

La cicatrización es un proceso normal en respuesta a una lesión cutánea. Cuando se produce una herida se genera una discontinuidad del epitelio activándose una serie de mecanismos celulares y moleculares en diferentes fases destinadas a la reparación del tejido dañado^{1,2}. A pesar de los diferentes tratamientos farmacológicos empleados para las heridas, el empleo de plantas con propiedades medicinales sigue siendo una alternativa por parte de los pacientes, en este contexto, *Bougainvillea x buttiana* es una especie híbrida a la cual se le atribuyen diferentes usos en la medicina tradicional, como: efecto analgésico, antihistamínico, antigripal, contra la gastritis y ulcera gástrica, esto se debe principalmente a la presencia de compuestos con diferentes actividades farmacológicas^{3,4}. En este sentido el presente trabajo evaluó el efecto cicatrizante de *B. x buttiana* (Var. Rosa) a partir del extracto de acetona en modelo murino, del cual se realizó un fraccionamiento primario en columna abierta obteniendo 11 grupos de fracciones, durante la cinética de cicatrización se observó el comportamiento de los diferentes grupos experimentales durante un periodo de 13 días, destacando la fracción 2 la cual a partir del día 5 el presenta una disminución significativa en comparación con los demás grupos experimentales. Adicionalmente se realizaron estudios en TLC y HPLC para determinar los componentes de los diferentes grupos de fracciones y la determinación de diferentes interleucinas pro y antiinflamatorias para poder conocer el comportamiento de las fracciones. Este estudio determinó que la fracción 2 de el extracto cetónico de *Bougainvillea x buttiana* tiene un potencial efecto cicatrizante en heridas cutáneas, de tal manera que podría considerarse como un potencial fitomedicamento.



ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
ÍNDICE GENERAL.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1. ANATOMÍA DE LA PIEL.....	6
2.2. EPIDERMIS	7
2.2.1. CAPAS DE LA EPIDERMIS.....	7
2.2.2. CÉLULAS DE LA EPIDERMIS	9
2.3. DERMIS.....	9
2.3.1. COMPONENTES DE LA DERMIS:.....	9
2.4. HIPODERMIS	11
2.5. FUNCIONES DE LA PIEL	11
2.6. HERIDAS CUTÁNEAS.....	13
2.6.1. CLASIFICACIÓN DE LAS HERIDAS	14
2.7. CICATRIZACIÓN	16
2.7.1. GENERALIDADES	16
2.7.2. FASE DE COAGULACIÓN	18
2.7.3. FASE DE INFLAMACIÓN.....	20
2.7.4. FASE DE PROLIFERACIÓN	24
2.7.5. MADURACIÓN	28
2.8. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	31
2.9. TRATAMIENTO HERBOLARIO	31
2.10. PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO.....	34
2.11. GENERALIDADES DE <i>Bougainvillea x buttiana</i>	34
2.11.1. CARACTERÍSTICAS	34
2.11.2. TAXONOMÍA.....	35



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



2.11.3. DISTRIBUCIÓN.....	36
2.11.4. PLANTAS MEDICINALES CON ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LA FAMILIA Nyctaginaceae	36
2.11.5. ANTECEDENTES ETNOMEDICOS	37
2.11.6. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS.....	38
2.11.7. ANTECEDENTES FARMACOLOGICOS.....	38
3. OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVO GENERAL	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. JUSTIFICACIÓN	41
5. HIPÓTESIS	42
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
6.1. REACTIVOS	43
6.2. EQUIPO.....	43
6.3. MATERIAL VEGETAL.....	43
6.4. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETONA DE <i>B. x buttiana</i>	44
6.5. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA DEL EXTRACTO DE ACETONA.....	44
6.6. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).....	45
6.7. EVALUACIÓN TÓPICA DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE	45
6.7.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS	45
6.7.2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS HERIDAS CUTÁNEAS	46
6.7.3. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA CONTRACCIÓN DE HERIDAS	47
6.7.4. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CICATRIZACIÓN.....	48
6.8. CUANTIFICACIÓN DE LAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ Y LAS INTERLEUCINAS IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 DE LA FRACCIÓN CON MAYOR ACTIVIDAD MEDIANTE ELISA	48
6.8.1. OBTENCIÓN DEL SUERO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS.....	48
6.8.2. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS POR EL MÉTODO ELISA	50
6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
7.1.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE ACETONA Y FRACCIONES DE <i>Bougainvillea x buttiana</i>	51
7.2.	ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE LAS FRACCIONES Y EL EXTRACTO INTEGRO DE <i>Bougainvillea x buttiana</i>	52
7.2.1.	RENDIMIENTO DEL EXTRACTO DE ACETONA DE <i>Bougainvillea x buttiana</i> Y LOS GRUPOS DE FRACCIONES	54
7.2.2.	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA DE LOS GRUPOS DE FRACCIONES	56
7.2.3.	ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) DE LOS GRUPOS DE FRACCIONES	61
7.3.	EVALUACIÓN TÓPICA DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE <i>Bougainvillea x buttiana</i> Y LAS FRACCIONES OBTENIDAS	68
7.3.1.	CINÉTICA DE CICATRIZACIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	70
7.3.2.	EVALUACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DE LAS HERIDAS	80
7.3.3.	EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS HERIDAS	81
7.3.4.	DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CICATRIZACIÓN	83
7.4.	DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS: TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 DEL GRUPO EXPERIMENTAL CON MAYOR EFECTO CICATRIZANTE ...	86
7.4.1.	BALANCE DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (TNF- α , IFN- γ e IL-6) / IL-10	93
8.	CONCLUSIONES	97
9.	PERSPECTIVAS	98
10.	REFERENCIAS	99



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



1. INTRODUCCIÓN

En la piel, la epidermis, es la capa superficial la cual se encuentra en constante renovación celular, con células que se encuentran reproduciéndose desde el estrato basal y que proliferan a la superficie. Cuando se produce una herida, se genera una discontinuidad del epitelio, de tal manera que existe una pérdida de células que rodean esa discontinuidad. De esta manera, las células, al reproducirse, ocupan el espacio libre a su alrededor el cual va recubriendo el lecho de la herida. De esta manera, el proceso de epitelización el cual concluye con la cicatrización se inicia desde el momento en el cual se genera la herida⁵.

La cicatrización es un proceso normal en respuesta a una lesión cutánea, dentro de las cuales podemos encontrar dos tipos de lesiones: agudas y crónicas. En la cicatrización se activan una serie de mecanismos destinados a la reparación de los tejidos dañados, este proceso involucra diferentes fases en las que intervienen distintos tipos de células, procesos celulares y moléculas⁶.

Las fases de la cicatrización se caracterizan principalmente por una serie de eventos interconectados en los cuales cada fase se genera de forma continua. En la fase 1 su principal objetivo es generar una hemostasia y coagulación de manera inmediata sobre la herida, la fase dos se caracteriza por la migración de neutrófilos atraídos por factores quimioatrayentes los cuales tienen como objetivo eliminar agentes externos o patógenos que impidan la cicatrización de la herida, en la fase tres se forma una matriz extracelular provisional la cual permite la proliferación de los fibroblastos y diferentes componentes celulares que permiten la epitelización de la herida, adicionalmente se genera el proceso de angiogénesis, de esta manera se genera la fase de maduración, la cual, se caracteriza por la formación de la contracción de la herida en la cual se establece la elasticidad y tamaño de la cicatriz⁷.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



A pesar de las diferentes alternativas quirúrgicas existentes y el tratamiento farmacológico comúnmente empleado en heridas, úlceras y diversas afecciones en la piel causadas en la mayoría de los casos por estados patológicos o como consecuencia de algún tipo de traumatismo, el empleo de plantas con propiedades medicinales sigue siendo una alternativa por parte de los pacientes, en este contexto, *Bougainvillea x buttiana* es una especie híbrida la cual es obtenida a partir de la cruce de *B. glabra* y *B. peruviana*, esta planta es ampliamente distribuida en México y los principales usos en la medicina tradicional que se le atribuyen, son principalmente como: analgésico, antiasmático, mucolítico, antigripal, contra la gastritis y úlcera gastroduodenal⁸. En este sentido el presente trabajo pretende evaluar el efecto cicatrizante de *B. x buttiana* (Var. Rosa) a partir del extracto de acetona y las fracciones obtenidas a partir del extracto integro.



2. ANTECEDENTES

2.1. ANATOMÍA DE LA PIEL

En los mamíferos la piel, es el órgano más grande el cual comprende alrededor de 2 m², funcionalmente sirve como protección contra daños mecánicos, termorregulación, como órgano sensorial y evita la pérdida de agua. La piel está compuesta de tres capas principales (Figura 1): La epidermis que comprende la superficie de la piel (capa epitelio), la dermis (capa de tejido conectivo cuyo grosor varía según la región corporal) y la hipodermis profunda también llamada capa adiposa subcutánea⁹.

Dentro de la piel podemos encontrar diversas estructuras como: apéndices (folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas), nervios, células inmunitarias, células productoras de melatonina, corpúsculos sensoriales, musculo liso y vasculatura, cabe destacar que la epidermis es la capa que constantemente se está restaurando durante el proceso de reepitelización, mientras que la dermis e hipodermis participan en procesos como: apoyo nutricional y mecánico, suministrando células progenitoras para la regeneración y restauración de la epidermis^{9,10}.

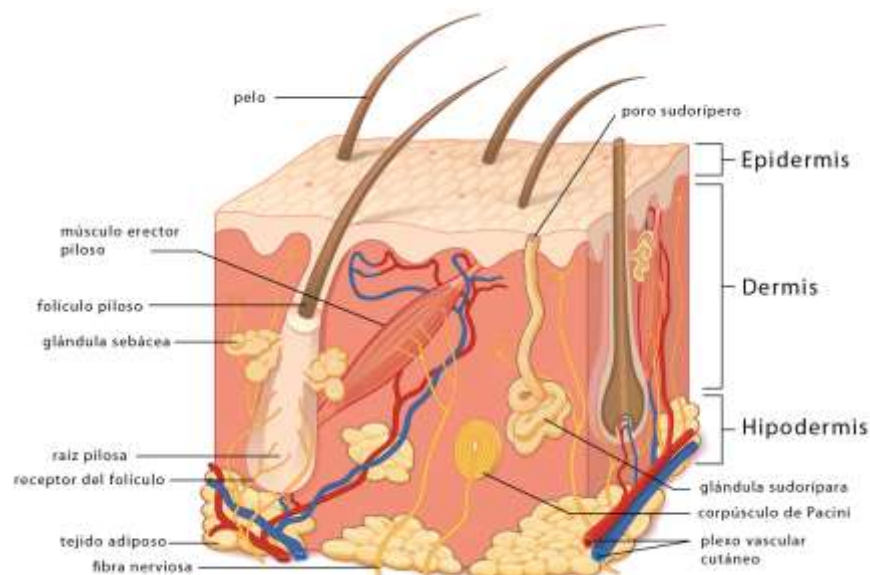


Figura 1. Capas y componentes de la piel humana¹⁰.



2.2. EPIDERMIS

Es un epitelio estratificado plano o escamoso que cubre la totalidad de la superficie corporal, presenta un espesor de 0.1 mm, pudiendo alcanzar en zonas como la planta de los pies y las palmas de las manos espesores de hasta 1 ó 2 mm. Esta normalmente compuesta por cuatro o cinco capas diferenciadas que van del exterior al interior de la piel, dentro de las cuales podemos encontrar diferentes tipos celulares^{11,12} (Figura 2).

2.2.1. CAPAS DE LA EPIDERMIS

1. Estrato basal o germinativo, es una capa simple de células cuboidales o columnares, dentro de la cual podemos encontrar células madre o progenitoras, melanocitos y células de Merkel. Las células progenitoras forman queratinocitos que van subiendo hacia la superficie y se van incorporando en la capa más superficial, otras células progenitoras emigran a la dermis y dan lugar a las glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas y folículos pilosos¹².
2. Estrato espinoso, contiene entre 8 y 10 capas celulares unidas entre sí por desmosomas, en esta capa las proyecciones largas de los melanocitos se extienden entre los queratinocitos, a los que transfieren melanina¹².
3. Estrato granuloso, contiene entre 3 y 5 capas de células aplanadas que fabrican una sustancia precursora de la queratina, los núcleos de estas células se encuentran en varias fases de degeneración, a medida que los núcleos degeneran las células van perdiendo sus funciones metabólicas y mueren¹².
4. Estrato lucido, contiene entre 3 y 5 capas de células planas muertas que contienen una sustancia precursora de la queratina o la propia queratina, este estrato solo se encuentra en la epidermis palmar de las manos y plantas de los pies¹².



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



5. Estrato corneo o queratinizado, contiene entre 25 y 30 capas de células planas muertas, completamente rellenas de queratina, este estrato sirve como una barrera contra la luz, bacterias y compuestos químicos, además la queratina hace a la epidermis impermeable al agua. En el proceso de queratinización, las células queratinizadas superficiales se descaman continuamente al exterior y son reemplazadas por células que proceden de la actividad mitótica de células de los estratos profundos, que son desplazadas a niveles sucesivamente más externos y van elaborando queratina que se va acumulando hasta que reemplazan totalmente el citoplasma hasta que desaparece y la célula muere. El proceso total que siguen las células desde su origen en la capa basal hasta que se descaman en el exterior es alrededor de 2 a 4 semanas^{11,12}.

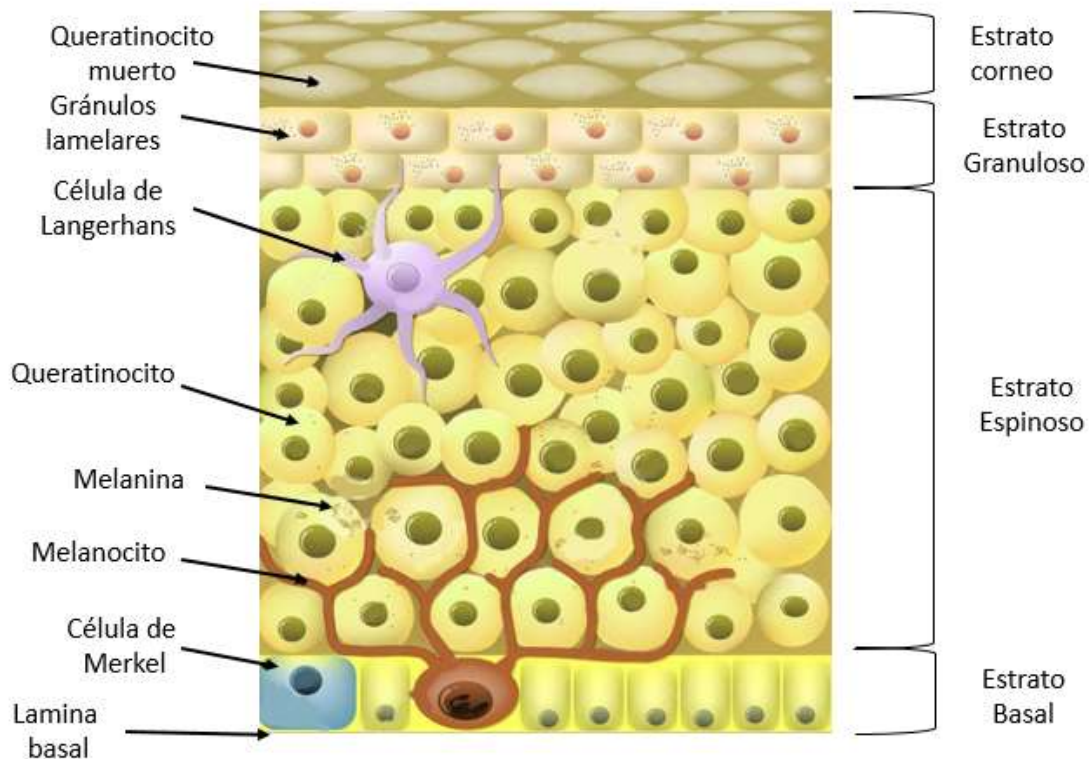


Figura 2. Células de la epidermis^{11,12}.



2.2.2. CÉLULAS DE LA EPIDERMIS

1. Queratinocitos, que constituyen alrededor del 90% de las células epidérmicas, los cuales son capaces de producir la queratina (proteína fibrosa) que tiene efecto protector sobre la piel¹².
2. Melanocitos, que constituyen el 8% de las células epidérmicas, los cuales son capaces de producir melanina (pigmento marrón-negro) que contribuye al color de la piel y absorbe la luz UV¹².
3. Células de Langerhans, que derivan de la medula ósea y emigran a la epidermis en donde intervienen en la respuesta inmune de la piel debido a que son macrófagos¹².
4. Células de Merkel, se encuentran en la capa más profunda o estrato basal, las cuales se encuentran ligadas a los queratinocitos por desmosomas, estas células hacen contacto con las terminales neuronales sensitivas e intervienen en la sensación del tacto¹².

2.3. DERMIS

Es la capa que se encuentra situada por debajo de la epidermis, esta se encuentra constituida principalmente de tejido conectivo el cual consta principalmente de tres tipos de células: células colágenas, células elásticas y células reticulares, además de la presencia de sustancia fundamental (Figura 3)¹³.

2.3.1. COMPONENTES DE LA DERMIS:

1. Fibras colágenas. Son las células más numerosas, la disposición y grosor varían dependiendo su localización. En la dermis superficial o papilar, se van a localizar células en forma de fibra, delgadas, en comparación con la dermis media y profunda, en las cuales, las células son más gruesas y se disponen en forma de haces hacia la superficie de la epidermis^{13,14}.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



2. Fibras elásticas. Pueden ser visualizadas con la ayuda de orceína o fucsina, son células en forma de fibra, delgadas y su grosor al igual que las fibras de colágeno varía de acuerdo a su localización, delgadas en la dermis superficial y gruesas en la dermis profunda^{13,14}.
3. Fibras reticulares. Su tamaño es de alrededor de 0.2 – 1 μm , se caracterizan por ser un tipo especial de fibras colágenas del tipo III¹³.
4. Sustancia fundamental. Está compuesta por glucosa-aminoglicanos o mucopolisacáridos ácidos^{13,14}.

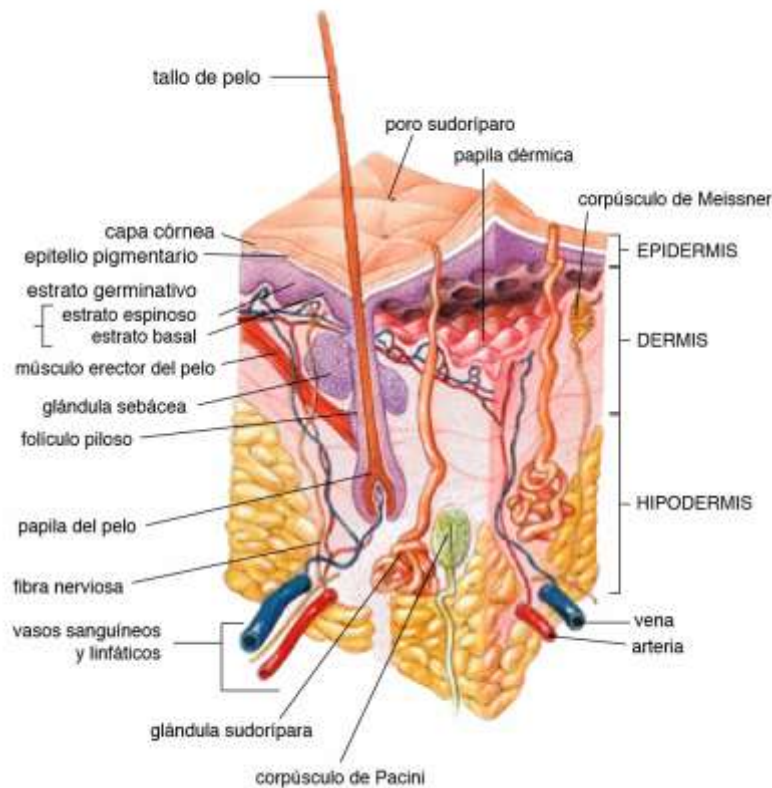


Figura 3. Composición de la dermis¹³.



2.4. HIPODERMIS

La hipodermis, panículo adiposo o tejido celular subcutáneo, es la capa más profunda y está constituida principalmente por adipocitos llenos de lípidos, los cuales están dispuestos en lóbulos separados por tejido conectivo y reciben el nombre de septos o tabiques interlobulillares. Su principal función es la de aislante térmico y reserva nutritiva (Figura 4)^{13,15}

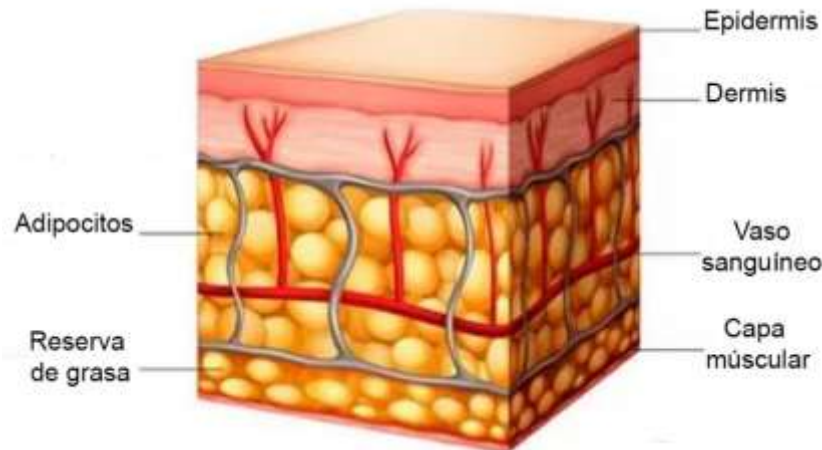


Figura 4. Composición de la hipodermis¹⁵.

2.5. FUNCIONES DE LA PIEL

La piel es un órgano que desempeña una gran variedad de funciones, dentro de las cuales podemos destacar su función protectora, termorreguladora, sensitiva, secretora, inmunológica, producción de vitamina D y excretora¹⁶. Las cuales son descritas en la Tabla 1.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Tabla 1. Descripción de las principales funciones de la piel¹⁶.

FUNCIÓN	CARACTERÍSTICAS
Protección	Esta función es proporcionada por la composición y textura de la piel, la cual protege a órganos internos de traumatismos mecánicos, físicos (radiación UV) y químicos, al mismo tiempo que evita la pérdida de agua y electrolito. Las principales capas que intervienen son los estratos dérmicos e hipodermis, que actúan como cojines que actúan como barrera contra los diferentes tipos de daño.
Termorregulación	En los procesos de vasodilatación y vasoconstricción, los plexos vasculares aumentan o disminuyen la temperatura de la piel con la ayuda de la secreción de sudor.
Sensación	Los receptores sensoriales libres transmiten al cerebro mediante los cordones medulares dorsales los diferentes tipos de señales sensitivas, las cuales principalmente son: tacto, presión, vibración, temperatura, dolor y prurito.
Secreción	Existen diferentes tipos de glándulas que permiten la secreción, estas pueden ser ecrinas (glándulas sudoríparas), apocrina (glándulas mamarias) y holocrinas (glándulas sebáceas).
Inmunológica	Los queratinocitos participan activamente en el sistema inmune al igual que las células de Langerhans y linfocitos T, los cuales producen citosinas que intervienen en la defensa cutánea.
Producción de vitamina D	En condiciones normales, la piel, transforma el 7-dehidrocolesterol a calcitrol (1,25-dihidroxivitamina D ₃) mediante la radiación UVB.
Excreción	Existen determinadas situaciones patológicas, en las cuales se pueden perder elementos constitutivos del epitelio (azufre y proteínas) o algún tipo de anomalía que conduzca la pérdida de agua.



2.6. HERIDAS CUTÁNEAS

El ser humano se encuentra constantemente susceptible a presentar algún tipo de herida durante cualquier etapa de su vida. Podemos definir a las heridas como traumatismos mecánicos abiertos, esto quiere decir que una herida es producida por algún tipo de agente externo que actúa de manera brusca en alguna zona del organismo, de tal manera que supera la resistencia del tejido sobre el cual actúa, produciendo una apertura de la superficie cutánea o mucosa^{1,2}.

Por otra parte, la piel al poseer un origen embriológico ectomesodérmico, está relacionada con todos los órganos y sistemas del cuerpo humano, de esta manera, que si se generara algún tipo de herida de manera espontánea, la piel funcionaría como el reflejo todas esas alteraciones sistémicas que se produzcan en el organismo, permitiendo generar marcadores dermatológicos bien reconocidos que permitan realizar el diagnóstico de algún tipo de enfermedad¹⁷.

En este sentido, una herida es una región anatómica en la que queda interrumpida la continuidad celular, en la que se genera una alteración metabólica continua que puede durar semanas, meses o incluso años. El mecanismo molecular que se genera en las heridas se caracteriza por un estado de inflamación predominante en el cual participan principalmente polimorfonucleares (PMN) y macrófagos (MF) (Figura 5). Las células inflamatorias son las encargadas de la generación de citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α e IL6) y un microambiente rico en proteasas y prooxidantes. El incremento de la actividad proteolítica (elastasa de neutrófilos, MMP-8 y gelatinasa) conduce a la degradación de factores de crecimiento y proteínas estructurales de la matriz extracelular determinantes para la reparación. El aumento de ROS (H₂O₂, O₂) puede ocasionar daño directo a las células o moléculas de la matriz extracelular. Los componentes bacterianos (proteína de adherencia extracelular (Eap) y péptidos de formilmetionilo) pueden contribuir a los mecanismos de reparación deteriorados por interferencia con las interacciones célula-matriz o promoviendo la respuesta inflamatoria¹⁸. Sin embargo, en respuesta a la herida existe un proceso de cierre de forma normal denominado cicatrización⁷.

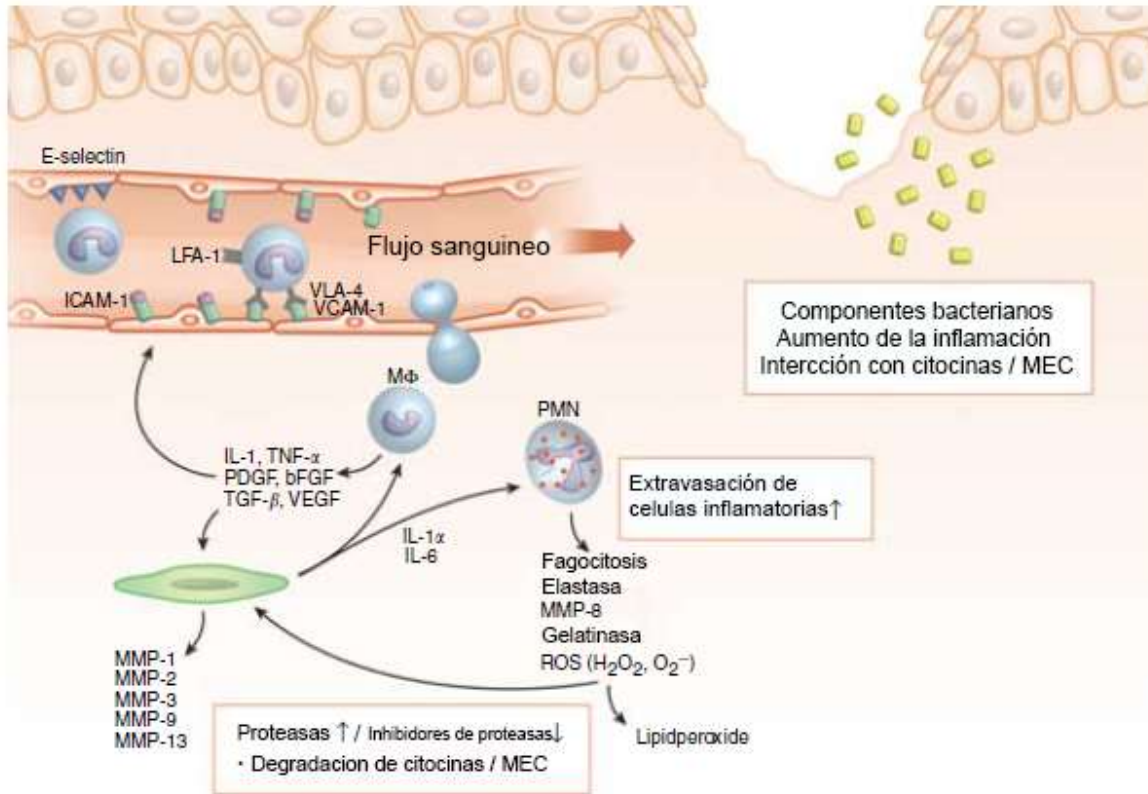


Figura 5. Modelo del mecanismo molecular y celular que se genera en las heridas cutáneas ¹⁸.

2.6.1. CLASIFICACIÓN DE LAS HERIDAS

De acuerdo con la Organización mundial de la salud en su guía para cirugías segura del 2009, se estimó que en 2004 cerca de 56 países realizaron alrededor de 187–281 millones procesos quirúrgicos, los cuales equivalen a 1 intervención por cada 25 humanos vivos. Esto significa un gran volumen de heridas generadas a pacientes en la cual la tasa de mortalidad fue del 0.4--0.8% de los casos por complicaciones de estas después de la cirugía, estos casos son relacionadas por infecciones y otras complicaciones. Adicionalmente pudo determinarse que la mitad de estos eventos eran prevenibles si se hubiera llevado un mejor tratamiento y cuidado de la herida ¹⁹.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En este sentido es importante clasificar e identificar las características de las herida para poder evitar algún tipo de infección y poder actuar de manera oportuna con el tratamiento adecuado, de acuerdo con la guía clínica para la prevención de infecciones del sitio operat del Centro de Control de Enfermedades de estados Unidos de Norteamérica (CDC) las heridas se pueden clasificar 4 tipos:

1. HERIDA LIMPIA

Son aquellas que no son traumáticas y no tienen por qué contaminarse, es decir, se origina durante una cirugía electiva. Se mantienen técnicas asépticas y la exposición a microorganismos está estrictamente controlada, de esta manera, no se presentan signos de inflamación o de infección²⁰. Afecta únicamente tejido sano, sin compromiso del sistema gastrointestinal, biliar, respiratorio ni genitourinario. Las heridas limpias cierran de manera espontánea (por primera intención), drenando sólo en caso necesario a un sistema cerrado. El riesgo de infección en este tipo de heridas es mínimo (menor al 2%), independientemente a la presencia de microorganismos en el medio ambiente o en el material quirúrgico que se utilizó y, principalmente, por la colonización de la piel^{21,22}.

2. HERIDA LIMPIA CONTAMINADA

Son aquellas en la que se da una apertura del tubo digestivo, tracto respiratorio o tracto urinario, los cuales son cavidades colonizadas por macroorganismos, de tal manera, que estos pueden producir una infección al contacto con la herida, por lo que se consideran heridas potencialmente contaminadas²⁰. Estos procesos se realizan bajo control en un ambiente estéril, pero puede ocurrir contaminación, habitualmente por bacterias endógenas del propio paciente. Aunque no aparece infección ni secreción, puede haber derrame de contenidos o transgresión mínima de la técnica aséptica. El riesgo de infección en este tipo de heridas oscila entre 2 y 10%. Es fundamental emplear estrategias de prevención; por ejemplo, considerar la profilaxis antibiótica. Se puede considerada como herida limpia no contaminada la reoperación de una herida limpia antes de los 7 días^{21,22}.



3. HERIDA CONTAMINADA

Son aquellas en las cuales existe una contaminación en el sitio de la herida. Inicialmente se genera inflamación no purulenta sin signos de infección. Además, puede ocurrir inflamación en algún órgano cercano o escape macroscópico del contenido de alguna víscera²⁰. Este tipo de heridas pueden tener origen traumático (con menos de 4 horas desde ocurrido el evento y, por ende, exposición a microorganismos), o puede ser secundaria a una transgresión de la técnica aséptica. El riesgo de infección en estas heridas es de 13 a 20%, aun aplicando las estrategias de prevención y la profilaxis antibiótica^{21,22}.

4. HERIDA SUCIA O INFECTADA

Son aquellas en las que se da la presencia de infección e inflamación aguda, con contenido purulento²⁰. Pueden ser como consecuencia a la presencia de tejido desvitalizado antiguo o un cuerpo extraño en el caso de las heridas traumáticas, así como también generadas por una perforación de vísceras (gastrointestinal, biliar, orofaríngea, traqueobronquial), por contaminación con contenido fecal o debido a una falla en alguna técnica aséptica. Se presenta cuando ha transcurrido un tiempo crítico (mayor de 4 horas), lo que permite el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, provocando una infección. Los patógenos más frecuentes en este tipo de herida son los propios de la infección activa. Además de la profilaxis, está indicado el tratamiento antibiótico. La herida puede presentarse con exudado purulento, enrojecimiento y dolor; eventualmente, se acompaña de leucocitosis y fiebre^{19,22}.

2.7. CICATRIZACIÓN

2.7.1. GENERALIDADES

El ser humano, durante toda su vida, sufre diferentes tipos de lesiones en la piel, de las cuales la mayoría pasan desapercibidas debido a que son generalmente procesos de recuperación rápidos y sin acontecimientos notables, los cuales son fundamentales para la supervivencia debido a que evitan la deshidratación e infecciones²³.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Por otra parte, existen daños generados en la piel que le provocan una mayor severidad y una recuperación tardía ocasionados por factores externos o exógenos como las quemaduras y/o factores internos o endógenos relacionados a alguna patología como la deficiencia del sistema inmune o la diabetes¹⁰. En este sentido, la cicatrización se caracteriza por ser un proceso endógeno normal que se produce para reparar el tejido epidérmico y dérmico perdido, generando una cascada de eventos bioquímicos dependiente de la dinámica celular del tejido afectado y circundante, uno de los objetivos principales de estas células es tratar de eliminar de la herida detritos o componentes bacterianos que pueden impedir que se favorezca el proceso de cicatrización (Figura 6), la liberación de factores de crecimiento y citocinas son esenciales para llevar a cabo la reparación en las tres fases de la cicatrización y la maduración^{24,25}.

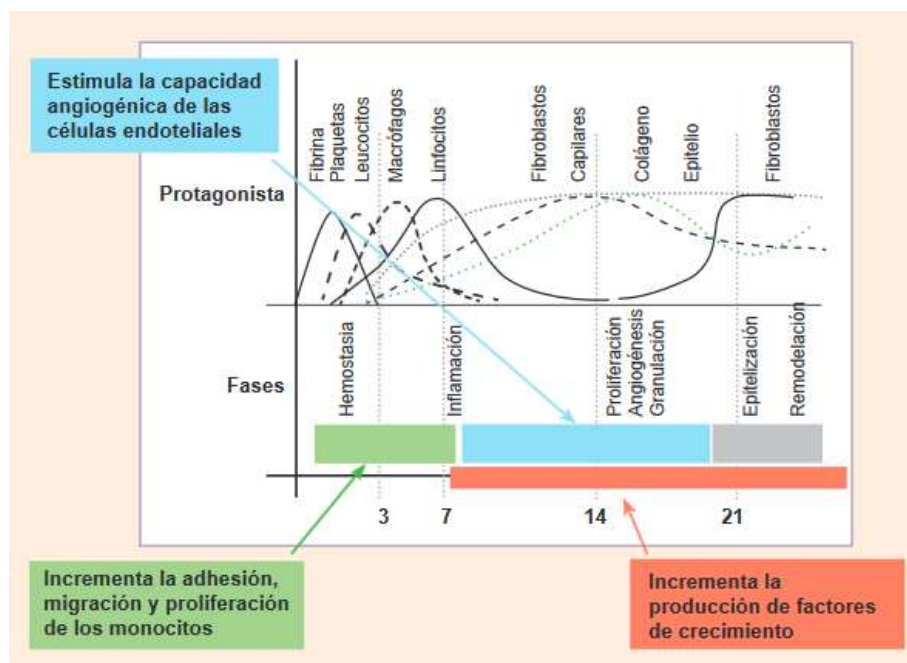


Figura 6. Fases de la cicatrización y sus principales células involucradas en cada una de ellas^{24,25}.

De esta manera podemos entender a la cicatrización como un conjunto de fases interconectadas y dependientes de la acción celular en la que intervienen diferentes factores que estimulan el crecimiento (Tabla 2), reparación y remodelación del tejido afectado, permitiéndole el restablecimiento de sus características físicas y fisiológicas normales^{26,27}.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Tabla 2. Principales factores de crecimiento durante la cicatrización^{26,27}.

FACTOR DE CRECIMIENTO	CÉLULAS PRODUCTORAS	ACTIVIDAD
TGF β	Plaquetas, macrófagos, linfocitos, fibroblastos	Proliferación de los fibroblastos y de las células endoteliales, síntesis de matriz extracelular
PDGF	Plaquetas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos	Migración y proliferación de los fibroblastos, síntesis de colágeno.
bFGF (FGF2)	Queratinocitos, fibroblastos, plaquetas	Angiogénesis y epitelización
VEGF	Queratinocitos, macrófagos, plaquetas	Angiogénesis
KGF (FGF 7)	Fibroblastos	Migración y proliferación de queratinocitos
EGF	Plaquetas, queratinocitos, macrófagos	migración y proliferación de queratinocitos, proliferación de células endoteliales y de los fibroblastos

TGF: Factor de crecimiento transformante; PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, bFGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos básico, EGF: Factor de crecimiento epidérmico, KGF: Factor de crecimiento de los queratinocitos, VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

2.7.2. FASE DE COAGULACIÓN

La fase de coagulación o hemostasia comienza una vez que se presenta una lesión y se altera la integridad del tejido, teniendo una duración de hasta 15 minutos. Cuando se provoca una ruptura vascular se generan mecanismos de coagulación y de agregación plaquetaria, los cuales, su principal objetivo es evitar la pérdida de flujo sanguíneo mediante la interrupción de la hemorragia, dando como resultado la



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



formación de un coágulo. El colágeno y la trombina son sustancias que contribuyen a la agregación y activación de las plaquetas incluidas en el coágulo (Fig. 7)^{26,27}.

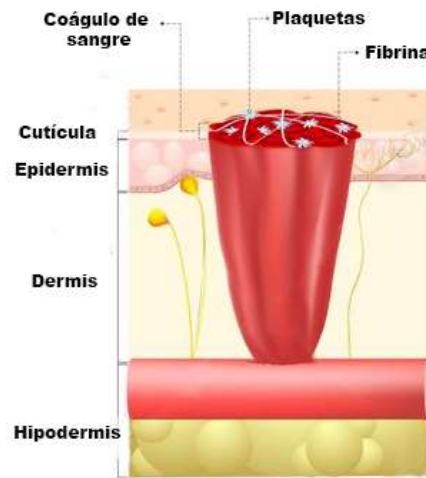


Figura 7. Representación de la fase de coagulación²⁷.

En esta fase se dan diferentes acontecimientos celulares, de los cuales, uno de ellos parte de los gránulos de las plaquetas activadas de donde son liberados lisosomas y cuerpos densos de proteínas tales como la trombospondina, la fibronectina, el factor plaquetario 4 (PF-4), proteasas y metabolitos del ácido araquidónico. De igual manera, la extravasación sanguínea aporta otro grupo de proteínas como: fibrinógeno, fibronectina, trombospondina, vitronectina, trombina y el factor de von willebrand, que dan lugar a la formación del coágulo de fibrina, garantizando la hemostasia²⁶.

El coágulo es una matriz dinámica de proteínas y células que contribuyen a la hemostasia, sirven como un escudo protector temporal para la herida, actúan como una red para las células inflamatorias entrantes y proporcionan un reservorio de citocinas/factores de crecimiento. Las plaquetas son una de las primeras fuentes de citocinas que median la activación de macrófagos y la quimiotaxis. Una vez atrapadas en la red de fibrina, las plaquetas liberan gránulos que funcionan como un reservorio de proteínas biológicamente activas (RANTES o CCL5)²⁸, trombina, factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)²⁸.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Estas proteínas de liberación temprana actúan como quimioatrayentes para varias células inflamatorias, incluidos los monocitos²⁹. CCL5 es uno de los quimioatrayentes monocitos más importantes liberados por las plaquetas después de la lesión. Otras citocinas y quimiocinas importantes que atraen los monocitos al lecho de la herida son MCP-1 (CCL2), MIP-1 (CCL3), TGF, fibronectina, elastina, C5a, C3a, factor de crecimiento nervioso y componentes de ECM también.

Un mediador importante y temprano de la coagulación liberada por las plaquetas es la trombina³⁰. La trombina es una serina proteasa que juega un papel importante en la hemostasia después de una lesión tisular al convertir el fibrinógeno de plasma soluble en un coágulo fibroso insoluble y al promover la agregación plaquetaria³⁰. La trombina no solo media la formación de coágulos, sino que también juega un papel en la inflamación. Los efectos proinflamatorios de la trombina incluyen la estimulación de la vasodilatación responsable de la extravasación plasmática, el edema y una mayor expresión de adhesión endotelial e infiltración de monocitos. La trombina también estimula la liberación de citocinas proinflamatorias, como CCL2, IL-6 e IL-8 por las células endoteliales, que inducen la quimiotaxis de monocitos³¹. Además, estas citocinas producidas dan como resultado la diferenciación de monocitos en macrófagos M1³².

2.7.3. FASE DE INFLAMACIÓN

La fase de inflamación inicia en el minuto 16 y tiene una duración de hasta 6 días, se caracteriza por ser una respuesta protectora, la cual intenta destruir o aislar los agentes que representen algún peligro para el tejido, y así dar paso finalmente a la formación de nuevo tejido mediante la activación de los queratinocitos y fibroblastos (Figura 8)²⁷

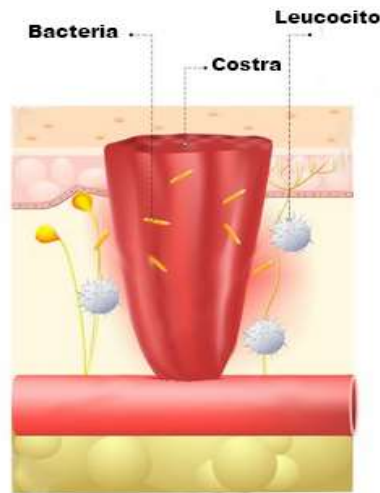


Figura 8. Representación de la fase de inflamación^{26,27}.

La hemostasia y la liberación de sustancias que atraen a las células inmunes fagocíticas pueden marcarse como el inicio de la fase inflamatoria (Figura 9). El reclutamiento de células inmunes se facilita a través de las quimiocinas, la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Inicialmente, los vasos sanguíneos se contraen para garantizar la hemostasia.

En una etapa posterior, estos vasos se dilatan, que alcanza su punto máximo 20 minutos después de la generación de la herida. El principal factor responsable de la vasodilatación es la histamina, la cual hace que las paredes de los vasos sanguíneos se vuelvan porosas, lo que posteriormente conduce a una extravasación adicional de células inflamatorias en el área de la herida. La función inicial y principal de las células inflamatorias en la lesión es proporcionar una defensa específica y no específica contra los patógenos³³.

Las primeras células que participan en la herida son los polimorfonucleares, o neutrófilos, que eliminan partículas extrañas y bacterias del área de la herida. En la piel, los neutrófilos aparecen en el lecho de la herida pocas horas después de la lesión. Después de ejercer su función, los neutrófilos se destruyen con la o los macrófagos los fagocitan^{34,35}.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Así, el reclutamiento de monocitos a la herida en la cicatrización normal también puede proceder cuando se agotan los neutrófilos. Sin embargo, los neutrófilos son una fuente importante de varias citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6 y TNF- α , que pueden estimular los monocitos recién atraídos para diferenciarse en macrófagos M1³⁶. Los monocitos migran a través de la pared del vaso en respuesta a estímulos quimiotácticos. La migración de monocitos transendoteliales comienza con el contacto inicial de los monocitos con el endotelio vascular, mediado por moléculas de adhesión de la familia selectina, sus ligandos de carbohidratos o por 4 integrinas³⁷.

Este contacto da como resultado una unión débil de monocitos al endotelio e inicia la cascada de adhesión. Posteriormente, las selectinas, que son proteínas de la superficie celular, interactúan con los ligandos de glucoproteína en los monocitos, lo que les permite unirse a las células endoteliales³⁷. El monocito rodante es luego estimulado por las citocinas y las quimiocinas, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), expresada por las células endoteliales. Esto da como resultado una adhesión firme a la pared endotelial, seguida de transmigración en el sitio de la herida. Los monocitos migran a lo largo de gradientes quimiotácticos definidos y se acumulan dentro de las áreas hipóxicas avasculares del lecho de la herida. Con sus receptores de integrina y selectinas, se unen a proteínas específicas, como las CAM de la matriz extracelular³⁸. Después de la migración a la MEC, los monocitos son estimulados por varias citocinas como IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-13, producto bacteriano como LPS y componentes de MEC para diferenciarse en macrófagos, que alcanzan su punto máximo aproximadamente 42 horas después de la herida. Los monocitos que emigran a la herida generalmente desarrollan un fenotipo inflamatorio o desbridante, dependiendo de las señales generadas en el tejido circundante³⁹.

Los macrófagos importantes en la eliminación de células senescentes y desechos dentro de la herida. En caso de propagación de patógenos en el lecho de la herida, los macrófagos fagocitan estos patógenos y presentan antígenos a las células T.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Los macrófagos implicados en la eliminación de células o tejido muerto sufren apoptosis. Los macrófagos que sobreviven y no sufren apoptosis, permanecen en el área del lecho de la herida y ejercen otras funciones que influyen en el proceso de curación de la herida, como la estimulación de la producción de colágeno, la angiogénesis y la reepitelización⁴⁰. Como tal, los macrófagos juegan un papel fundamental en la transición de la fase inflamatoria a la fase proliferativa en la que coordinan y mantienen los eventos de curación de heridas⁴¹.

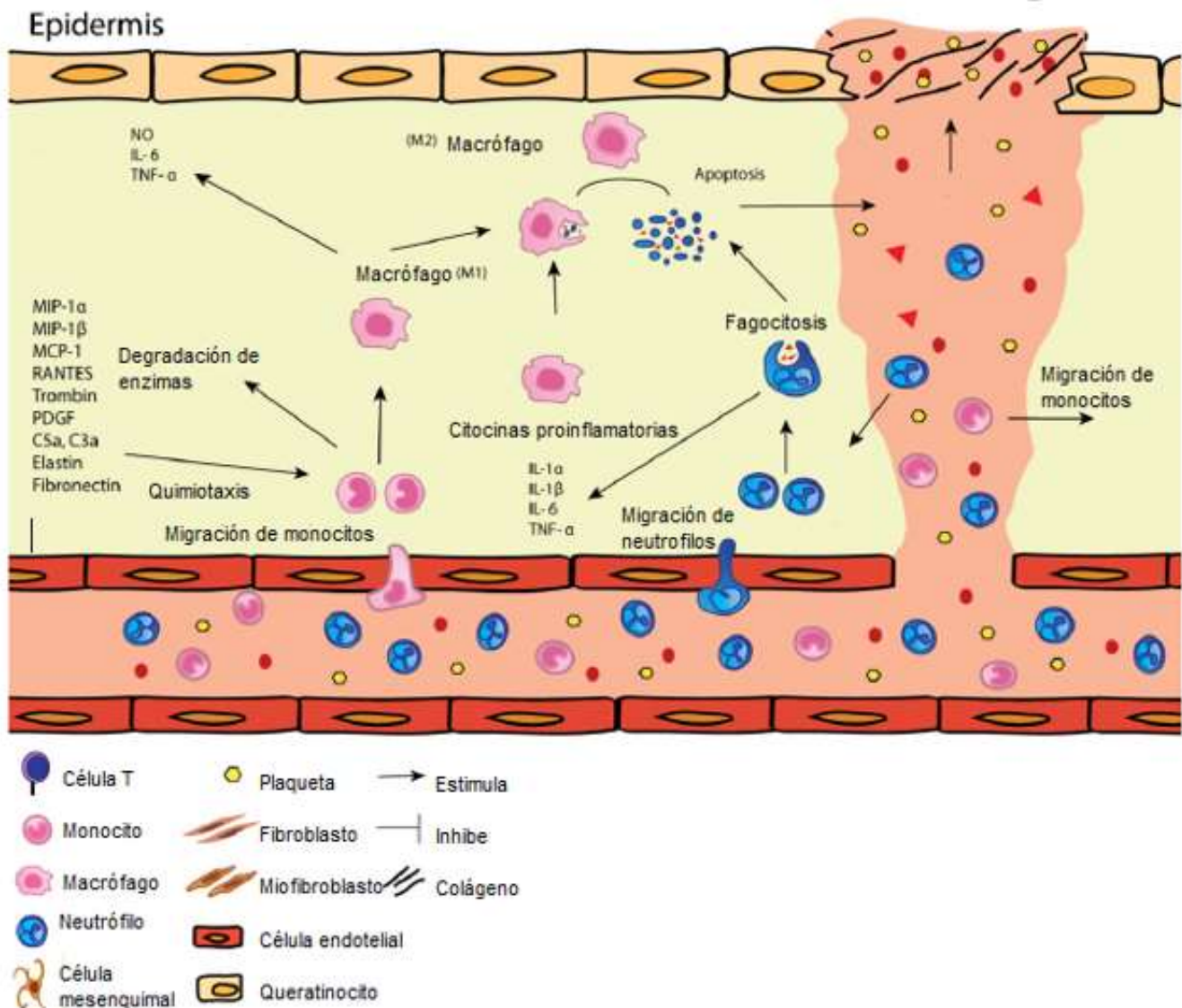


Figura 9. Representación de los mecanismos celulares y moleculares en la fase inflamatoria³².



2.7.4. FASE DE PROLIFERACIÓN

La fase de proliferación deriva de los procesos inflamatorios que se generaron en la fase anterior, esta fase es precursora al proceso de maduración y se inicia entre los días 10 y 15, esta fase tiene como objetivo generar una barrera protectora con la finalidad de aumentar los procesos de regeneración evitando la entrada de agentes nocivos. Durante esta fase se generan dos procesos importantes: la angiogénesis y la migración de fibroblastos los cuales dan lugar a la formación de una Matriz Extracelular (MEC) (Figura 10)^{26,27}.

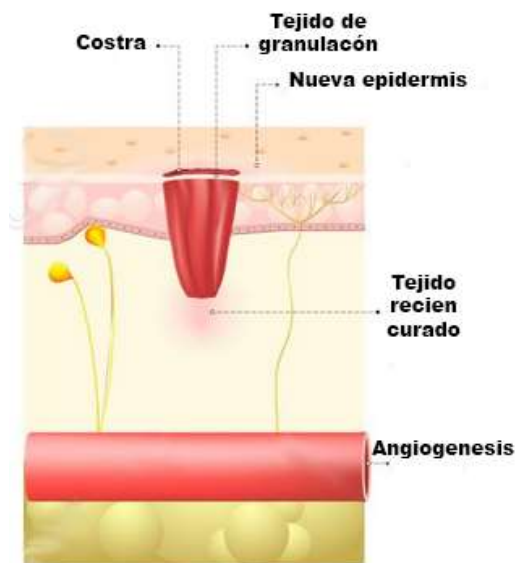


Figura 10. Representación de la fase de proliferación^{26,27}.

En la fase proliferativa (Figura 11). A los pocos días del desbridamiento de la herida por las células inflamatorias, la dermis lesionada comienza a ganar volumen por la formación de tejido de granulación. La población dominante de macrófagos en la herida en el día 5 es la población de macrófagos M2⁴². En la herida normal, el macrófago M2 domina la herida muy temprano en el proceso de curación y la fase inflamatoria es muy corta debido a la ausencia de producto bacteriano o exceso de material de tejido muerto. Además, los macrófagos M2 suprimen las respuestas inflamatorias y la inmunidad Th1 adaptativa, pero eliminan los desechos y promueven la angiogénesis, la remodelación y reparación de tejidos⁴².



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Los macrófagos M2 son, además, una fuente prominente de TGF, que promueve muchos aspectos de la reparación de heridas, incluyendo inflamación, quimiotaxis, contracción de heridas, angiogénesis y depósito de la MEC. Esta proteína promueve la fibrosis estimulando directamente las células mesenquimales y los fibroblastos³¹. El TGF no solo estimula la producción de colágeno, sino que también reduce la degradación de la matriz de la herida por la colagenasa y mediante una mayor inhibición de las MMP a través de una mayor expresión de TIMP. Un mediador citoplasmático clave de la señalización de TGF es Smad3. La formación de cicatrices hipertróficas se asocia principalmente con la sobreexpresión de TGF-1 y 2⁴³. Los fibroblastos y los miofibroblastos producen principalmente la nueva MEC necesaria para soportar las células y los vasos sanguíneos, que proporciona los nutrientes y el oxígeno necesarios para el crecimiento y la proliferación celular. Algunos fibroblastos ya están presentes en el área de la herida, dispersos dentro del tejido sin formar contactos célula-célula, mientras que otros se derivan de células mesenquimatosas indiferenciadas cercanas³³.

Tanto el TGF como el PDGF pueden mediar en la transición de estas células mesenquimatosas a miofibroblastos⁴⁴. Además, ambas citocinas estimulan estos miofibroblastos para producir colágeno y otros componentes de MEC. Los miofibroblastos se caracterizan por la expresión de actina muscular lisa (por sus siglas en inglés SMA) y están involucrados en la contracción de la herida⁴⁵. La producción de colágeno por los fibroblastos se inicia entre 3 y 5 días después de la lesión y es estimulada por TGF, PDGF, Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1)⁴³, que son producidos principalmente por macrófagos. Simultáneamente, los fibroblastos y las células endoteliales comienzan a migrar sobre la matriz provisional de la herida al espacio de la herida con la ayuda de Metaloproteinasas de la Matriz (MMP). Las células endoteliales migradas proporcionan la formación de nuevos vasos en el lecho de la herida. Una citocina importante que promueve esta migración es la IL-1, que estimula la liberación de MMP e induce sinérgicamente la actividad de colagenasa junto con IFN y TNF³⁶.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Los macrófagos proporcionan una fuente continua de citocinas proinflamatorias, incluidas IL-1, IL-1, IL-6 y TNF, que no solo son responsables del control de la adhesión y migración de las células inflamatorias, sino que también son importantes para la estimulación de la proliferación de fibroblastos y queratinocitos³⁶. Finalmente, durante la fase proliferativa, el coágulo fibroso se transforma en tejido conectivo rico en vasos sanguíneos, subyacente a la apariencia granular rosa³².

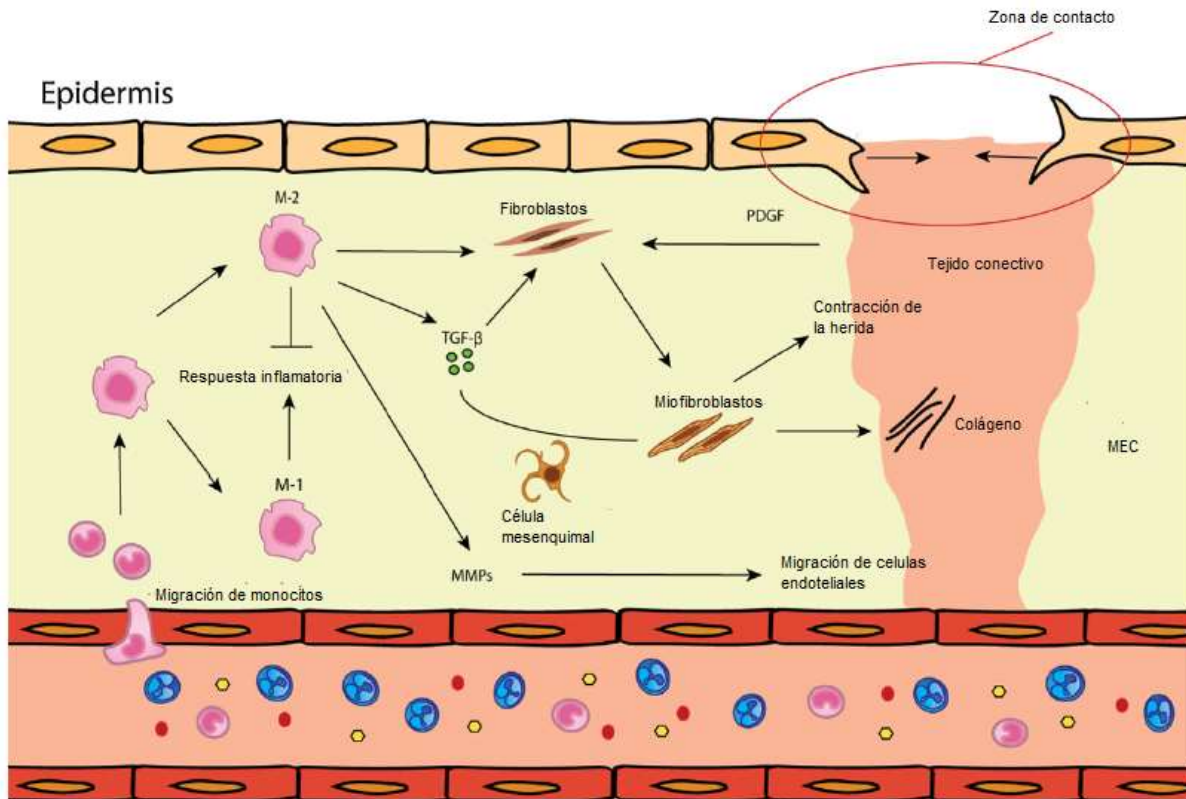


Figura 11. Representación de los mecanismos celulares y moleculares de la fase de proliferación³².

La formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes durante la cicatrización de heridas es un componente esencial de la cicatrización debido a la mayor demanda de nutrientes (Figura 12). En este proceso los macrófagos juegan un papel importante, ya que, su agotamiento conduce a una neovascularización retrasada y anormal. En primer lugar, la ECM y la membrana basal se degradan para facilitar la migración de las células endoteliales⁴⁶.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



La degradación está mediada por MMP producidas por varias células, incluidos los macrófagos. Adicionalmente, las células endoteliales también producen proteasas por las cuales degradan localmente la membrana basal. Posteriormente, las células endoteliales migran a la herida por adherencia a los receptores de la superficie celular de la integrina en la MEC. La migración es estimulada por VEGF, FGF, angiopoyetinas y TGF. Simultáneamente, estas proteínas secretoras regulan la ramificación capilar y la neovascularización. Entre ellos se encuentra el activador de plasminógeno (PA), que puede degradar las moléculas de la MEC dando como resultado fragmentos proangiogénicos como el ácido hialurónico y la fibrina⁴⁶. Las plaquetas son una de las primeras células en aparecer en el sitio de la herida, seguidas de los neutrófilos y los macrófagos. Las plaquetas liberan VEGF después de la estimulación, particularmente después de la estimulación con trombina, lo que lleva a la estimulación de la angiogénesis en la fase temprana de la cicatrización de heridas⁴⁷. Estos hallazgos han determinado la capacidad del linaje de monocitos/macrófagos, especialmente el macrófago M2 (la principal fuente de TGF), para contribuir a la angiogénesis durante la cicatrización de heridas⁴⁷.

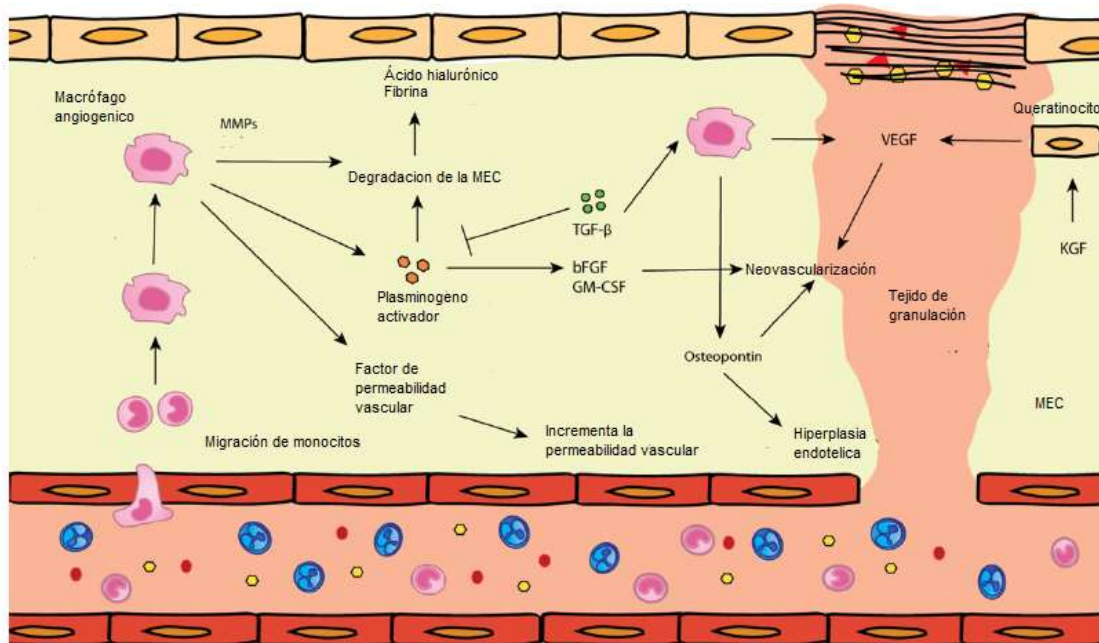


Figura 12. Representación del mecanismo celular y molecular de la angiogénesis³²



2.7.5. MADURACIÓN

La maduración se caracteriza por la formación, organización y resistencia que se genera en el tejido al formarse la cicatriz, lo cual se obtiene de la contracción de la herida que se genera por miofibroblastos y los paquetes de colágeno, este periodo puede durar entre uno o dos años, dependiendo de la lesión generada (Figura 13)²⁶.

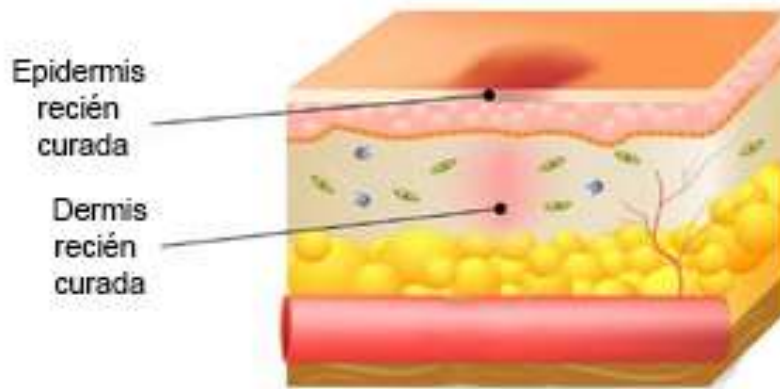


Figura 13. Representación del periodo de maduración de una cicatriz^{26,27}.

La fase de maduración o remodelación es la última y más larga fase del proceso de curación de la herida y continúa durante semanas o meses (Figura 14). Durante esta fase, la proliferación celular se ralentiza, la síntesis de proteínas disminuye y se produce la remodelación del colágeno en filamentos más grandes y organizados. A medida que disminuye la demanda de nutrientes del tejido, se produce una regresión de los capilares recientemente formados y el enrojecimiento de la cicatriz se desvanecerá. La mayoría de las células endoteliales, macrófagos y miofibroblastos sufren apoptosis o salen de la herida⁴⁸. El proceso de remodelación de la herida es un equilibrio entre la producción, descomposición y remodelación de MEC. Este equilibrio probablemente esté determinado por el microambiente de la cicatriz por medio de un entorno dominado por Th2 o Th1 y probablemente sea mantenido por las células T que infiltran la herida y señalan a los macrófagos y otras células inmunes⁴⁹.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Se ha informado que las células T no juegan un papel destacado en la cicatrización de heridas en caso de daños menores, sin embargo, en casos de daño importante o cuando la cicatrización de la herida se complica por una infección u otra actividad que activa el sistema leucocitario adaptativo, las células T juegan un papel importante⁴⁹. Los macrófagos y las células T se cruzan a través de citocinas y coestimuladores, incluidas por las moléculas de la superficie celular, lo que puede dar como resultado una amplia gama de resultados en función de estas células⁵⁰. Además, los macrófagos estimulan la expansión y diferenciación de células T a las células Th1 y Th2. En este sentido, las células T hacen que la cicatrización de heridas sea más compleja y pueden prolongar el proceso de cicatrización de heridas en varios aspectos. Esto puede provocar necrosis, fibrosis, formación de úlceras y formación de granulomas. Los linfocitos T infiltran el lecho de la herida en la fase inflamatoria tardía de la reparación de la herida, lo que sugiere que estas células están involucradas en la fase proliferativa o de remodelación tardía. Esto sugiere que más células Th1 pueblan la herida normal durante la fase de remodelación, porque una respuesta Th2 resulta en la producción de MEC. Las células Th1 producen principalmente IFN- γ que da como resultado la diferenciación de macrófagos en macrófagos M1.

Los macrófagos también juegan un papel importante en la modulación de la capacidad de otros tipos de células para secretar proteinasas neutras que degradan las macromoléculas de la matriz. La descomposición de MEC es fundamental para la cicatrización de heridas y la remodelación de tejidos. Uno de los componentes más importantes de la MEC es el colágeno, que aumenta la resistencia de la herida. Los procesos importantes en la fase de remodelación son la reorganización y la reticulación de las fibras de colágeno depositadas inicialmente y la sustitución del colágeno tipo III por colágeno tipo I, que es un filamento de colágeno más fuerte. In vivo, el colágeno es producido principalmente por miofibroblastos. Además, IFN y TNF estimulan los fibroblastos para disminuir la síntesis de colágeno.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Las MMP y sus inhibidores naturales (TIMP) son generalmente aceptados como mediadores importantes de la actividad proteolítica durante muchos procesos de remodelación fisiológica y patológica, incluida la reparación de tejidos. La familia MMP tiene la capacidad combinada de degradar virtualmente todos los componentes de MEC y las macromoléculas de membrana basal. Los macrófagos son una rica fuente de MMP y serina proteasas. Están especialmente involucrados en la expresión de MMP-2, MMP12 y MMP-19, y sintetizan inhibidores tisulares de metalo y serina proteasas.

La fase de remodelación depende principalmente de la descomposición del tejido y la producción de la MEC y los macrófagos juegan un papel crucial en ambos procesos. El desglose se regula directamente y la producción de MEC se regula principalmente a través de fibroblastos. En la última fase de la cicatrización normal de la herida, disminuye el número de macrófagos de la herida, lo que dará como resultado una menor producción de MEC. Adicionalmente, la actividad diferente o reducida de los macrófagos en la última fase de la cicatrización de la herida también podría dar como resultado una menor producción de MEC. Estos cambios, junto con la contracción de la herida, darán lugar a una disminución en el tamaño y el volumen de la herida. En condiciones patológicas, los números y la función de los macrófagos podrían modificarse y producir cicatrices anormales³²

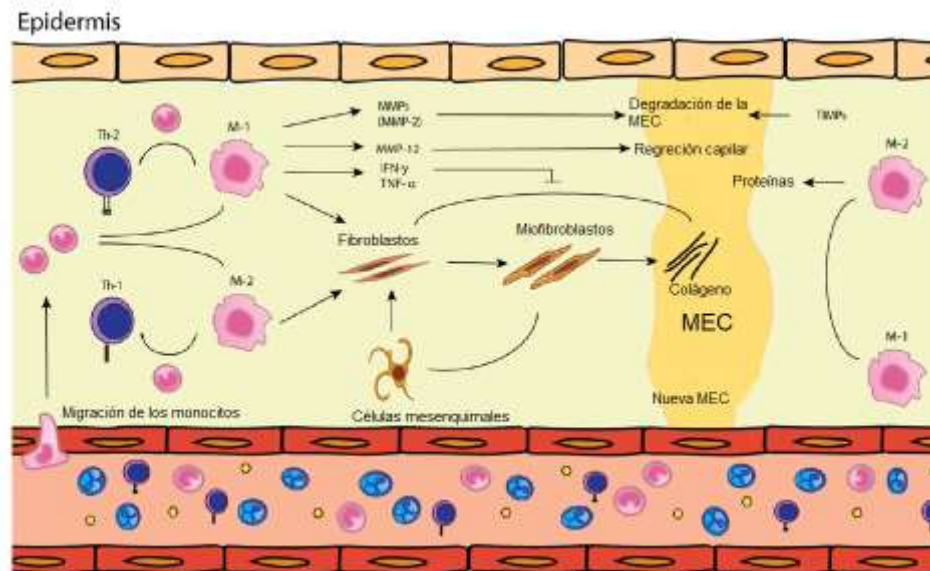


Figura 14. Representación del mecanismo celular y molecular de la fase de maduración³²



2.8. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El tratamiento utilizado para las cicatrices tiene como objetivo mejorar el aspecto y movilidad de la cicatriz. El grado de éxito se debe principalmente al tipo y naturaleza de la cicatriz. Dentro de los diferentes tipos de tratamientos podemos y dependiendo de su uso terapéutico podemos encontrar⁵¹.

1. Tratamiento farmacológico: Los fármacos que son utilizados actualmente para el tratamiento de las cicatrices son: corticoides, el interferón IFN- α 2 β , la heparina y la alantoína⁵¹.
2. Tratamiento mediante apósitos: los cuales están conformados por películas de poliuretano, hidrogeles y apósitos, los cuales están constituidos por sustancias hidrocoloides que, en conjunto con el exudado de la herida crean un gel, el cual mantiene un ambiente húmedo generando la absorción y retención del exudado, controlando la cantidad del exudado entre el apósito y evitando la infección de la lesión, favoreciendo la cicatrización⁵¹.
3. Cura en ambiente húmedo: Actualmente los productos que generan condiciones en ambiente húmedo se pueden clasificar por sus características en: poliuretanos, espumas de poliuretano, hidrogeles, hidrocoloides, apósitos de silicona, alginatos, apósitos de carbón y apósitos de plata⁵¹.

2.9. TRATAMIENTO HERBOLARIO

El tratamiento con hierbas o plantas medicinales, actualmente, es un recurso fundamental para la salud humana. Los elementos que se encuentran presentes en plantas y árboles son la base para el desarrollo de la medicina moderna. Estos elementos tienen un efecto sinérgico, es decir, pueden interactuar todos a la vez, de manera que algunos efectos pueden complementar o potenciar a otros y/o neutralizar sus posibles efectos negativos^{52,53}.

Las plantas medicinales ocupan un lugar importante, ya que durante mucho tiempo fue el principal recurso terapéutico que se utilizó para el tratamiento de diferentes enfermedades y actualmente en algunas zonas rurales e indígenas, es el único recurso del que se dispone debido a la falta de instituciones médicas y recursos monetarios para la obtención de medicina moderna⁵³.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En este sentido, actualmente ha demostrado de manera científica que la utilización de productos vegetales en el tratamiento de las cicatrices ha funcionado de forma favorable. Ejemplo de esto es el uso de extractos de hierbas que promueven la coagulación de la sangre, combaten infecciones y promueven la curación.

Las propiedades medicinales de estas especies vegetales dependen de los constituyentes fitoquímicos bioactivos dentro de los cuales podemos encontrar diferentes tipos de familias químicas como: alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos principalmente. Adicionalmente, las plantas son una fuente principal de péptidos, los cuales son moléculas proteicas que pueden existir de forma natural o ser un derivado de secuencias peptídicas con actividad biológica importante⁵⁴.

Diversos estudios biológicos ya fueron conducidos para evaluar la acción cicatrizante de diferentes especies vegetales^{55,56}. Las plantas con actividad cicatrizante pueden tener acción directa en la cicatrización, de misma manera como extractos de plantas con acción antimicrobiana pueden evitar la contaminación de las lesiones⁵⁷. De esta manera, se han identificado diferentes especies de las cuales se han comprobado su efecto cicatrizante, dentro de las cuales podemos encontrar en la Tabla 3.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Tabla 3. Algunas de las plantas con comprobado efecto cicatrizante.

NOMBRE DE LA PLANTA	INDICACIONES PARA EL USO	REFERENCIAS
<i>Aloe vera</i>	Estimulante de la proliferación de fibroblastos, angiogénesis, producción de factores de crecimiento, síntesis de los componentes de la matriz extracelular.	Takahashi, 2009; Atiba, 2011; Tarameshloo, 2012.
<i>Pupalia lappacea</i>	Reepitelización y resistencia a la tracción de heridas, con actividad antimicrobiana.	UDEGBUNAM et al., 2014.
<i>Napoleona vogelii</i>	Cicatrización en ratas albinas.	Adiele et al., 2014
<i>Piper angustifolium</i>	Eficacia en la fase inflamatoria, proliferativa y osteogénica en la cicatrización.	Paco et al., 2016.
<i>Piper aduncum</i>	Incrementa la proliferación y migración de fibroblastos, así como la expresión de factores de crecimiento que intervienen en el proceso de la cicatrización.	Paco et al., 2016.
<i>Eucryphia cordifolia</i>	Estimulante de la proliferación de fibroblastos, logrando una cicatrización más rápida en cobayos.	Schencke et al., 2015.
<i>Croton lechleri</i>	Efecto cicatrizante en ratones albinos.	Gallardo et al., 2015.
<i>Pinus caribaea</i>	Eficacia en la fase inflamatoria de la cicatrización de la epidermis y dermis.	Mancebo et al., 2011.
<i>Bryophyllum pinnata</i>	Eficacia en el estadio III de maduración de la cicatriz, influye favorablemente sobre el cierre de la herida, eficacia en la maduración de la dermis.	Suárez et al., 2001.
<i>Uglans neotropica diels</i>	Promueve la formación de tejido de granulación, neovasos, fibroblastos y colágeno, favoreciendo la cicatrización.	Juro et al., 2010.



2.10. PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO

Actualmente, la Medicina Tradicional Mexicana puede considerarse como “herbolaria”. México cuenta con un sistema ancestral de salud completo que no es diferente a las medicinas tradicionales de otros países y que desafortunadamente pocos conocen su valor. Este desconocimiento acerca de nuestra medicina ancestral, sobre todo por parte de los propios mexicanos hace que hasta la fecha no se goce de su reconocimiento en todos los aspectos: social, cultural y sobre todo legal⁵⁸.

Las plantas curativas son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana (Fitoterapia), que en gran parte de la república aún es rescatable y de los cuales se pueden constituir elementos para la implementación de nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular con el científico. La organización mundial de la salud (OMS) refiere el concepto de fitoterapia, como una ciencia encargada del estudio de productos vegetales para su utilización en la terapia de diversas enfermedades como: hipertensión, enfermedades respiratorias, diabetes, etc⁵⁸. Esta descripción diferencia el concepto de fitoterapia con el de fitomedicina, donde la primera representa una forma tradicional basada en la práctica empírica, mientras que segunda involucra una transformación de la planta medicinal en un medicamento, el cual deberá regirse en tres fundamentos principales: eficacia, calidad y seguridad^{59,60}.

2.11. GENERALIDADES DE *Bougainvillea x buttiana*

2.11.1. CARACTERÍSTICAS

El género *Bougainvillea* comprende una amplia variedad de especies pertenecientes a la familia de las Nyctagineacea, dentro de las cuales podemos encontrar a *B. x buttiana* conocida también como: santa rita, camelia, veranera, entre otras, fue descrita por Holttum & Standl, es una especie híbrida resultante de la cruce de *B. glabra* y *B. peruviana*, esta planta presenta hojas grandes y ovaladas en forma de corazón, brácteas redondas de color rosa o rojo, espinas rectas y cortas, las flores son pequeñas y de color crema o tonos rosados⁶¹ (Figura 15).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

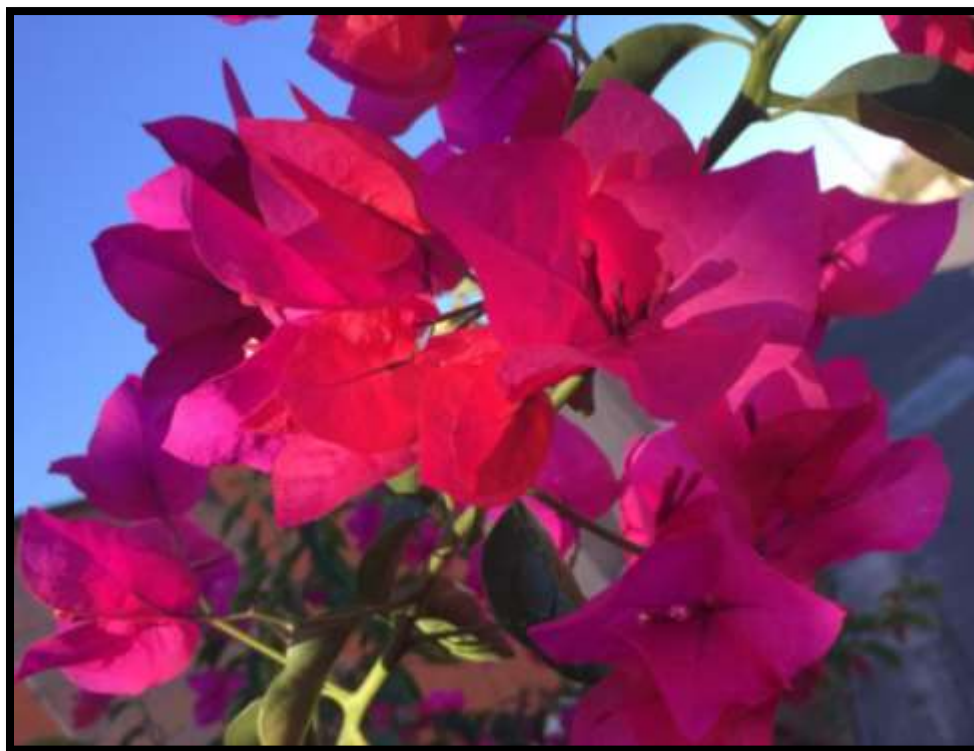


Figura 15. Flores y brácteas de *B. x buttiana* (Var. Rosa)⁶¹.

2.11.2. TAXONOMÍA

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Subdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Nyctaginaceae

Género: *Bougainvillea*^{62,63}.



2.11.3. DISTRIBUCIÓN

La especie *Bougainvillea* es originaria de Brasil, sin embargo, la podemos encontrar ampliamente distribuida en la república mexicana en: Nayarit, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Figura 16)⁵³.



Figura 16. Distribución de *Bougainvillea* en la república mexicana⁵³.

2.11.4. PLANTAS MEDICINALES CON ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LA FAMILIA Nyctaginaceae

A pesar de que no existen evidencias científicas que comprueben la actividad cicatrizante de *Bougainvillea x buttiana*, se ha podido determinar dicha actividad en otras plantas de la familia de la nyctaginaceae. Esta es una familia de plantas con flores dicotiledóneas, que consta de unos 33 géneros con aproximadamente 290 especies, distribuidas tropicalmente, principalmente en América. Las plantas suelen ser herbáceas, arbustos o árboles. Las hojas son simples, alternas o en espiral.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Las flores son bisexuales, rara vez unisexuales, generalmente actinomorfas, solitarias o fasciculadas, y están dispuestas en cimas. Las brácteas son de tipo cáliz, a veces de colores brillantes⁶⁴. Algunos ejemplos de plantas pertenecientes a esta familia a las cuales se les han comprobado de manera experimental su actividad cicatrizante se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Plantas medicinales pertenecientes a la familia nyctaginaceae con actividad cicatrizante.

PLANTA	NOMBRE POPULAR	PARTE DE LA PLANTA	EXTRACTO	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Boerhavia diffusa</i>	Arete, golondrina, palo de agua, siempreviva	Hojas	Extracto metanólico y extracto con cloroformo	Alcaloides	65, 66
<i>Bougainvillea glabra</i>	Flor de papel, buganvilia	Hojas	Extracto acuoso	Alcaloides, flavonoides, saponinas y carbohidratos.	67, 68
<i>Mirabilis jalapa</i>	Don Diego de noche, periquito, maravilla del Perú o clavellina	Hojas	Extracto metanólico acuoso	Terpenoides y flavonoides	69, 70, 71
<i>Pisonia grandis</i>	Garra del diablo	Hojas	Extracto metanólico	Flavonoides, alcaloides, polifenoles, taninos, saponinas y glucósidos.	72, 73

2.11.5. ANTECEDENTES ETNOMEDICOS

Esta planta es utilizada como infusión en la medicina tradicional, su preparación consta en poner a hervir las flores con naranja, canela, orégano y tomillo, se usa para el tratamiento de diferentes afecciones como: infecciones respiratorias, acides estomacal, diarrea, úlceras, fiebre, lesiones, diabetes, entre otras⁶².



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



2.11.6. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

A partir de estudios realizados mediante GC-MS, se ha podido identificar la presencia de diferentes componentes químicos en *B. x buttiana*, los cuales podemos clasificar en: compuestos fenólicos, carbohidratos y ácidos grasos, a los que se les atribuyen diferentes actividades farmacológicas⁷⁴ (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad farmacológica de los componentes químicos identificados en *B. x buttiana* por GC-MS⁷⁴.

GRUPOS QUÍMICOS	COMPUESTOS	ACTIVIDAD
Compuesto fenólico	Ácido 2-propenoico, 3-(2-hidroxifenil)-,(E)-	Antibacteriano, alergénico, anestésico, antiinflamatorio, antimutagénico, etc.
Compuesto fenólico	2-metoxi-4-vinilfenol	Antioxidante, antimicrobiano y antiinflamatorio
Carbohidrato	3-O-Metil-d-glucosa	Conservante
Ácido graso	<i>n</i> -ácido hexadecanoico	Antioxidante, pesticida, antifibrinolítico, hemolítico, nematocida, etc.
Ácido graso	Ácido hexadecanoico, éster etílico	Antioxidante
Ácido graso	Ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico	Hipocolesterolémico, antiartrítico, hipocolesterolémico antihistamínico, antiacné, etc.
Ácido graso	9,12,15 ácido octadecatrienoico, éster etílico (Z,Z,Z)-	Antiinflamatorio, Hipocolesterolémico, Antihistamínico, Antieczémico, Antiandrogénico, Antiartrítico, etc.

2.11.7. ANTECEDENTES FARMACOLOGICOS

Actualmente se han realizado diferentes estudios científicos en los que se han comprobado diferentes tipos de actividades farmacológicas relacionados a los extractos o compuestos presentes en la especie *B. x buttiana*, dentro de los cuales podemos destacar: su potencial actividad analgésica a partir del extracto etanólico, la obtención de compuestos con actividad antioxidante del extracto metanólico, su potencial actividad anti artritis mediante el extracto etanólico y su potencial efecto



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



antidiabético obtenido del extracto hidroalcohólico etanol-agua (50/50%), cabe destacar que dicho efecto también ha sido determinado en otras especies de *Bougainvillea* tales como: *B. spectabilis* y *B. glabra*^{75,76,77}.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar cuáles son los compuestos que promueven la actividad cicatrizante a partir del extracto cetónico de *B. x buttiana* (Var. Rosa) y sus diferentes grupos de fracciones en el modelo murino.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto de acetona a partir de brácteas con flores de la especie *B. x buttiana* (Var. Rosa) y sus diferentes grupos de fracciones a partir de un fraccionamiento primario.
2. Determinar la naturaleza química de los compuestos presentes en el extracto de acetona de la especie *B. x buttiana* (Var. Rosa) y los diferentes grupos de fracciones.
3. Evaluar el efecto cicatrizante del extracto de acetona y los grupos de fracciones de *B. x buttiana* (Var. Rosa) en modelo murino.
4. Determinar la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias de la fracción con mayor efecto cicatrizante.



4. JUSTIFICACIÓN

Una herida es la pérdida de la continuidad de la piel, la cual, es producida por algún tipo de agente físico o químico, esta se caracteriza por la presencia de una serie de signos y síntomas, los cuales incluyen la separación de la piel, hemorragia, dolor, inflamación, etc. Las heridas presentan diferentes etapas de cicatrización de acuerdo a su evolución y pueden presentar diferentes periodos de tiempo los cuales van desde los 6 meses en el caso de las heridas agudas o pueden durar varios años en el caso de las heridas crónicas⁷⁸.

En este sentido, se ha generado un interés particular para poder tratar de manera inmediata, los diferentes problemas relacionados con las heridas tanto agudas como crónicas, al mismo tiempo que los diferentes tipos de alteraciones que se generan en la cicatrización y cómo influyen los diversos tratamientos locales y sistémicos. Actualmente, los avances a nivel molecular sobre el conocimiento de los procesos de cicatrización han ido mejorando con la comprensión que se tiene del tema. El uso y desarrollo de terapias avanzadas, tales como, el uso de factores de crecimiento, la capacidad de cultivo celular y la elaboración de tejidos con técnicas de bioingeniería son parte de los tratamientos que se están utilizando actualmente, no obstante, el uso de plantas con propiedades medicinales sigue siendo una de las principales alternativas que se emplea en la población para el tratamiento de la cicatrización de heridas⁷⁹.

Adicionalmente, parte de los tratamientos actuales se basan en moléculas o compuestos obtenidos a partir de extractos de diversas especies de plantas, es por ello por lo que resulta importante dar un fundamento y evidencia científica del uso tradicional de las diferentes especies vegetales. De esta manera, el presente trabajo pretende establecer el efecto cicatrizante del extracto de acetona y sus fracciones obtenidas a partir de brácteas y flores de *B. x buttiana* (Var. Rosa) en modelo murino con el fin de dar sustento a su uso y poder determinar si el extracto y/o fracciones obtenidas podrían ser empleados como fármacos potenciales o prototipos para la síntesis de nuevos compuestos con actividad cicatrizante.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



5. HIPÓTESIS

Con base en antecedentes farmacológicos realizados en el laboratorio de Inflamación y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UAEM, el extracto de acetona a partir de brácteas con flores de *B. x buttiana* (Var. Rosa) y sus diferentes grupos de fracciones presentaran compuestos responsables de la actividad cicatrizante en modelos murinos.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. REACTIVOS

Para la elaboración de este proyecto se utilizó KitosCell® Gel PFD el cual fue utilizado como control positivo en los ensayos de cicatrización y fue obtenido de manera comercial. El propilenglicol, la trietanolamina, la silica gel y los diferentes disolventes (diclorometano y metanol) se obtuvieron del laboratorio 6 de Inflamación y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UAEM.

Suero fetal bobino (FBS) y la albumina de suero bovino (BSA) se obtuvieron de Sigma Aldrich Chemical Co. (Toluca, México). Los anticuerpos de captura y detección y las citocinas recombinantes se adquirieron de BD Biosciences Pharmingen (EE. UU.) y el TNF recombinante se adquirió de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania).

6.2. EQUIPO

Se utilizó un Rotavapor® (Buchi R-100), con la finalidad de eliminar el disolvente del macerado a presión reducida.

6.3. MATERIAL VEGETAL

Se recolectaron 289.2 g de partes aéreas (brácteas con flores) de la especie *Bougainvillea*. La planta fue recolectada en el municipio de Temixco, Morelos, México, (18°55'20.1"N y 99°14'40.6"W, 1.185m) el mes de marzo del 2018 e identificada como *Bougainvillea x buttiana* Holtum and Standl, (Var. Rosa).

Un espécimen fue depositado en el Herbario HUMO, del (CIByC) Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (UAEM, Cuernavaca, Morelos, México) y designada con el número de folio: 33872 por el M. en C. Gabriel Flores Franco.



6.4. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE ACETONA DE *B. x buttiana*

La especie vegetal *B. x buttiana* se sometió a un proceso de secado a la sombra a una temperatura de 23 ± 1.2 °C y una humedad relativa de $25.7 \pm 1.5\%$, posteriormente se realizó la molienda del material vegetal seco, el cual obtuvo un tamaño de partícula de 1.2 ± 0.2 mm, posteriormente se sometió a un proceso de maceración exhaustiva utilizando como disolvente acetona al 100% durante un periodo de 72 horas, posteriormente se filtró el material vegetal y se eliminó el disolvente a presión reducida con la ayuda de un Rotavapor® (Buchi R-100), este proceso se realizó por triplicado y a partir de este se obtuvo el extracto de acetona.

6.5. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA DEL EXTRACTO DE ACETONA

El extracto de acetona de *B. x buttiana* fue sometido a un fraccionamiento por cromatografía de columna abierta. Se utilizaron 40 g de sílice gel 60-200 Mesh, la elución se realizó utilizando una fase móvil en orden de polaridad creciente, utilizando los disolventes: diclorometano (DCM), metanol (MeOH), posteriormente se realizaron lavados con metanol, agua y acetona al 100%.

Las fracciones obtenidas durante la elución de la columna fueron identificadas por cromatografía en capa fina (TLC) en un sistema diclorometano: metanol (90:10, v/v) y se revelaron con yodo. Partiendo de las fracciones con semejanzas en su perfil cromatográfico se agruparon de acuerdo con las manchas observadas en la TLC, una vez agrupadas se calculó su peso y el rendimiento de cada una de las fracciones.

Posteriormente se realizó un análisis cromatográfico para los grupos de fracciones obtenidos utilizando diferentes reveladores para poder identificar los componentes presentes en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



De acuerdo con las características fisicoquímicas de cada fracción se analizaron los grupos de fracciones F1 al F4 al igual que el extracto integro de acetona en una placa fase normal en un sistema Acetato de etilo: Hexano (30:70) con un estándar de terpenos, las placas obtenidas se revelaron en 4-Hidroxibenzaldehído y se observaron en UV a 254 nm y 365 nm. Los grupos de fracciones F5 a F11 al igual que el extracto integro de acetona se corrieron en una placa fase reversa con un sistema de agua y acetonitrilo (70:30) utilizando un estándar de rutina, finalmente se revelaron con un estándar de flavonoides y fueron observados en UV a 254 nm y a 365 nm.

6.6. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

De acuerdo con las características fisicoquímicas observadas en los grupos de fracciones F5-F11 se realizó una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-CLAR), la cual fue realizada en un sistema de separación Waters 2695 equipado con un detector sistematizado de fotodiodos Waters 996 y con la ayuda del software Empower Pro (Waters Corporation, Mildford, Ma, EE. UU.).

La separación química se logró utilizando una columna Supelcosil LC-F, una fase móvil de ácido trifluoroacético al 0.5% y acetonitrilo, utilizando un sistema de gradiente. La velocidad de flujo se mantuvo en 0,9 mL/min con un volumen de eyección de la muestra de 10 μ L. Este análisis fue realizado en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS).

6.7. EVALUACIÓN TÓPICA DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE

6.7.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

Los animales que se utilizaron para la elaboración de este proyecto fueron ratones hembra de la cepa BALB/c, adquiridos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca-Morelos con un peso entre 25-30 g los cuales fueron manipulados con base en la Regulación Federal para el Manejo y Experimentación de Animales, emitida por la Secretaria de Agricultura y Recursos Naturales



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



(SAGARPA) y de acuerdo con los procedimientos descritos en la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”⁸⁰. Los animales fueron destinados únicamente para uso experimental y se mantuvieron alojados en el Laboratorio 6 de Inflamación y Toxicología de la Facultad de Medicina (UAEM), los cuales se quedaron resguardados por un período de ambientalización de dos semanas, fueron agrupados en cajas de seis animales y mantenidos en condiciones controladas de temperatura a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, con dieta de pellets de roedor comercial y agua *ad libitum*.

Posteriormente para la evaluación del efecto cicatrizante del extracto de acetona se formaron los grupo experimentales: vehículo, grupo tratamiento (extracto integro y grupos de fracciones), grupo control positivo (KitosCell®) y grupo control negativo (sin tratamiento), los cuales se mantuvieron en condiciones asépticas previo y durante el ensayo, dentro del laboratorio.

6.7.2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS HERIDAS CUTÁNEAS

Los animales fueron anestesiados con isoflurano, el cual es un anestésico potente, mediante inhalación utilizando una cámara de gas ($20\ \mu\text{L}$ para inducción)⁸¹. Posteriormente se rasuraron en la zona dorsal superior y se les realizó asepsia con torundas de alcohol de 10 mm de diámetro por 4–5 mm de espesor. La incisión se realizó con la ayuda de una aguja para biopsia de piel uni-punch de 4.0 mm, posteriormente a la realización de la incisión se limpió el exceso de sangre con una torunda con alcohol⁸².

Las heridas realizadas se mantuvieron abiertas y se descartó la posibilidad de la existencia de algún tipo de infección secundaria presente mediante un análisis macroscópico, se aplicó tratamiento de manera tópica cada 12 horas durante los primeros tres días utilizando una dosis de $20\ \mu\text{L}$ con una concentración de 1 mg del extracto de acetona (EABxb) y los grupos de fracciones, del grupo vehículo al igual que la crema base (Tabla 6) se aplicaron $20\ \mu\text{L}$, al grupo control positivo 1 mg/mL de KitosCell® y al grupo control negativo no se les aplicó tratamiento.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Posteriormente se realizó la medición del tamaño de la herida durante los días 0, 2, 6, 11 y 13 del ensayo (los cuales corresponden a las fases de cicatrización). Con la ayuda de una cámara Canon T6 con una lente de 18-55 mm se tomaron las fotos de las heridas a lo largo del ensayo y se determinó el área de cicatrización con la ayuda del programa Image J-win64.

Tabla 6. Composición de la crema base utilizada como vehículo.

COMPONENTE	CANTIDAD
Propilenglicol	1 mL
Trietanolamina	0.15 mL
Agua	10 mL
EABxb	1 mg/Kg

6.7.3. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA CONTRACCIÓN DE HERIDAS

La evaluación macroscópica se realizó a partir de los valores promedios de las áreas de las heridas obtenidas, en la cual se utilizó el cálculo de grado de contracción de la herida expresado en porcentaje a mediante de la siguiente fórmula⁸³:

$$\text{Porcentaje de la contracción de herida (\%)} = [(A_0 - A_F)/A_0] \times 100$$

Dónde: A_0 es el área inicial, corresponde al día del procedimiento quirúrgico y A_F es el área final, en los determinados días establecidos.

Durante el análisis macroscópico y la evolución del cierre de las heridas de cada uno de los grupo experimentales fueron evaluadas y analizadas las características de la herida (presencia de exudado, edema y ocurrencia de hemorragia).



6.7.4. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CICATRIZACIÓN

Con la finalidad de poder conocer cuál era la velocidad con la que la herida fue cicatrizando durante el ensayo, se determinó la velocidad de cicatrización por día de cada uno de los grupos de experimentales tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de cicatrización} = \frac{\text{Área inicial} - \text{Área al tiempo } x}{\text{Hora } x}$$

Posteriormente el grupo experimental que presentó mayor velocidad de cicatrización será comparado con el control negativo, control positivo, vehículo y extracto integro para poder observar las diferencias significativas.

6.8. CUANTIFICACIÓN DE LAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ Y LAS INTERLEUCINAS IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 DE LA FRACCIÓN CON MAYOR ACTIVIDAD MEDIANTE ELISA

6.8.1. OBTENCIÓN DEL SUERO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS

Al finalizar el ensayo de la actividad cicatrizante, se determinó el grupo experimental que presentó mayor efecto en el cierre de la herida. Partiendo de este análisis se pudieron determinar citocinas que intervienen principalmente en procesos inflamatorios y proinflamatorios.

Se formaron dos grupos experimentales: el control negativo y el grupo experimental más activo, se recolectó la sangre de los ratones en tubos Eppendorf mediante extracción submandibular obteniendo de 100-150 μ L (5-10 gotas) durante los días: 0, 1, 2, 6, 9, 11 y 13, los cuales corresponden a las fases de cicatrización.

Primeramente, se realizó la inmovilización del ratón por el pliegue nucal. Posteriormente se ubicó el lugar de punción el cual se encuentra en la vena superficial temporal que pasa justamente por el interior de la mandíbula a unos 3-5



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



mm de profundidad, con la otra mano se sujetó el objeto punzante (aguja o lanceta) a unos 90° del vaso sanguíneo y se realizó una punción firme (no ingresar más de 5mm) como se muestra en la Figura 17.

Finalmente se retiró la aguja y se recolectó la muestra con el tubo Eppendorf, (este paso debe realizarse lo más rápido posible para no perder las gotas de sangre). Posteriormente se realizó hemostasia al ratón con un algodón seco presionando la zona de punción y se dejó al ratón nuevamente en su caja⁸⁴.



Figura 17. Ubicación de la vena superficial temporal para la punción submandibular.

Después de la extracción de sangre de cada uno de los grupos experimentales (control negativo y fracción más activa) se dejó en reposo durante 15-30 minutos a temperatura ambiente (18-22°C) y posteriormente se realizó la centrifugación de los tubos (este paso se debe realizar dentro de las dos horas posteriores a la extracción de la sangre).

Para poder separar el suero de la sangre se centrifugó a 1600 rpm durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente, de acuerdo con algunos autores esta velocidad, tiempo y temperatura de centrifugación reducen la contaminación con plaquetas⁸⁴.

Posteriormente se separó con la ayuda de una micropipeta el suero el cual se encontraba en la parte superior del tubo centrifugado, se debe evitar hacer contacto con el coágulo o el gel. El suero obtenido se almacenó a -40°C en el congelador (a largo plazo) o puede almacenarse a -20°C durante 24-48 horas después de su obtención si se desea utilizar a corto plazo⁸⁵.



6.8.2. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS POR EL MÉTODO ELISA

Para la determinación de las citocinas proinflamatorias: TNF- α , IFN- γ e IL-6 y las citocinas antiinflamatorias: IL-4, IL-5, e IL-10 se realizó el método descrito por Schumacher et. Al.⁸⁶.

Se utilizaron placas de 96 pozos para el ensayo de ELISA se le agregaron 100 μ L de anticuerpos monoclonales de captura anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- γ y anti-TNF- α en buffer carbonato de sodio 0.1 M, con un pH de 8.2 y fueron incubadas durante 6 horas a temperatura ambiente. Cada pozo fue lavado con PBS/tween-20 al 0.1% y fueron bloqueados con 100 μ L de PBS (Suero fetal bovino) al 10% durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente al lavado, se adicionaron 50 μ L del suero obtenido en cada pozo por duplicado y se incubaron durante 18 horas a 4°C. Posteriormente se realizó un lavado e incubaron con 100 μ L de anticuerpos monoclonales de detección biotinilados anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- γ y anti-TNF- α como segundo anticuerpo durante un periodo de 45 min a temperatura ambiente. Después de realizar el ultimo lavado, la reacción fue revelada por la adición de ortofenilendiamina en cada uno de los pozos. La densidad óptica fue medida mediante un lector de microplaca con un filtro de longitud de onda a 405 nm. La cantidad de citosinas contenidas en cada muestra se determinó con la ayuda de una curva estándar establecida con la citocina recombinante correspondiente y expresada en ng/mL.

6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron presentados utilizando una media \pm desviación estándar (n=5) en los que se tomó en cuenta un análisis estadístico de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey para las muestras independiente con la ayuda del programa GraphPad Prism 7. Tomando en cuenta los valores de ($p < 0.05$) como significativos.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE ACETONA Y FRACCIONES DE *Bougainvillea x buttiana*.



Figura 18. Macerado de *B. x buttiana* en acetona.



Figura 19. Eliminación del disolvente con el rotavapor.

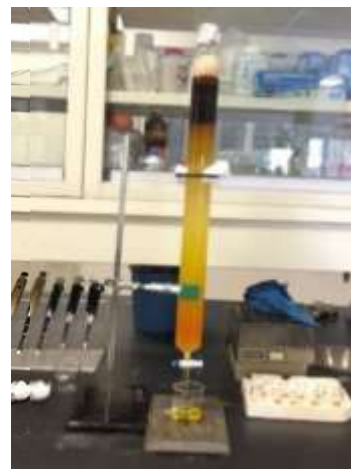


Figura 20. Fraccionamiento primario del extracto de acetona de *B. x buttiana*.

El material vegetal (*Bougainvillea x buttiana*) seco y molido con un peso de 289.2 g fue sometido a un proceso de maceración exhaustiva con el disolvente acetona (Figura 18), durante 72 horas por triplicado y destilado con la ayuda de un rotavapor (Figura 19) con la finalidad de eliminar el disolvente. Al finalizar este proceso se obtuvieron 5.119 g del extracto cetónico de *B. x buttiana* el cual representa el 1.77% del rendimiento del peso inicial.

En el siguiente proceso se utilizaron 4 g del extracto cetónico de *B. x buttiana* los cuales fueron utilizados para realizar un fraccionamiento primario mediante cromatografía en una columna abierta (Figura 20). La columna fue preparada con 382.73 g de silica gel 60-200 Mesh, utilizando una fase móvil de polaridad creciente con los disolventes: diclorometano (DCM), metanol (MeOH) y se realizaron lavados con MeOH, agua y acetona (DKM) al 100%. Finalmente se obtuvieron 39 fracciones del extracto cetónico de *B. x buttiana*. Los sistemas que fueron empleados en esta cromatografía son representados en la Tabla 7.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Tabla 7. Sistemas empleados como fase móvil para la obtención de los diferentes grupos de fracciones obtenidos del extracto de acetona de *B. x buttiana*.

Fracción	Grupo	Fase móvil								
		DCM	DCM:MeOH				MeOH	Agua	DKM	
		100%	(90:10)%	(85:15)%	(80:20)%	100%	(50:50)%	100%	100%	100%
1-4	1	X								
5-8	2	X								
9-24	3		X							
25-31	4			X	X					
32	5					X	X			
33	6						X			
34	7						X			
35	8						X			
36	9							X		
37	10								X	
38	11									X

Nota: DCM (Diclorometano), MeOH (Metanol), DKM (Acetona).

7.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE LAS FRACCIONES Y EL EXTRACTO INTEGRAL DE *Bougainvillea x buttiana*.

Las 39 fracciones (Figura 21) obtenidas fueron recolectadas en viales de 10 mL y fueron separadas conforme iban saliendo y por la coloración que fueron presentando en el momento de la elución en la columna. Cada una de las fracciones fue sometida a un análisis cromatográfico en cromatografía de capa fina (TLC) como se observa en la Figura 22. Se utilizó un sistema 10:90 v/v acetato de etilo-hexano para las primeras 23 fracciones y un sistema 30:70 v/v de acetato de etilo-hexano para las fracciones 24-39, finalmente cada una de las placas fue revelada con yodo.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Figura 21. Fracciones recolectadas de la columna cromatográfica. Primera hilera de izquierda a derecha (vial 1 al 10), segunda hilera (vial 11 al 20), tercera hilera (vial 21 al 30) y cuarta hilera (vial 31 al 39).

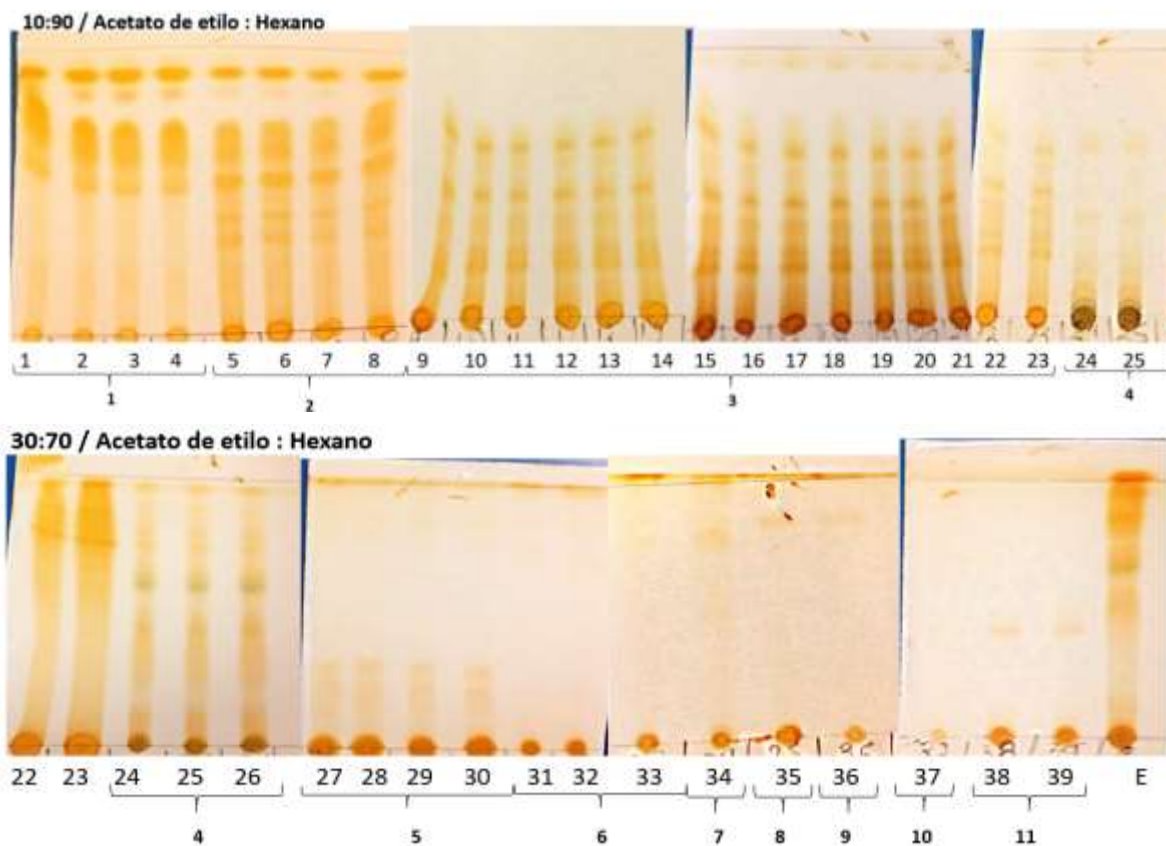


Figura 22. Cromatografías en capa fina de las 39 fracciones y sus agrupaciones.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Una vez reveladas las placas de las 39 fracciones, se realizó un análisis de cada una de ellas en las que se observaron la presencia de componentes similares en cada una de las fracciones, de tal manera que fueron agrupadas de acuerdo con las características físicas de los componentes presentes en cada una de ellas. Finalmente fueron formados 11 grupos de fracciones los cuales se encuentran representados en la Tabla 8.

Tabla 8. Agrupaciones de cada una de las fracciones de acuerdo con la TLC.

FRACCIONES	GRUPOS DE FRACCIONES
1-4	1
5-8	2
9-23	3
24-26	4
27-30	5
31-33	6
34	7
35	8
36	9
37	10
38-39	11

7.2.1. RENDIMIENTO DEL EXTRACTO DE ACETONA DE *Bougainvillea x buttiana* Y LOS GRUPOS DE FRACCIONES.

Una vez agrupados las 39 fracciones en los 11 grupos, cada uno de ellos fue colocado en un lugar a la sombra y a temperatura ambiente hasta la sequedad, posteriormente cada grupo de fracción fue pesado y se obtuvieron los porcentajes del rendimiento final, cada vial fue tapado, etiquetado y almacenado. Estos datos se encuentran representados en la Tabla 9.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Tabla 9. Peso y rendimiento del extracto de acetona de *B. x buttiana* y de sus grupos de fracciones.

EXTRACTO	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
Acetona	5.119	1.77
GRUPO DE FRACCIONES	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
1	0.122	2.44
2	0.117	2.34
3	0.229	4.58
4	1.124	22.48
5	0.698	13.96
6	0.101	2.02
7	0.140	2.80
8	0.326	6.52
9	0.198	3.96
10	0.288	5.76
11	0.471	9.42

De acuerdo con los datos obtenidos anteriormente podemos destacar los grupos de fracciones con mayor rendimiento fue la 4 con 1.124 g que representa el 22.48%, la 5 con 0.698 g que representa el 13.96% y la 11 con 0.471 g que representa el 9.42%. por otra parte, los grupos de fracciones con menor rendimiento fueron la 6 con 0.101 g que representa el 2.02%, la 2 con 0.177 g que representa el 2.34% y la 1 con 0.122 g que representa el 2.44% del rendimiento total, cabe destacar que en algunos casos las fracciones con menor rendimiento son las que presentan una mayor actividad biológica, es por eso la importancia sobre el uso de las plantas medicinales, su resguardando, concientización y cuidando la zonas de donde se recolectan para evitar su extinción⁸⁷.



7.2.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA DE LOS GRUPOS DE FRACCIONES

De acuerdo con los resultados anteriores se pudieron determinar algunas características visibles de los grupos de fracciones, por lo que se determinó analizarlos por separado. Primeramente, se realizó el estudio de los grupos de fracciones F1-F4 como se muestra en la Figura 23, estas muestras se compararon con el extracto integro de acetona de *Bxb* y con un estándar de terpenos.

Para estos primeros grupos de fracciones se utilizó una fase normal en un sistema Acetato de etilo: Hexano (30:70). En la imagen A después de correr las muestras se observó en UV a onda corta (254 nm) la presencia de manchas oscuras en la parte superior de la F2, una mancha mucho más marcada a lo largo del carril de la F3 y en los puntos de aplicación de la F4, en el extracto integro (E) y ligeramente en el estándar de terpenos (T). Posteriormente en la imagen B se observó la misma placa en UV, pero a una longitud de onda larga (365 nm) observando manchas con coloración azul en la parte superior de la F2, a lo largo del carril en F3 y en el punto de aplicación del estándar de terpenos (T), mientras que en el carril F4 y el extracto integro (E) se observan manchas a lo largo del carril en coloraciones rojas.

En la imagen C se utilizó un revelador de terpenos (4-hidroxibenzaldehído) sobre la placa para poder determinar la presencia de este tipo de compuestos, observando que en los primeros grupos de fracciones F1 a F4 manchas moradas similares a un Rf de 0.9 en cada uno de los grupos y en el extracto integro (E), sin embargo, en estos últimos (F3, F4 y E) se pueden observar más manchas moradas a distintos Rf de sus carriles. Por otra parte, en el estándar de terpenos (T) se logra observar manchas en el punto de aplicación y a un Rf de 0.4. Adicionalmente se realizó el mismo procedimiento con los demás grupos de fracciones (F5 a F11) pero no se pudo observar ningún tipo de mancha, de tal manera que se utilizó otro sistema en otro tipo de placa para poder apreciar mejor la presencia de los compuestos mayoritarios en esos grupos de fracciones.

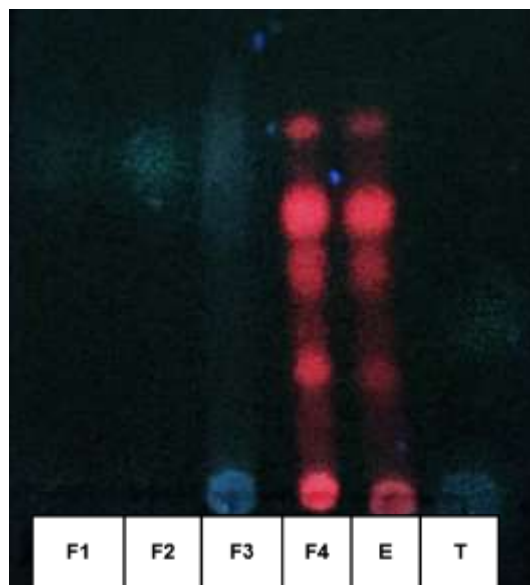
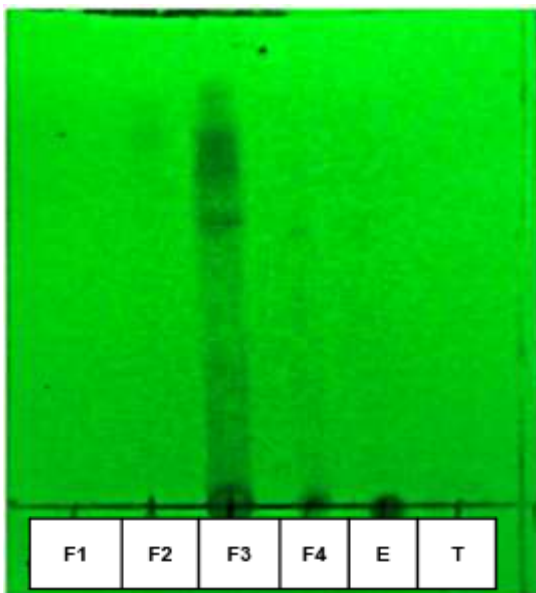


Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



A) Onda corta: 254 nm

B) Onda larga: 365 nm



C) 4-Hidroxibenzaldehído

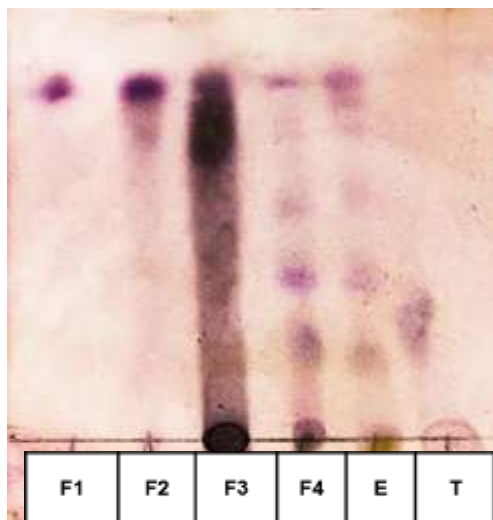


Figura 23. Cromatografías en fase normal de los grupos de fracciones 1 al 4 a diferentes longitudes de onda UV (A y B) y con un revelador de terpenos (C).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En los grupos de fracciones de la Figura 24 los cuales corresponden a F5-F11 se utilizó una placa fase reversa en un sistema de agua y acetonitrilo (70:30). Estos grupos fueron comparados con el extracto integró de acetona de *Bxb* y un estándar de rutina en el último carril.

En la imagen A se pudo observar en UV a onda corta (254 nm) distintos tipos de manchas en coloración azul oscuro a un Rf de 0.3 y 0.4 en los grupos F5, F6, F7, F8, F10, el extracto integro (E) y en el estándar de rutina (R) aun Rf de 0.5. Posteriormente en la imagen B, la misma placa se observó en UV a onda larga (365 nm) en donde se aprecian manchas azul oscuro con mayor intensidad en los mismos grupos, pero adicionalmente se muestra una coloración roja en los puntos de aplicación, por otra lado, en la parte superior de las fracciones F8 y F10 se observan manchas azul claro a un Rf de 0.9.

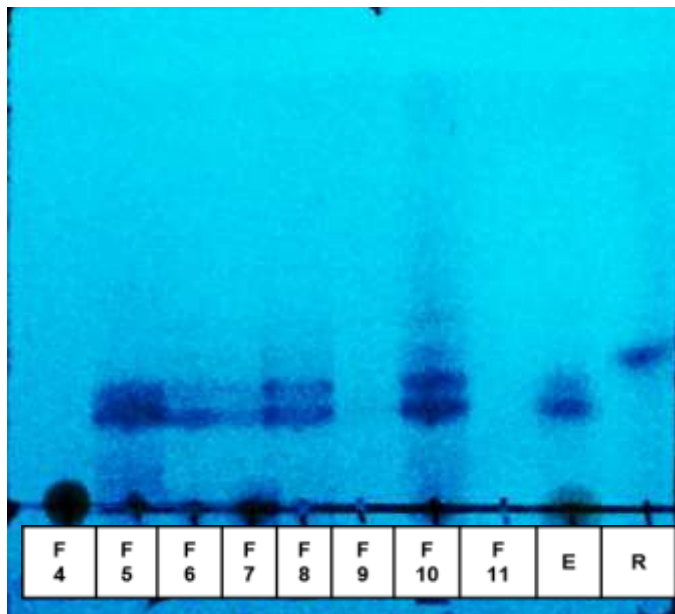
Posteriormente se utilizó un revelador de flavonoides sobre la misma placa en la que se pudieron observar diferentes tipos de coloraciones. La imagen C la cual representa la placa a luz normal se pueden observar manchas a un Rf de 0.3 en los grupos F5, F6, F7, F8, F10 y el extracto integro (E), con una coloración amarilla. Adicionalmente podemos observar manchas color naranja a un Rf de 0.4-0.5 en los mismos grupos de fracciones y en el estándar de rutina. Para obtener una mejor apreciación de los compuestos presentes en la placa se observó la placa a en UV a una onda corta de 254 nm y se observaron manchas en color verde a un Rf de 0.3 en los grupos F5, F6, F7, F8, F10 y el extracto integro (E). Finalmente, en las fracciones F5, F8, F10 y E se puede observar machas azul claro a un Rf de 0.7, sin embargo, en los grupos F8 y F10 se observan unas manchas en azul claro en la parte superior a un Rf de 0.9.



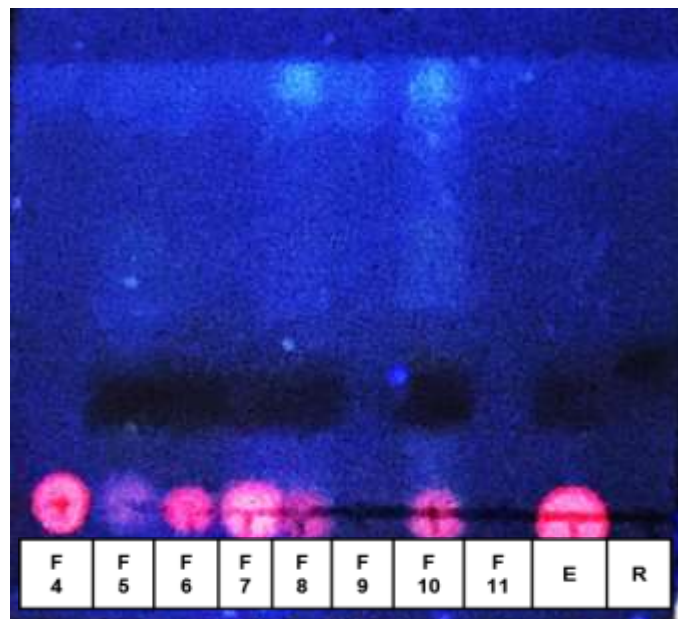
Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



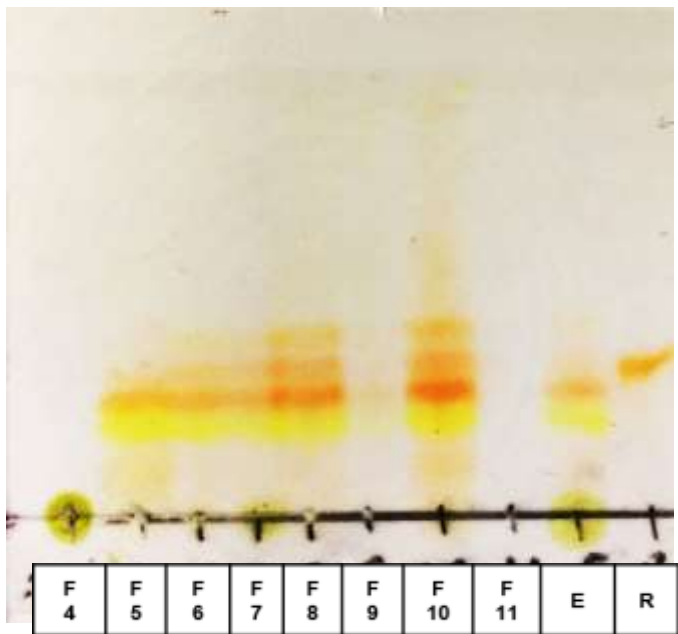
A) Onda corta: 254 nm



B) Onda larga: 365 nm



C) luz visible



D) Onda corta: 254 nm

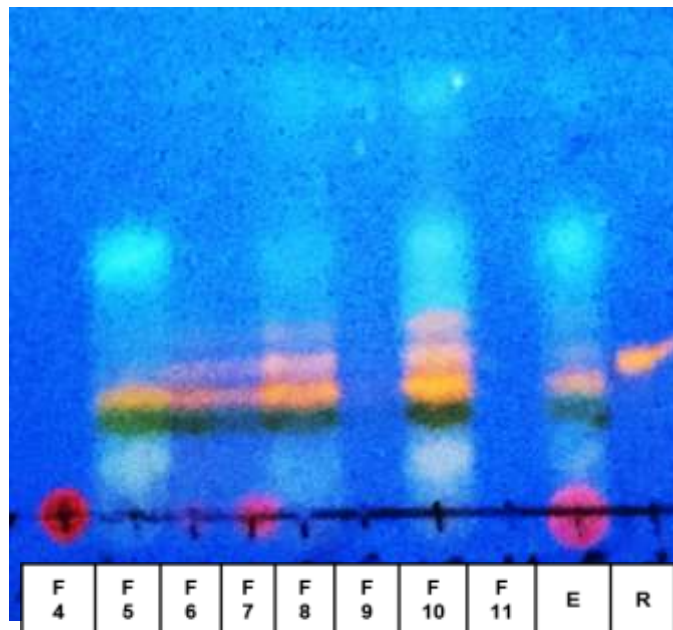


Figura 24. Cromatografías en fase reversa de los grupos de fracciones 5 a 11 a diferentes longitudes de onda UV (A y B) y con un revelador de flavonoides (C y D).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente podemos observar que en la Figura 23 se utilizó un estándar de terpenos debido a que anteriormente se han encontrado este tipo de compuestos en estos grupos de fracciones⁸⁸. De acuerdo a las marcas presentadas con el revelador de 4-Hidroxibenzaldehído en la placa, se puede determinar que las manchas con coloraciones moradas presentadas corresponden posiblemente a triterpenos glicosilados (saponinas) que son característicos para ese tipo de marcas, anteriormente se han caracterizado terpenos como α -tocoferol y escualeno a los cuales se les ha atribuido actividad cicatrizante en la misma especie^{89,90}.

En la Figura 24 se utilizó un estándar de rutina, el cual es un flavonoide que de acuerdo a la bibliografía se encuentra principalmente en esta especie³. Después de utilizar el revelador de flavonoides se mostraron en la placa coloraciones amarillas a un Rf de 0.3 las cuales posiblemente corresponden a compuestos flavonoides, también se observaron manchas de color naranja a un Rf de 0.4 las cuales corresponden con el estándar de rutina, esto quiere decir que posiblemente encontremos este compuesto en esos grupos de fracciones, sin embargo, esas marcas también son características de quercetina y ramnósidos de quercetina. Adicionalmente la placa observada a UV en onda corta de 254 nm muestra manchas de color verde a un Rf de 0.3 las cuales posiblemente correspondan a glucósidos de kaempferol y marcas en coloración azul claro a un Rf de 0.7 las cuales son características de ácido isoclorogénico y a un Rf de 0.9 las cuales posiblemente correspondan a ácido clorogénico. Por otra parte, se han realizado estudios en otras especies de *Bougainvillea* en los cuales se han caracterizado flavonoides a los cuales se les atribuye a promover la actividad cicatrizante como la quercetina, apigenina, kaempferol, luteolina y rutina^{91,92,93}.



7.2.3. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) DE LOS GRUPOS DE FRACCIONES

Adicionalmente al análisis cromatográfico en capa fina se realizó una evaluación mediante CLAR o HPLC en sus siglas en inglés, para los grupos de fracciones F-5, F-7, F-8, F-9, F-10 y F-11 ya que de acuerdo con sus características fisicoquímicas y el sistema empleado el cual fue ácido trifluoroacético: metanol en este análisis se pueden identificar algunos de los compuestos presentes en estos grupos de fracciones.

Fracción F5

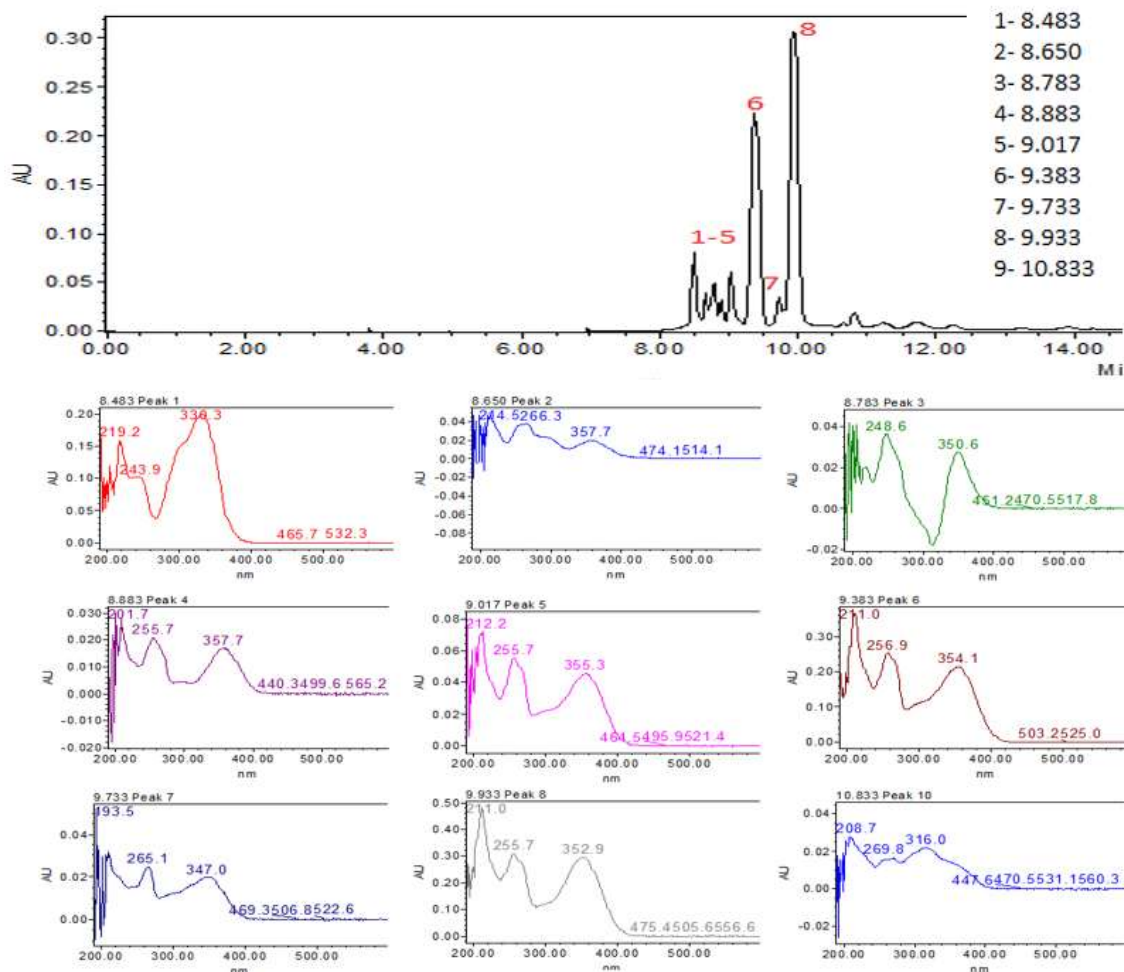


Figura 25. Cromatograma HPLC del grupo de fracción 5 del extracto cetónico de *Bxb*.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el cromatograma de la F-5 (Figura 25) podemos observar picos con un tiempo de retención a partir de los 8 min, en el cual de acuerdo con los espectros UV se destacan los picos 7 a 9.733 nm el cual es característico para glucósidos de kaempferol y el pico 8 a 9.933 nm el cual es característico de los ramnosidos de quercetina.

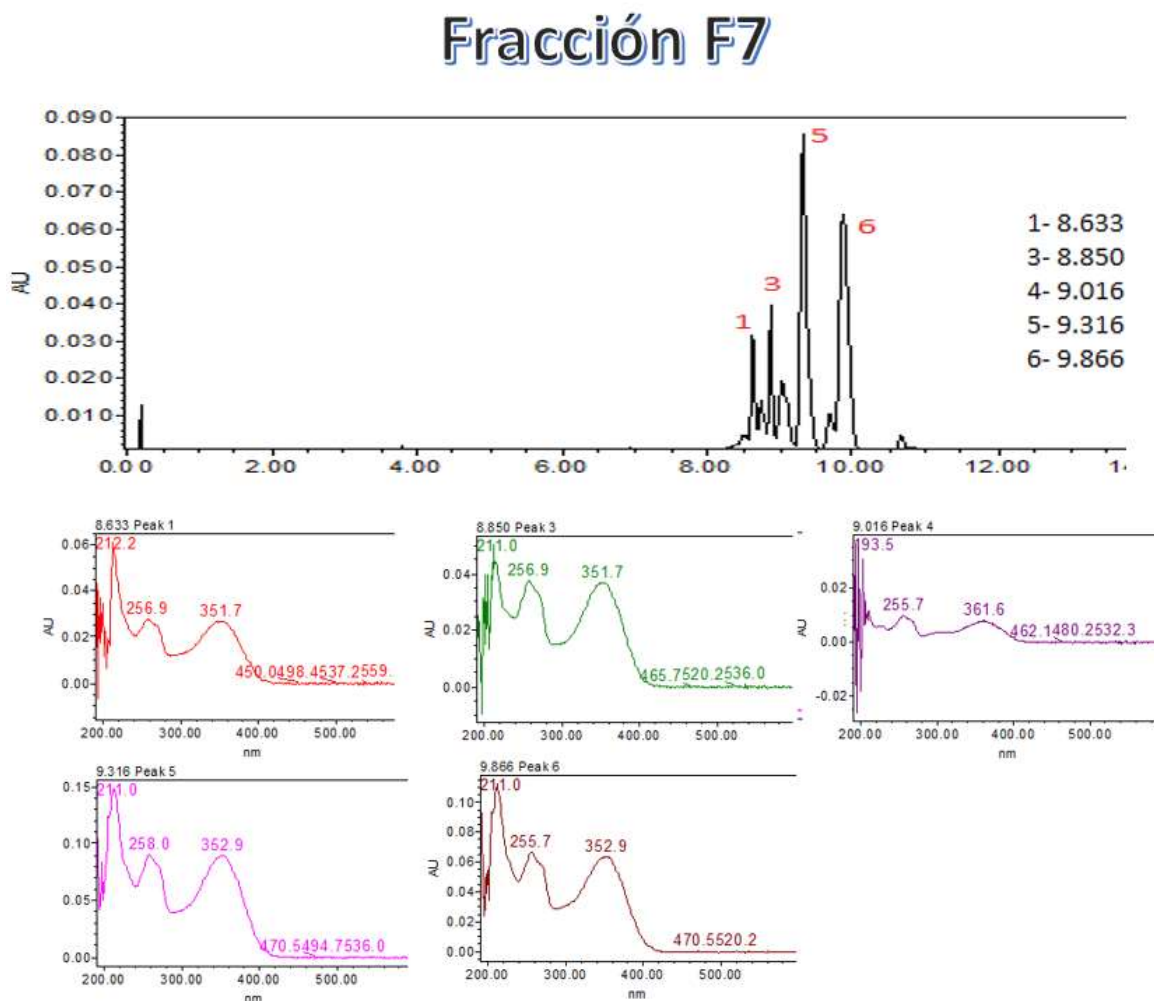


Figura 26. Cromatograma HPLC del grupo de fracción 7 del extracto cetónico de *Bxb*.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el cromatograma de la F-7 (Figura 26) el cual de acuerdo con el análisis en TLC presta características similares a la F-6, podemos observar picos a con un tiempo de retención a partir de los 8.5 min, el cual podemos destacar de acuerdo con los espectros UV los picos 5 a 9.316 nm el cual es característico de glucósidos de kaempferol y el pico 6 a 9.866 nm el cual es característico de ramnosidos de quercetina.

Fracción F8

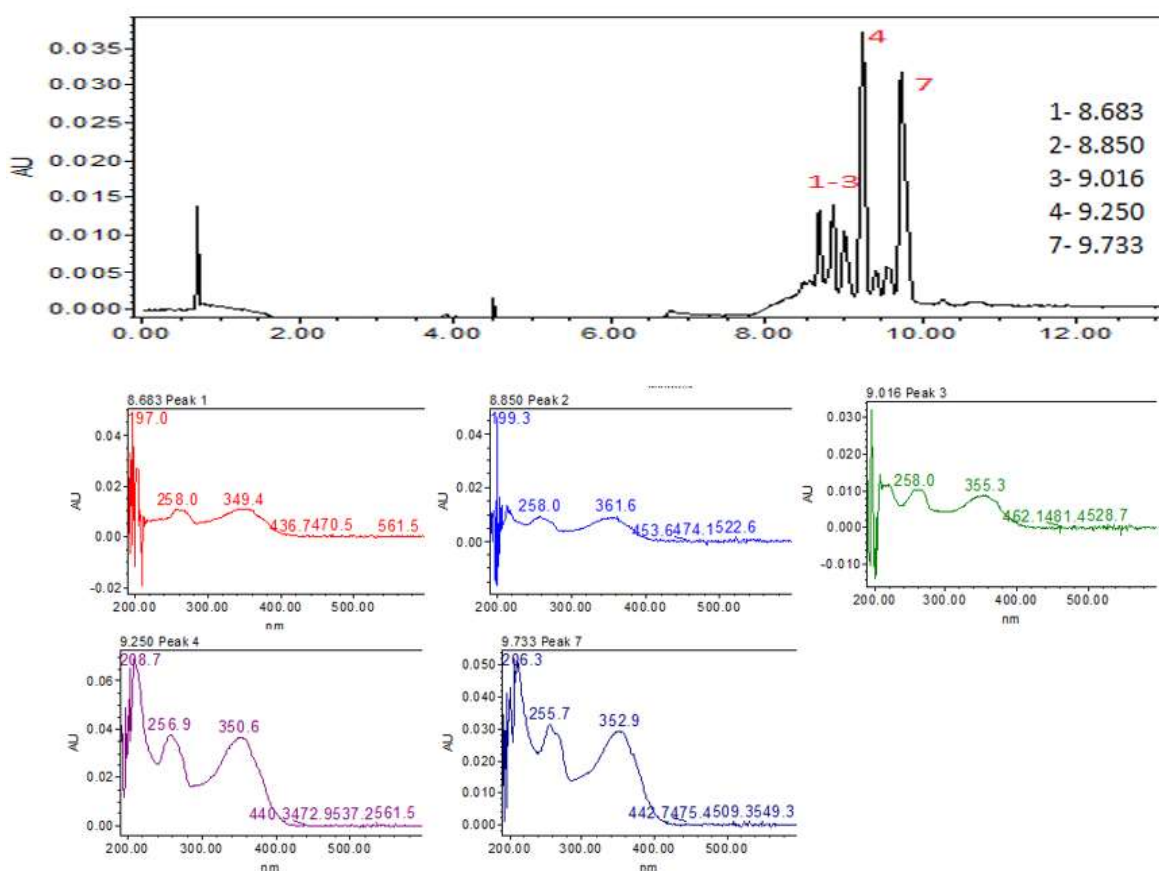


Figura 27. Cromatograma HPLC del grupo de fracción 8 del extracto cetónico de *Bxb*.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el cromatograma de la F-8 (Figura 27) podemos observar picos con un tiempo de retención en 1, 4.5 y 8.5 min, sin embargo, los picos que destacan se encuentran en este último tiempo, de acuerdo con los espectros UV podemos destacar los picos 3 a 9.016 min el cual es característico de rutina y el pico 7 a 9.733 nm el cual es característico para glucósidos de kaempferol.

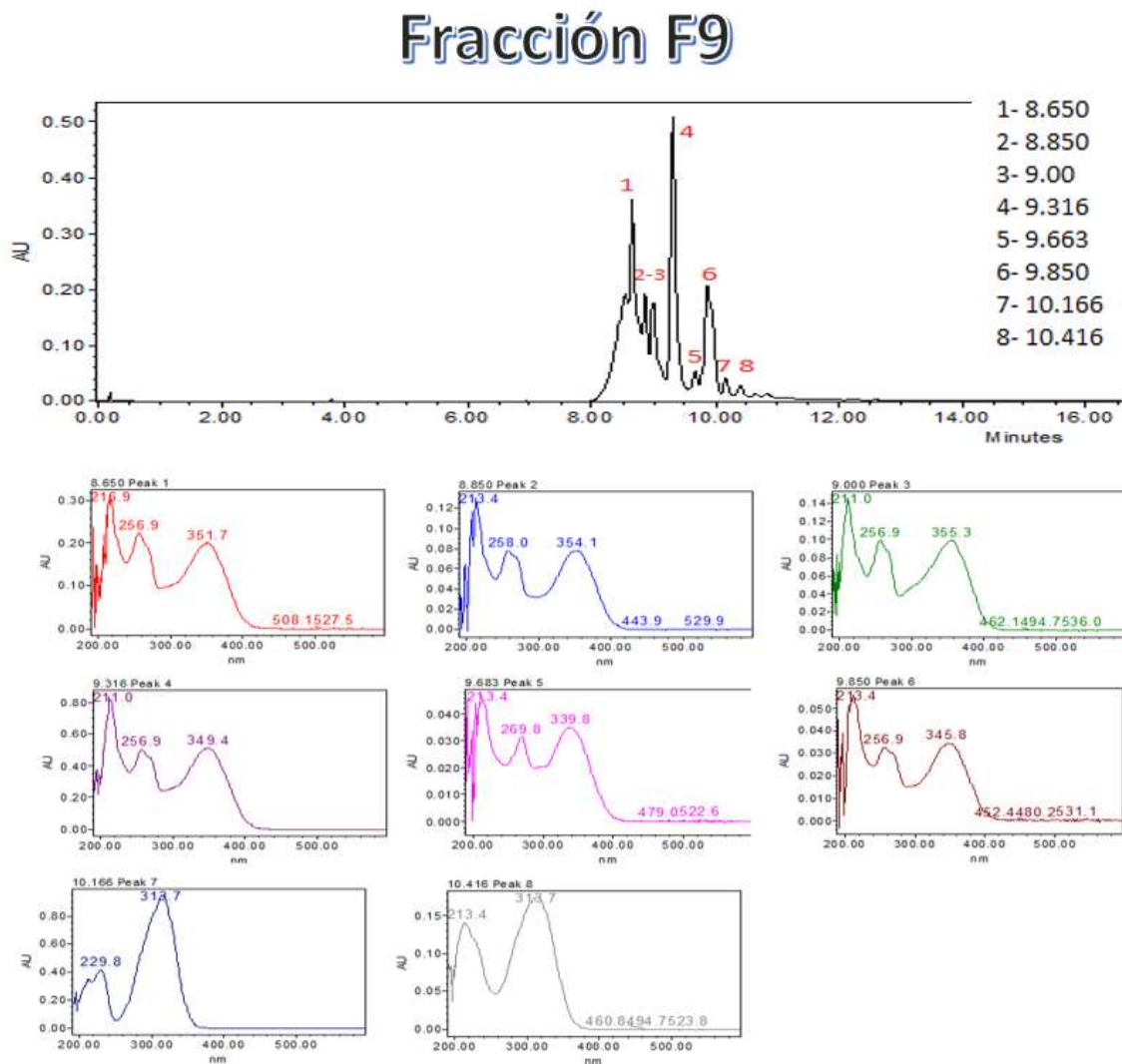


Figura 28. Cromatograma HPLC del grupo de fracción 9 del extracto cetónico de *Bxb*.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el cromatograma de la F-9 (Figura 28) podemos observar la presencia de picos a partir de un tiempo de retención de 8 min y que de acuerdo con los espectros UV se destaca la presencia de los picos 5 a 9.663 nm el cual es característico de las flavonas, el pico 7 a 10.166 nm el cual es característico del ácido cumárico y el pico 8 a 10.416 nm el cual es característico de los cumaratos.

Fracción F10

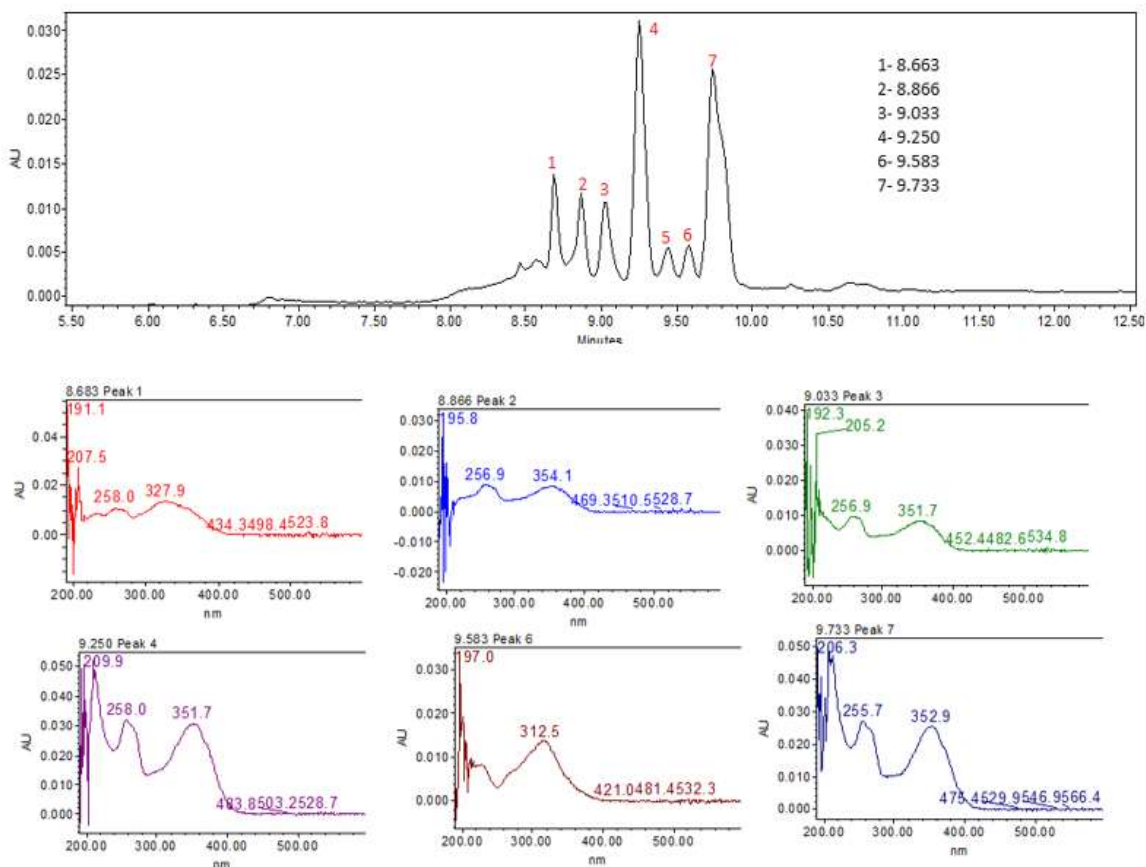


Figura 29. Cromatograma HPLC del grupo de fracción 10 del extracto cetónico de *Bxb*.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el cromatograma de la F-10 (Figura 29) podemos observar picos a partir de un tiempo de retención de 8.5 min, en el que de acuerdo con los espectros UV se destacan los picos 1 a 8.663 nm el cual es característico del ácido clorogénico, el pico 2 a 8.866 nm el cual es característico a flavonoides de quercetina, el pico 3 a 9.033 nm el cual es característico de la rutina, el pico 4 a 9.250 nm y el pico 7 a 9.733 nm el cual es característico a los ramnosidos de quercetina.

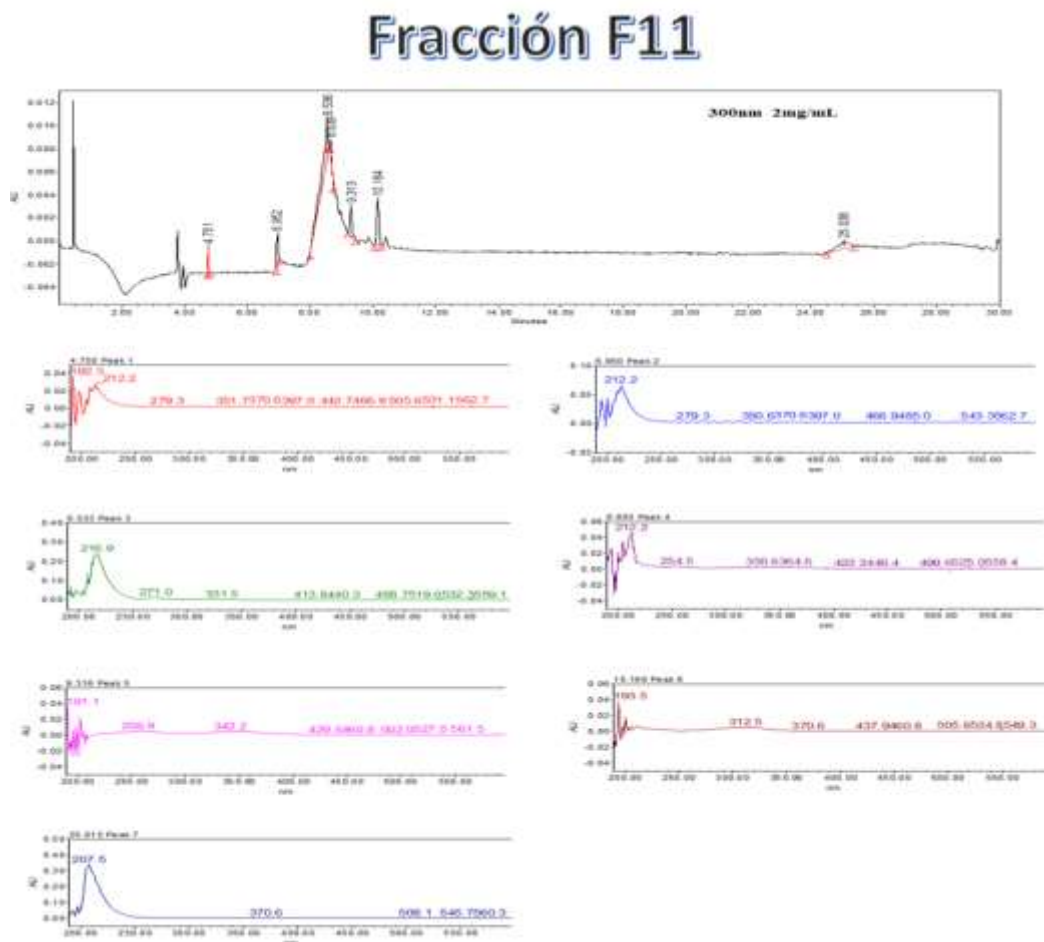


Figura 30. Cromatograma HPLC del grupo de fracción 11 del extracto cetónico de *Bxb*.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el cromatograma F-11 (Figura 30) podemos observar picos a partir de los tiempos de retención 1, 4, 4.5, 7. 8 y 10 min. Sin embargo, al analizar los espectros UV podemos observar la presencia de compuestos que por su polaridad no logran ser visualizados de manera adecuada, por lo que se tendría que utilizar otro tipo de sistema en el HPLC para poder determinar qué tipo de compuestos son.

De acuerdo con los cromatogramas observados anteriormente y tomando en cuenta los espectros UV y las características observadas en las TLC podemos establecer que en el caso de la F-5 posiblemente se le puede atribuir la coloración verde y naranja las cuales corresponderían a los picos 7 y 8 respectivamente a la presencia de compuestos como kaempferol y ramnosidos quercetina. En el cromatograma de la F-7 los picos 5 y 6 los cuales de acuerdo con los espectros UV posiblemente correspondan a kaempferol y ramnosidos de quercetina a los cuales se les atribuye las coloraciones verde y naranja respectivamente y que podemos observar en las TLC. En el cromatograma de la F-8 los picos 3 y 7 los cuales de acuerdo con los espectros UV posiblemente correspondan a la rutina y glucósidos de kaempferol respectivamente, los cuales son característicos para las coloraciones naranja y verde presentes en las TLC. En el cromatograma de la F-9 los picos 5, 7 y 8 los cuales de acuerdo con los espectros UV posiblemente correspondan a flavonas, ácido cumárico y cumaratos respectivamente, los cuales son característicos para las coloraciones amarillas y/o naranjas presentes en las TLC. En el cromatograma de la F-10 los picos 1, 2, 3, 4 y 7 de acuerdo con los espectros UV posiblemente correspondan a ácido clorogénico, flavonoides de quercetina, rutina y ramnosidos de quercetina respectivamente, sean los responsables de las coloraciones azul-blanco en el caso del pico 1 y naranja para los demás compuestos en las TLC. Al comparar la TLC con el cromatograma de la F-11 podemos comprobar que el sistema empleado no es el adecuado para ese tipo de compuestos presentes en esa fracción en específico.



7.3. EVALUACIÓN TÓPICA DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *Bougainvillea x buttiana* Y LAS FRACCIONES OBTENIDAS

Una vez identificados algunos compuestos presentes en el extracto acetónico de *Bxb* y sus 11 grupos de fracciones, se realizó un ensayo para evaluar el efecto cicatrizante de cada uno de ellos, los cuales fueron adicionados a la formulación de una crema base para su posterior aplicación vía tópica durante los primeros 3 días a partir de la realización de la incisión en los ratones, de esta manera se consideró para los diferentes tratamientos el diseño experimental que se observa en la Tabla 10.

Tabla 10. Diseño experimental para la evaluación tópica de los diferentes tratamientos problema.

GRUPO EXPERIMENTAL	TRATAMIENTO	
1	Control negativo	Sin tratamiento
2	Control positivo	KitosCell
3	Vehículo	Crema base
4	Tratamiento 1	EABxb
5	Tratamiento 2	Grupo de fracciones 1
6	Tratamiento 3	Grupo de fracciones 2
7	Tratamiento 4	Grupo de fracciones 3
8	Tratamiento 5	Grupo de fracciones 4
9	Tratamiento 6	Grupo de fracciones 5
10	Tratamiento 7	Grupo de fracciones 6
11	Tratamiento 8	Grupo de fracciones 7
12	Tratamiento 9	Grupo de fracciones 8
13	Tratamiento 10	Grupo de fracciones 9
14	Tratamiento 11	Grupo de fracciones 10
15	Tratamiento 12	Grupo de fracciones 11



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Una vez formados los grupos experimentales se evaluó durante un periodo de 13 días el tamaño de la herida, la cinética de cierre de la herida y las características físicas visibles, al término de los 13 días se determinaron el porcentaje de contracción de la herida de cada uno de los grupos experimentales.

Existen diferentes factores que promueven de manera adecuada la cicatrización de tejidos, dentro de las cuales podemos encontrar: la limpieza de la herida, la activación de macrófagos, la proliferación de fibroblastos, la producción de la matriz extracelular y la nueva formación de vasos sanguíneos. En este sentido, un buen tratamiento para las heridas debe permitir una buena debridación para la formación de tejido granular y posteriormente la epitelización del tejido restante⁹⁴.

Estudios existentes relacionados al efecto cicatrizante de *Bougainvillea glabra*, han demostrado efectos beneficiosos en modelos murino, destacando, el aumento significativo en la contracción de la herida, resistencia a la rotura de la herida, aumento del tejido de granulación en la curación de heridas⁶⁸. En este sentido *B. x buttiana* al resultar de la cruce de *B. glabra* y *B. peruviana*, debería presentar componentes que ayuden a promover la cicatrización de heridas.



7.3.1. CINÉTICA DE CICATRIZACIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

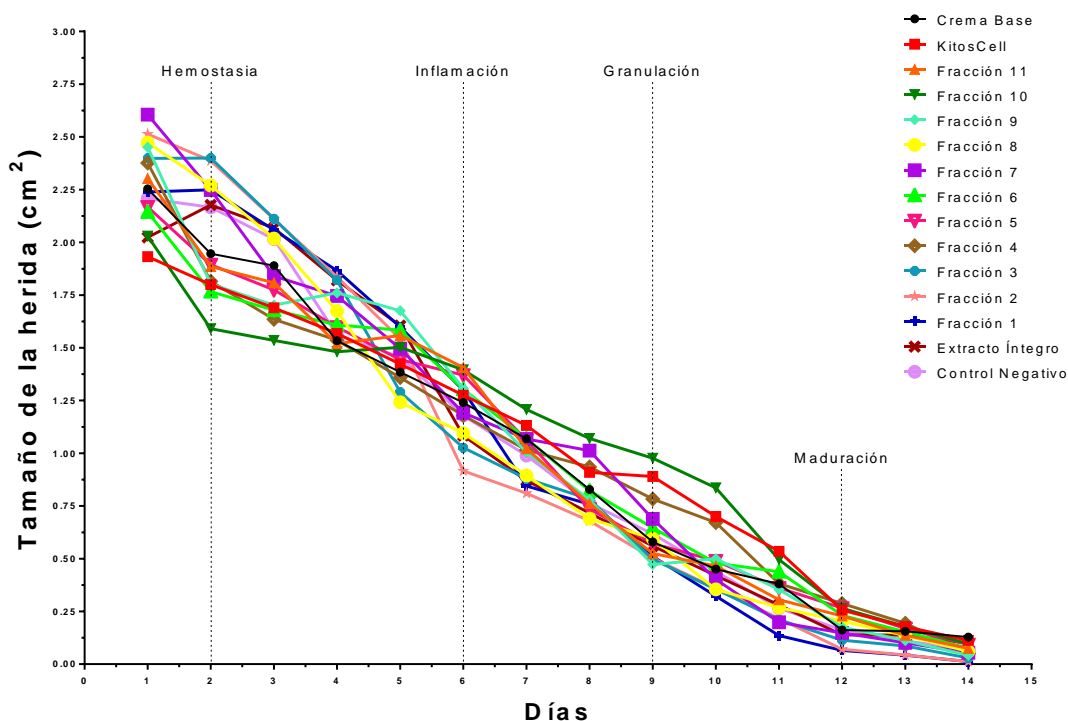


Figura 31. Cinética del cierre del tamaño de la herida de los días 1 al 14 (Datos crudos).

Al finalizar el ensayo se obtuvieron los siguientes datos crudos de la cinética del cierre de la herida (Figura 31) en donde se puede observar el comportamiento de cada uno de los grupos de experimentación a lo largo del ensayo (1-13 días), se puede comparar a simple vista como va disminuyendo el tamaño de la herida de los diferentes grupos conforme avanzan los días y cuáles de ellos presentan un mayor cierre de la herida en relación con los demás grupos, sin embargo para poder hacer un mejor análisis de la cinética de cicatrización se realizó una normalización de los datos (Figura 32) en el cual cada una de las curvas parte de un mismo punto, de esta manera podemos apreciar como decrece cada una de ellas y poder observar con mayor precisión cuál de los tratamientos aplicados generó un mayor cierre de la herida, tomando como referencia el control negativo al cual no se le aplicó ningún tipo de tratamiento para poder conocer al grupo experimental con mayor actividad.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

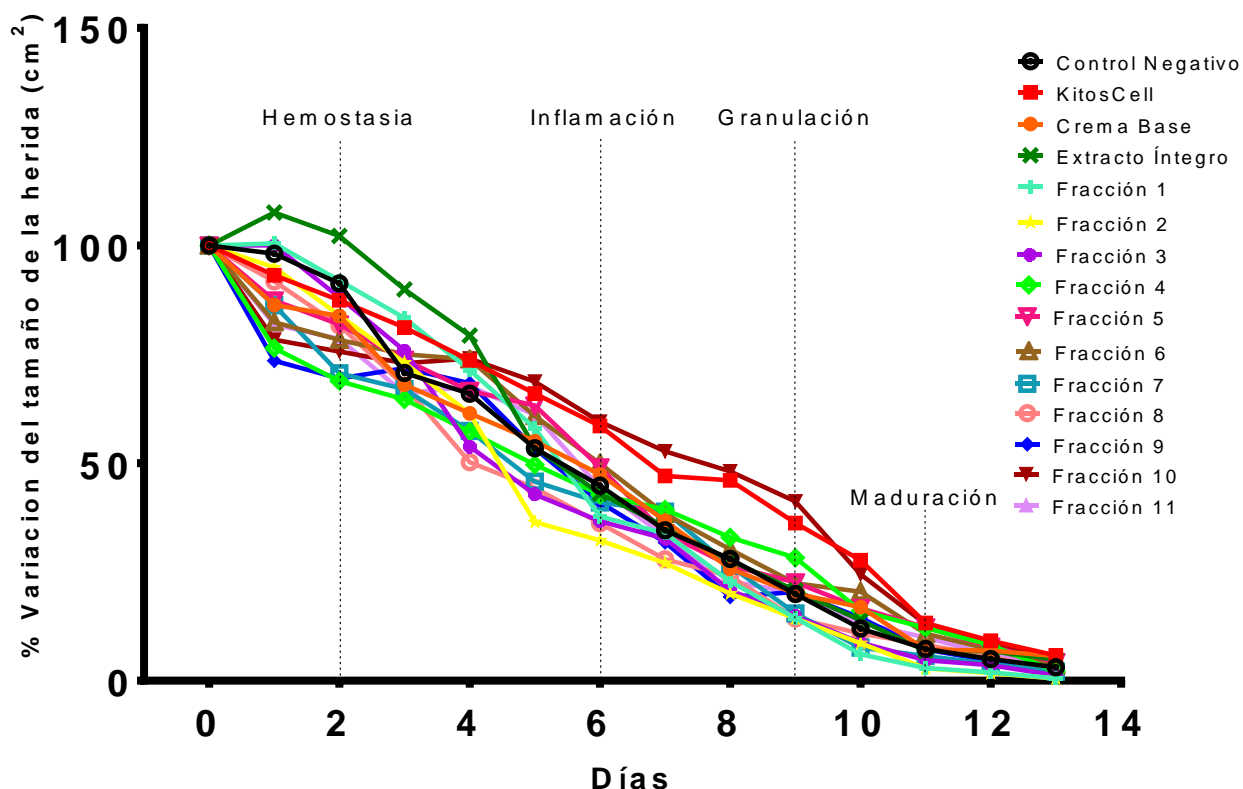


Figura 32. Cinética del cierre del tamaño de la herida de los días 1 al 14 (Datos normalizados).

Una vez realizada la normalización de los datos podemos comparar el comportamiento de cada uno de los grupos experimentales por día y se puede identificar con mayor facilidad los cambios en la cinética del cierre de la herida, destacando los días que corresponden a cada una de las fases de cicatrización en comparación con el control negativo, de esta manera podemos observar que en los días 0-3 de la figura 33, el día 0 no presentan cambios significativos ya que parten de un mismo punto, es decir, del 100% del tamaño de la herida para poder hacer las comparaciones posteriores. Para el día 1 se pueden observar disminuciones en el tamaño de la herida de manera significativa para los grupos de fracciones 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11 en comparación con el control negativo, destacando a la fracción 9 con un 73.54% del área total de la herida abierta, es decir con un 26.46% de efecto cicatrizante, cabe mencionar que estos grupos de fracciones corresponden a las fracciones que presentaron flavonoides en los análisis anteriores.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el día 2 el cual corresponde a la fase de homeostasis nuevamente se presentó una disminución significativa por parte de los grupos de fracciones 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 en comparación con el control negativo, destacando nuevamente a la fracción 9 con un 69.44% del área total de la herida abierta, es decir con un 30.55% de efecto cicatrizante para este grupo de fracción. Para el día 3 existe una disminución significativa por parte de los grupos de fracciones 4 y 11 en comparación con el control negativo, destacando la fracción 4 con un 64.63% del área total de la herida abierta, presentando un 35.36% de efecto cicatrizante por parte de esta fracción, manifestándose una tendencia de disminución del cierre de la herida hasta este día por los grupos de fracciones los cuales contienen flavonoides.

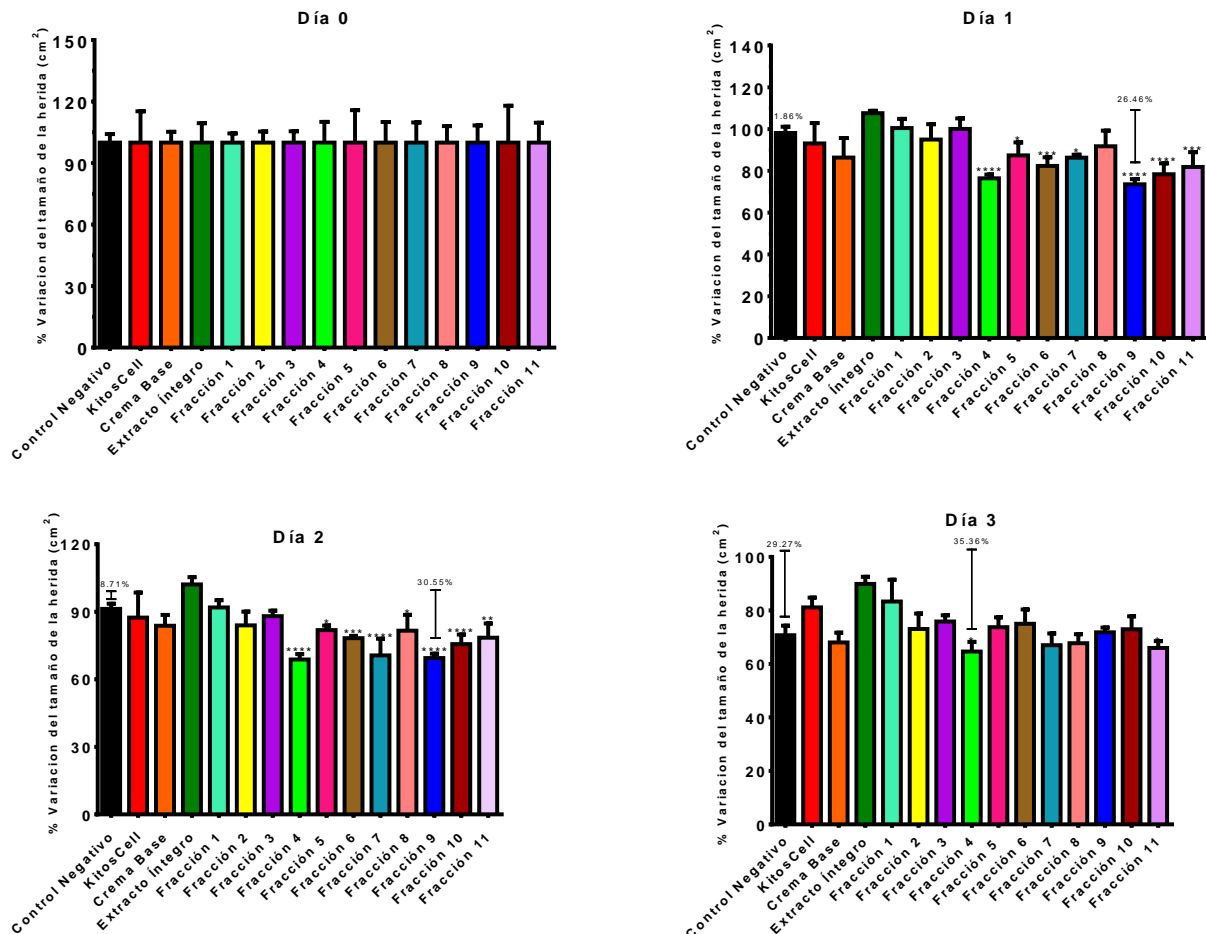


Figura 33. Área bajo la curva del primer periodo (fase de hemostasia). Los valores corresponden a la media (n=6, \pm EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En los días 4-7 de la figura 34, podemos observar que en el día 4 existe una disminución significativa del tamaño de la herida por parte de los grupos de fracciones 3, 4, 7, y 8, destacando a la fracción 8 con el 50.21% del área total de la herida abierta el cual corresponde a un 49.79% de efecto cicatrizante por parte de este grupo, destacando la presencia de flavonoides en esta fracción. En el día 5 existe una disminución significativa por parte de los grupos de fracciones 2 y 3 destacando a la fracción 2 la cual presentó un 42.78% del área total de la herida abierta el cual corresponde a un 57.21% del efecto cicatrizante para este grupo, destacando la presencia de terpenos en esta fracción. El día 6 el cual corresponde a la fase de inflamación, se presentó diferencias significativas favorables por parte del grupo de la fracción 2 únicamente en comparación con el control negativo, destacando a la fracción 2 la cual presentó una 32.23% del área total de la herida el cual corresponde al 67.77% del efecto cicatrizante, destacando la presencia de terpenos para esta fracción. En el día 7 existe una disminución significativa por parte los grupos de fracciones 2, 8 y 9 en comparación con el control negativo, destacando el grupo 2 con un 27% del área total de la herida el cual representa un 72% del efecto cicatrizante, destacando la presencia de terpenos en esta fracción.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

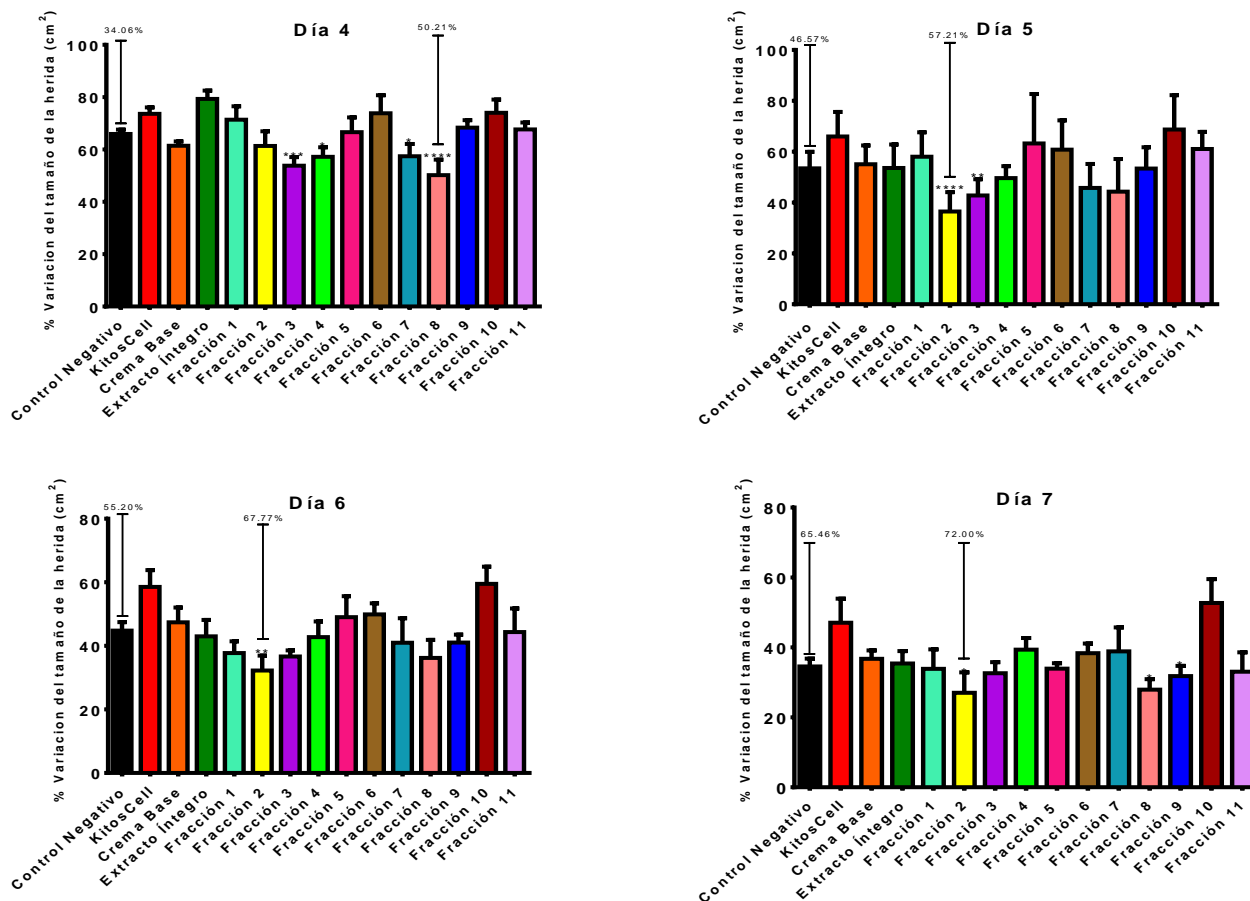


Figura 34. Área bajo la curva del segundo periodo (fase de inflamación). Los valores corresponden a la media (n=6, \pm EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

En los días 8-10 de la figura 35, podemos observar que en el día 8 se presentan diferencias significativas por parte de los grupos de fracciones 2 y 9 en comparación con el control negativo, destacando ambas fracciones las cuales presentaron un 20% del área total de la herida el cual corresponde al 80% del efecto cicatrizante, destacando la presencia de terpenos en esta fracción. El día 9 el cual corresponde a la fase de granulación se presentaron diferencias significativas por parte de las fracciones 2, 3, 7 y 8, destacando a la fracciones 2 y 8 con un 14.32% del área total de la herida el cual corresponde al 85.68% del efecto cicatrizante, destacando la presencia de terpenos y de flavonoides respectivamente para esas fracciones.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



El día 10 presento diferencias significativas por parte de los grupos de fracciones 1 y 7 en comparación con el control negativo, destacando la fracción 1 con un 6.05% del área total de la herida el cual corresponde al 93.94% del efecto cicatrizante, destacando la presencia de terpenos en esa fracción.

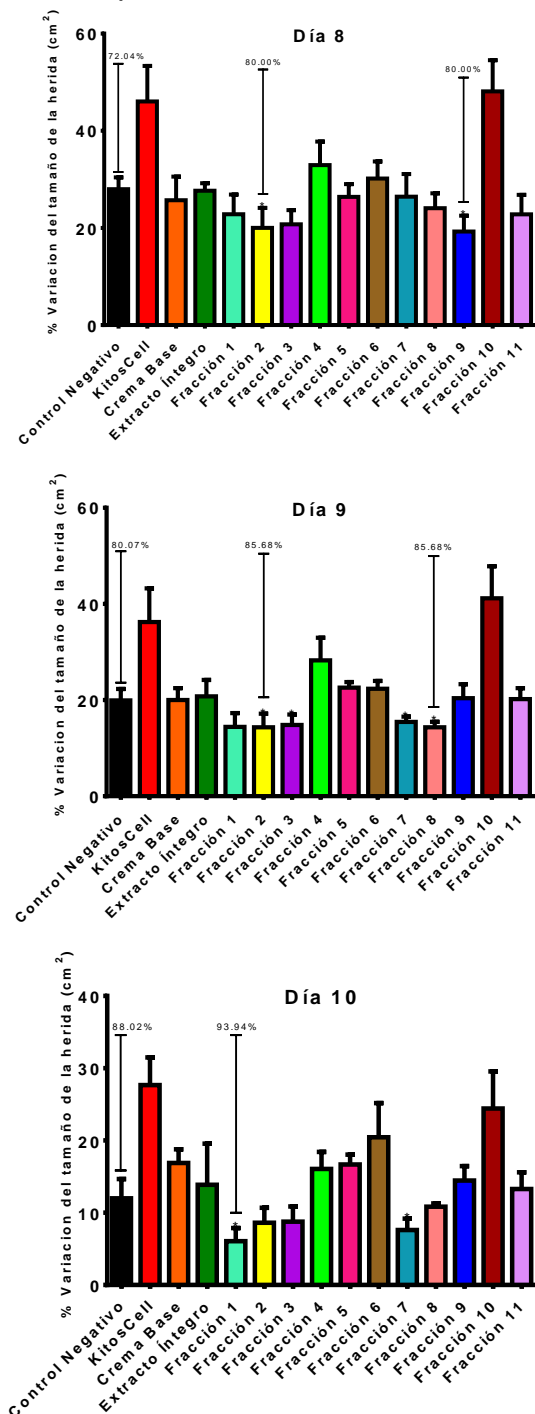


Figura 35. Área bajo la curva del tercer periodo (fase de granulación). Los valores corresponden a la media (n=6, \pm EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey ($*p < 0.05$).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En los días 11-13 de la gráfica 36, podemos observar en el día 11 diferencias significativas por parte de los grupos de fracciones 1 y 2 en comparación con el control negativo, destacando el grupo 2 con un 2.80% del área total de la herida el cual representa un 97.19% del efecto cicatrizante, destacando la presencia de terpenos en esta fracción.

En el día 12 existen diferencias significativas por parte de los grupos de fracciones 1 y 2 nuevamente en comparación con el control negativo, destacando el grupo 2 con un 1.71% del área total de la herida el cual corresponde al 98.29% del efecto cicatrizante, destacando la presencia de terpenos en esta fracción.

Finalmente, para el día 13 el cual fue el final del ensayo, se observaron diferencias significativas por parte de los grupos de fracciones 1, 2 y 3 en comparación con el control negativo, destacando al grupo 2 con un 0.49% del área total de la herida el cual corresponde a un 99.51% del efecto cicatrizante por parte de esta fracción.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

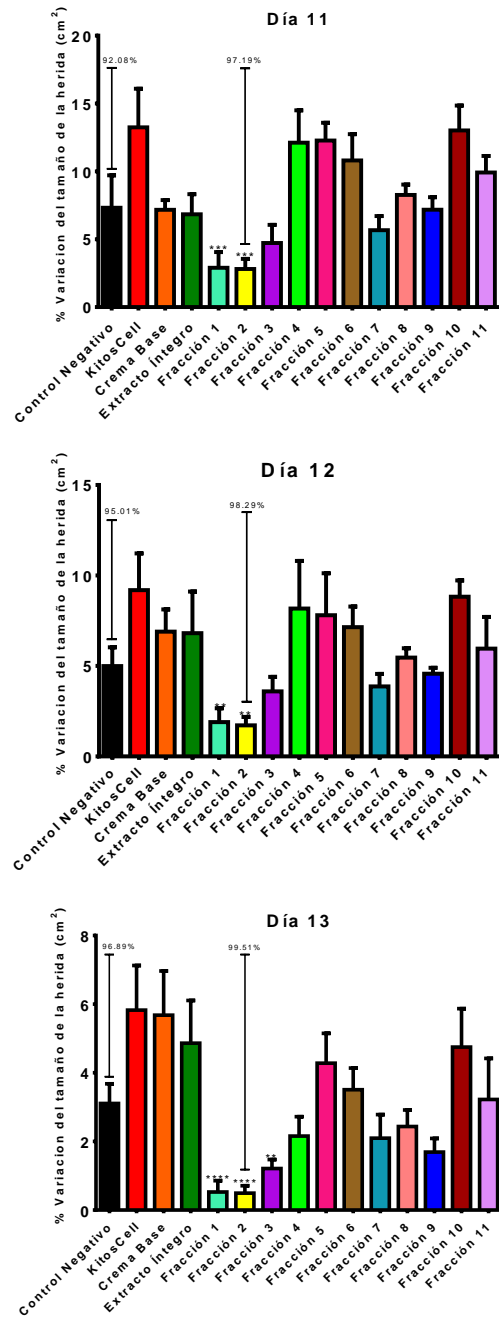


Figura 36. Área bajo la curva del cuarto periodo (fase de maduración). Los valores corresponden a la media (n=6, \pm EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



De acuerdo con los resultados podemos determinar que el comportamiento de cada uno de los grupos experimentales es de acuerdo con la interacción generada por parte del tratamiento aplicado y los componentes celulares que actúan en cada una de las fases de cicatrización. En el primero periodo comienza la fase de hemostasia e intervienen la fibrina, plaquetas, leucocitos y macrófagos^{24,25}. La disminución de la herida por parte de los grupos de las fracciones 9, 10 y 11 posiblemente se debe a que los componentes presentes en esos grupos de fracciones ayuden a promover una cicatrización más rápida en comparación con los demás, disminuyendo el tamaño inicial de la herida.

El periodo dos de la fase de inflamación de los días 4, 5, 6 y 7 en la Figura 34, se caracteriza principalmente por la presencia de macrófagos y linfocitos^{24,25} por lo que es una fase de limpieza y de prevención de infecciones en la herida, en algunos casos la presencia de edema característico de esta fase podría generar un aumento en el tamaño de la herida. Cabe destacar que durante estos dos primeros periodos se genera un incremento de la adhesión, migración y proliferación de monocitos^{24,25} y concluye con el inicio de la fase inflamatoria.

En el periodo tres, en la Figura 35, existen diferentes procesos en los que intervienen componentes celulares como fibroblastos y capilares que intervienen en este periodo estimulando la capacidad angiogénica de estas células endoteliales^{24,25}. Por lo que no se muestran cambios significativos en el tamaño del área de la herida durante los días 8 y 9.

En el periodo cuatro, en la Figura 36, intervienen el colágeno, células epiteliales y tejido conectivo fibroso, el cual reemplazara al coágulo de fibrina^{24,25}, durante los días 10 y 11 ya se observa de manera significativa la reducción del tamaño de la herida generada por cada uno de los tratamientos experimentales. En los últimos días, se generan procesos de epitelización y remodelación de la herida en cada uno de los grupos experimentales, teniendo la participación activa de fibroblastos principalmente^{24,25}.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



De esta manera se puede demostrar que existen componentes presentes como terpenos y flavonoides en cada uno de los grupos de fracciones los cuales promueven de forma activa el proceso de cicatrización. Así mismo, se puede observar que existen grupos de fracciones como el 8, 9, 10 y 11 los cuales desde las primeras etapas comienzan a cerrar la herida de forma significativa, por otra parte, grupos de fracciones como el 1, 2 y 3 a pesar de no tener una actividad en el cierre de la herida en las primeras etapas de la cicatrización, después de la segunda fase de inflamación y cuando se da la pérdida de la costra, mantienen un área de la herida más reducida con un tamaño aproximadamente de 0.005 cm² en comparación con otros grupos de fracciones.

De manera general al realizar un análisis de la disminución del tamaño de la herida a lo largo de 13 días del ensayo, se pudo determinar que los grupos de fracciones que presentaron un mayor promedio en el cierre y lograron una mayor contracción del tamaño de la herida fueron las fracciones 1, 2 y 3 (Tabla 11), obteniendo el 99.47%, 99.51% y el 98.79% del cierre total de la herida respectivamente.



7.3.2. EVALUACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DE LAS HERIDAS

Tabla 11. Porcentaje de contracción de la herida de cada uno de los grupos experimentales.

PORCENTAJE DE CONTRACCIÓN (%)				
Tratamiento	Grupo	Día 9	Día 11	Día 13
Control Negativo	1	93.06	96.60	96.89
KitosCell	2	90.05	93.34	94.17
Crema Base	3	88.02	93.22	94.32
EBxb	4	88.69	95.24	95.14
Fracción 1	5	98.60	99.43	99.47
Fracción 2	6	98.47	99.41	99.51
Fracción 3	7	96.70	98.63	98.79
Fracción 4	8	94.96	96.87	97.85
Fracción 5	9	91.27	94.77	95.72
Fracción 6	10	92.97	95.52	96.49
Fracción 7	11	94.89	97.03	97.90
Fracción 8	12	93.27	97.02	97.57
Fracción 9	13	95.88	97.57	98.31
Fracción 10	14	92.02	93.72	95.25
Fracción 11	15	92.73	95.90	96.78

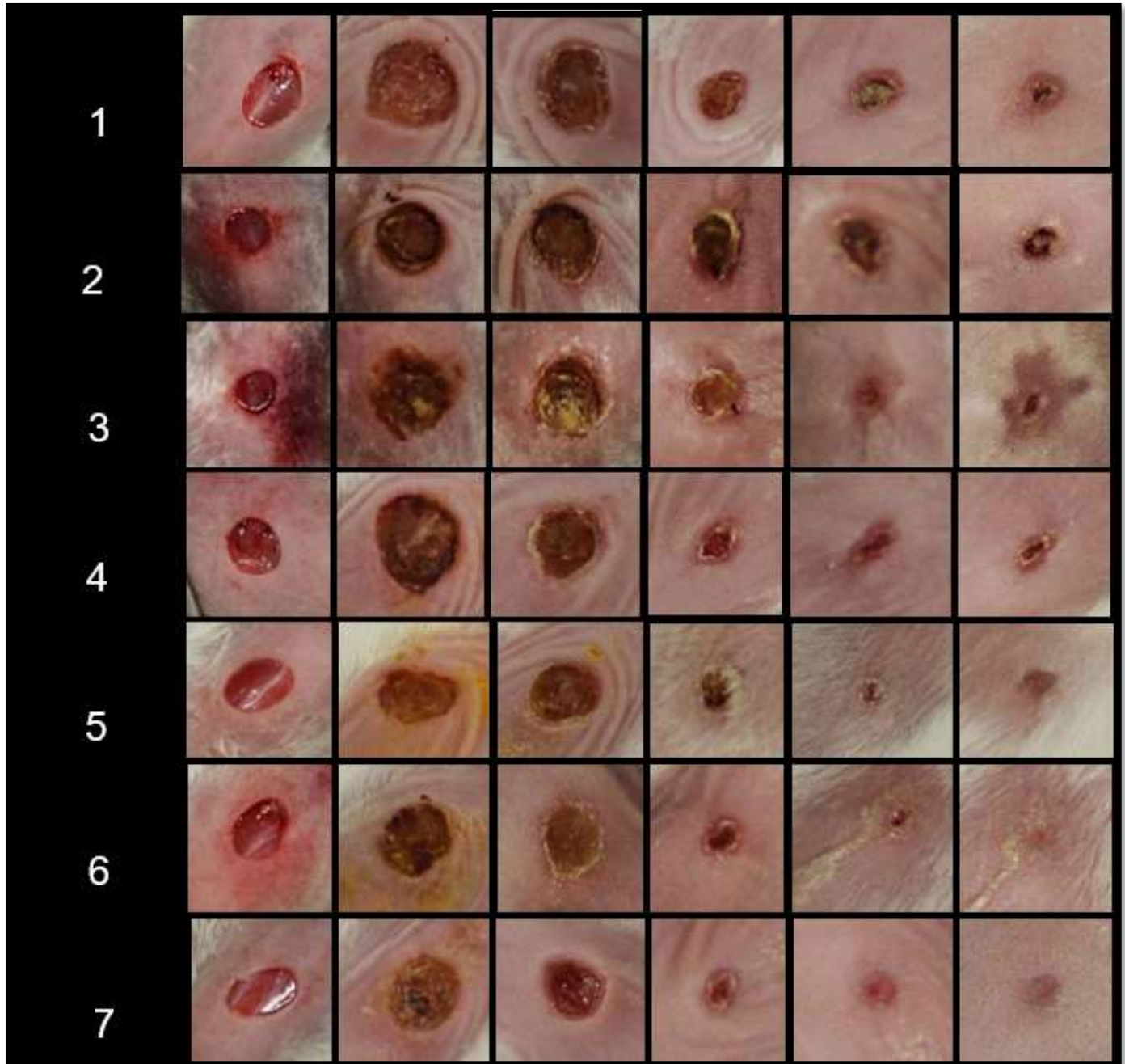
Adicionalmente podemos observar que en comparación con la contracción del control negativo este grupo de fracciones supero con aproximadamente un 4% adicional. Por otra parte, de manera macroscópica podemos observar el comportamiento de cada una de las heridas desde el inicio del experimento hasta su conclusión en cada uno de los grupos experimentales, destacando los días que corresponden a las diferentes fases de cicatrización en la Figura 37.

Se pueden apreciar heridas limpias, sin signos de infección, demostrando la actividad antibacteriana de la especie *Bougainvillea x buttiana*³, incluso se muestra un crecimiento de pelo en los grupos experimentales 3, 5, 6, 11, 12 y 13. Demostrando de esta manera que los tratamientos aplicados en estos grupos, además de su actividad cicatrizante, posiblemente existan compuestos que ayuden a estimular el crecimiento de pelo en los ratones.



7.3.3. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS HERIDAS

I Grupo | Día 0 | Día 2 | Día 6 | Día 9 | Día 11 | Día 13 |





I Grupo I Día 0 I Día 2 I Día 6 I Día 9 I Día 11 I Día 13 I

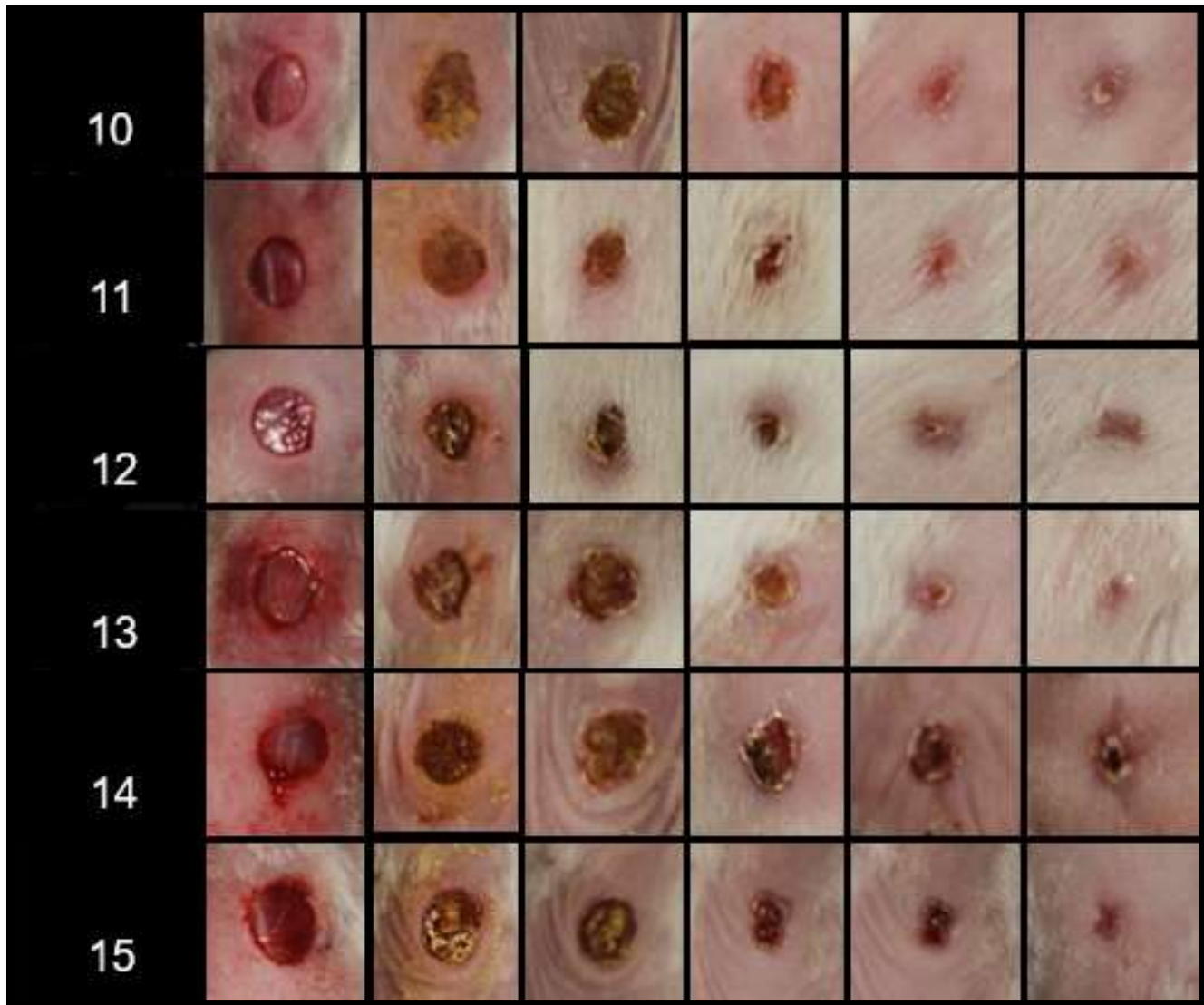


Figura 37. Comparación macroscópica del cierre de la herida entre los diferentes grupos experimentales de los días correspondientes a las fases de la cicatrización (días: 0, 2, 6, 9, 11 y 13).



7.3.4. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CICATRIZACIÓN

La velocidad de cicatrización depende de diferentes factores los cuales influyen directamente en el tamaño y ubicación de la herida, la higiene y la calidad de la respuesta inmune⁹⁵. Para poder conocer la velocidad de cicatrización de cada uno de los grupos experimentales se tomó en cuenta la medición de la herida desde el inicio del ensayo hasta su cicatrización y con base en los resultados obtenidos se pudo determinar el comportamiento de la velocidad de cada grupo a diferentes tiempos destacando los correspondientes a las fases de cicatrización a las 48, 144, 216, 264 y 312 horas.

Para poder tener una mejor apreciación de los datos de los diferentes grupos de fracciones se separaron en diferentes grupos como se muestran en la Figura 38. En la imagen A se representa la velocidad de cicatrización de las fracciones 1 a la 4, en donde podemos observar un aumento a partir de las 48 horas y un pico máximo de velocidad a las 144 horas por parte de los cuatro grupos de fracciones, tiempo el cual corresponde a la fase de inflamación, destacando a la F2 con una velocidad de $0.0166 \text{ cm}^2/\text{h}$ en comparación con los grupos F1, F3 y F4, posteriormente se observa una disminución progresiva de la velocidad de cicatrización hasta el final del ensayo.

En la imagen B se representa la velocidad de cicatrización de las fracciones 5 a la 8, podemos observar que por parte de las fracciones 5 y 6 el comportamiento de la velocidad parte de un punto máximo a las 48 horas (fase de hemostasia) entre 0.0080 y $0.0100 \text{ cm}^2/\text{h}$ respetivamente y comienza a decrecer la velocidad hasta el final del ensayo, en el caso de las fracciones 7 y 8 comienzan a aumentar su velocidad de cicatrización a partir de las 48 horas alcanzó un pico máximo a las 144 horas (fase de inflamación) por parte de ambas fracciones, destacando la fracción 8 con $0.1010 \text{ cm}^2/\text{h}$, finalmente comienza a disminuir la velocidad hasta el final del ensayo.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Posteriormente en la imagen C podemos observar la velocidad de cicatrización por parte de las fracciones 9 a la 11, en las cuales las fracciones 9 y 11 parten de un punto máximo de entre 0.0097 y 0.0080 cm²/h respectivamente, destacando la fracción 9 con mayor velocidad a las 48 horas en comparación con las fracciones 10 y 11, en el caso de la fracción 10 comienza un aumento de velocidad desde las 48 horas alcanzando una velocidad máxima de 0.006 cm²/h hasta las 312 horas (fin del ensayo).

Finalmente tomando en cuenta la velocidad de cicatrización de cada uno de los grupos de fracciones se pudo determinar que la F2 presento una mayor velocidad de cicatrización alcanzando puntos de velocidad más altos en comparación del resto de los grupos de fracciones de esta manera se realizó una comparación de esta fracción con los controles positivo y negativo, el vehículo y el extracto integro.

En la imagen D podemos observar el comportamiento de la fracción F2, la cual presenta una mayor velocidad de cicatrización desde las 48 y alcanzando un pico máximo a las 144 horas con 0.0116 cm²/h en comparación con los controles, el vehículo y el extracto integro los cuales presentan una velocidad de cicatrización menor en los cuales se presentó un pico máximo por parte del extracto integro a las 216 horas con una velocidad de 0.0090 cm²/h aproximadamente en comparación con los demás grupos excepto la F2.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

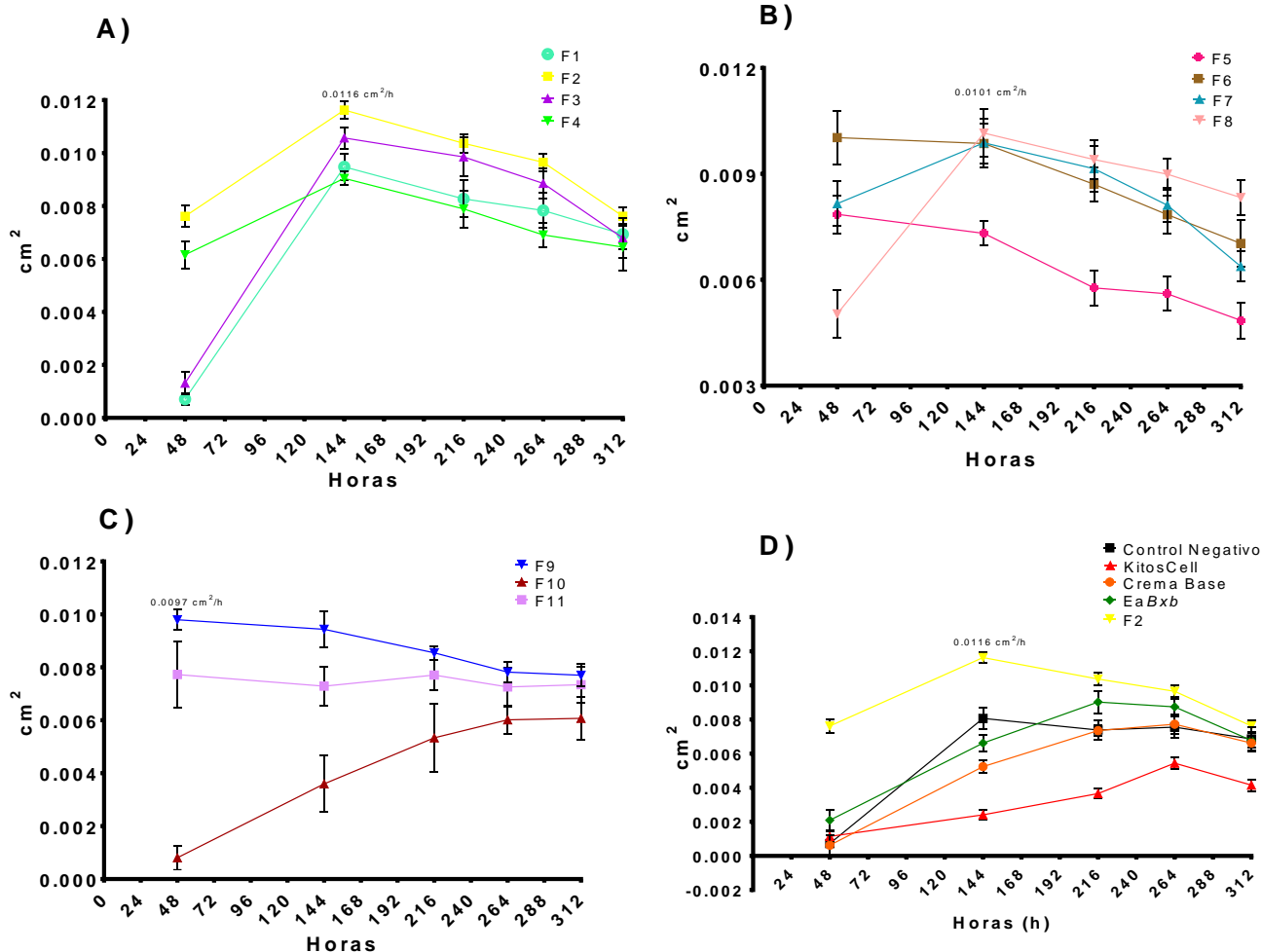


Figura 38. Velocidad de cicatrización de los diferentes grupos experimentales durante 13 días destacando los días correspondientes a las fases de cicatrización: A) Representación de la velocidad de cicatrización de los grupos de fracciones F1-F4, B) Representación de la velocidad de cicatrización de los grupos de fracciones F5-F8, C) Representación de la velocidad de cicatrización de los grupos de fracciones F9-F11, D) Comparación de la velocidad de cicatrización del grupo de fracción con mayor velocidad (F2) con el control positivo (KitosCell), control negativo, vehículo (crema base) y Extracto integro (EaBxb).

De esta manera podemos conocer que a pesar de que existen diferentes comportamientos en la velocidad de cicatrización por parte de los diferentes grupos de fracciones, la fracción 2 fue la que presentó una mayor velocidad a partir de las 144 horas hasta el final del ensayo en comparación con los demás grupos de fracciones de esta manera podemos observar que la información obtenida en los ensayos anteriores nos ayudan a conocer y demostrar que esta fracción presenta componentes como los terpenos los cuales promueven una mayor velocidad y efecto cicatrizante.



7.4. DETERMINACIÓN DE LAS CITOCINAS: TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 DEL GRUPO EXPERIMENTAL CON MAYOR EFECTO CICATRIZANTE

Una vez identificada la fracción 2 (F2) como la más activa después de realizar el ensayo de cicatrización, se realizaron pruebas bioquímicas para determinar la expresión de citocinas proinflamatorias y poder establecer cuál es su papel a nivel molecular. De tal manera que se realizó mediante ELISA la expresión de las citocinas proinflamatorias: TNF- α , IFN- γ e IL-6 y citocinas antiinflamatorias: IL-4, IL-5 e IL-10; las cuales son mediadores necesarios en la respuesta inflamatoria y favorecen una cicatrización adecuada de la herida⁹⁶. En este sentido se compararon las muestras obtenidas a partir de la fracción 2 (tratamiento más activo) y un control negativo (sin tratamiento) durante los días: 0, 1, 2, 6, 9, 11 y 13 los cuales corresponden a las fases de cicatrización y poder observar cómo actúan los componentes presentes en la fracción 2.

En el caso de las citocinas proinflamatorias (Figura 39) podemos observar que en el grafico A el cual corresponde a la IL-6 que el control negativo (CN) y la fracción 2 (F-2) alcanzan un pico máximo el día 6 el cual corresponde a la fase de inflamación con valores de 800 y 510 pg/mL respectivamente y a partir de este día comienza a decrecer la expresión de IL-6. Por otra parte, es importante mencionar que existen diferencias significativas en los niveles de IL-6 por parte del CN y la F-2 durante los días 2, 3, 6, 9 y 11, observándose una mayor concentración por parte del control negativo. Por otra parte, en el gráfico B de en medio el cual corresponde a la citocina proinflamatoria TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) existe una disminución significativa de los niveles de TNF- α por parte del grupo F-2 en comparación con el CN durante los días: 2, 3, 6, 9 y 11, alcanzando un pico máximo de expresión el día 6 (fase inflamatoria) con 950 pg/mL del CN y 660 pg/mL de la F-2. Finalmente, en el grafico C que corresponde a la citocina proinflamatoria IFN- γ podemos observar que existe una disminución de la concentración por parte de la F-2 en comparación con el CN durante los días 2, 3, 6, 9 y 11. Alcanzando un pico máximo de concentración el día 6 (fase inflamatoria) con 850 pg/mL para el CN y 550 de la F-2.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

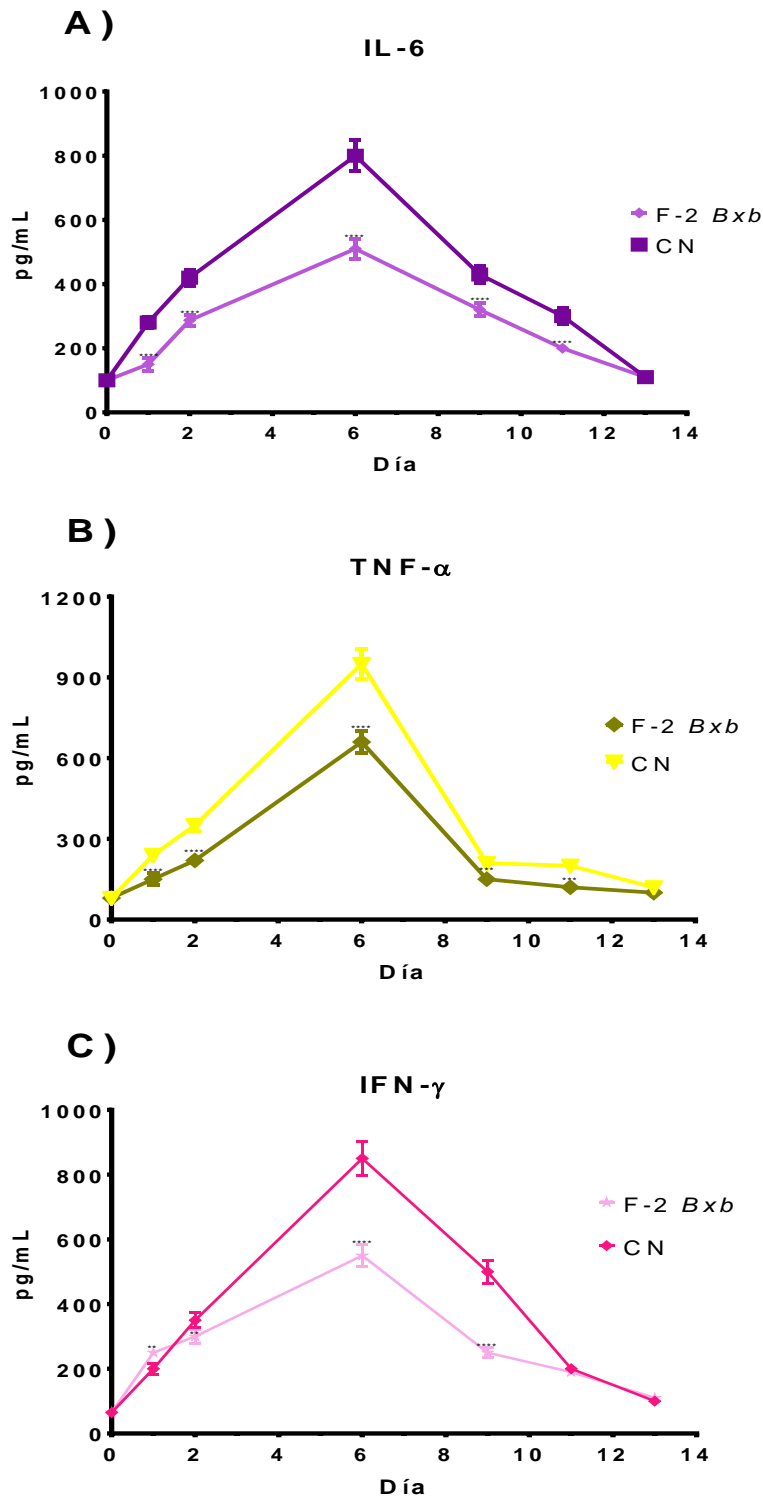


Figura 39. Producción de citocinas proinflamatorias: A) TNF- α , B) IFN- γ y C) IL-6 de la fracción más activa (F-2 Bxb) y el control negativo (CN) sin tratamiento. Los valores corresponden a la media (n=5, \pm EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



De acuerdo a los resultados anteriores se puede observar de manera general que las tres citocinas proinflamatorias tratadas con la fracción más activa (F-2) existe una disminución significativa en comparación con el control negativo durante los días que corresponden a la fase de cicatrización (2, 3, 6, 9 y 11) alcanzando un pico máximo el día 6 que corresponde a la fase inflamatoria, estos resultados indican un patrón de expresión similar observado en los tres gráficos, de tal manera que posiblemente existan componentes en la fracción 2 que ayuden a promover esta disminución de la expresión o inhibición de citocinas proinflamatorias y activación de macrófagos. Sin embargo, debido a la naturaleza de la herida la cual se puede clasificar como limpia, se han encontrado evidencias que este tipo de citocinas aumenta en casos de lesiones o cirugías más agresivas⁹⁷ y disminuyen su expresión en este tipo de heridas.

La IL-6 es una glucoproteína segregada por macrófagos, monocitos y eosinófilos, encargada de la madurez y activación de neutrófilos, madures de macrófagos y diferenciación de linfocitos T⁹⁶. Es una citocina que participa en procesos inflamatorios y su secreción puede ser inducida por diferentes estímulos, provenientes de LPS, TNF- α é IL-1 β . Por otra parte, puede tener un efecto doble, ya que la respuesta proinflamatoria inicial está controlada por moléculas inmunorreguladoras como inhibidores específicos y receptores de citocinas solubles⁸. Durante los proceso de lesión las concentraciones plasmáticas normalmente pueden alcanzar un pico de 4-6 horas pudiendo persistir hasta 10 días^{96,98}.

EL TNF- α , el cual es producido por macrófagos y ayuda a promover el edema en procesos de lesión y que actúa como mediador vasoactivo⁹⁶. Se ha demostrado que su disminución genera un bloqueo en la etapa de inflamación y se evita estrés oxidativo y por lo tanto la fibrosis⁹⁹ y adicionalmente presenta un efecto anti fibrótico, modula la actividad de la colagenasa y la síntesis de glucosaminoglicanos¹⁰⁰



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Es importante destacar que el estrés es un factor importante al cual se encontraban expuestos los ratones durante los diferentes ensayos realizados provocando alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis- suprarrenal y el sistema nervioso central, aumentando los niveles de glucocorticoides, cortisol, prolactina y catecolamina que promueve la disminución de los niveles de citocinas proinflamatorias¹⁰¹.

Adicionalmente se han encontrado estudios sobre la cinética de expresión de los niveles plasmáticos de moléculas proinflamatorias los cuales mencionan un incremento en las primeras fases de cicatrización y un aumento por parte de moléculas antiinflamatorias en fases posteriores¹⁰². Independiente de las concentraciones obtenidas a partir de las citocinas proinflamatorias: IL-6, TNF- α e IFN- γ , podemos observar ese comportamiento normal en el que se da un aumento de su expresión durante las primeras fases de cicatrización los días 2 (fase de homeostasis) y 6 (fase de inflamación). De esta manera podemos destacar su participación en procesos destinados a defensa y reparación del tejido dañado¹⁰³.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



Adicionalmente se realizaron pruebas de ELISA para la expresión de las citocinas antiinflamatorias: IL-4, IL-5 e IL-10 (Figura 40) durante los días: 0, 1, 2, 6, 9, 11 y 13 los cuales corresponden a las fases de cicatrización.

Podemos observar en el grafico A de la parte superior de la Figura 40 la cuantificación de la IL-4, analizando un comportamiento similar por parte de la fracción más activa (F2) en comparación con el control negativo (CN) durante los días 0, 1 y 2 (fase de homeostasis) y a partir de los días 6 (fase de inflamación), 9 (fase de granulación) y 11 (fase de maduración) existen diferencias significativas entre ambos grupos observando una disminución de la expresión de citocinas por parte del grupo con la fracción más activa (F-2), sin embargo nuevamente vuelve a retomar el mismo comportamiento para el día 13 (fin del experimento de cicatrización), cabe destacar que ambos grupos alcanzaron su máxima expresión el día 6 con 500 pg/mL para el CN y 400 pg/mL para la F-2.

Por otra parte, en el gráfico B de en medio podemos analizar la expresión de la IL-5, en el cual podemos observar el mismo comportamiento por parte de la F-2 y el CN durante los días 1 y 2 (fase de hemostasia), sin embargo, podemos observar que para los días 6, 9 y 11 existen diferencias significativas al presentarse una disminución de IL-5 por parte de la fracción más activa (F-2), destacando el día 6 (fase de inflamación) como el pico de mayor expresión de la citocina para ambos casos con 800 pg/mL para el NC y con 600 pg/mL para la F-2. Al igual que con la IL-4 para el día 13 nuevamente presentan un comportamiento similar.

Finalmente, en el grafico inferior C de la Figura 40 podemos encontrar la expresión de IL-10, en el cual podemos observar un aumento de la expresión de esta citocina por parte de la F-2 en comparación con CN durante los 13 días que duro el ensayo destacando los días 2, 6, 9 y 11 que corresponden a las fases de cicatrización y que al igual que se mencionó anteriormente alcanza su pico máximo para los días 9 y 10 que corresponderían a la fase de granulación con 700 pg/mL.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

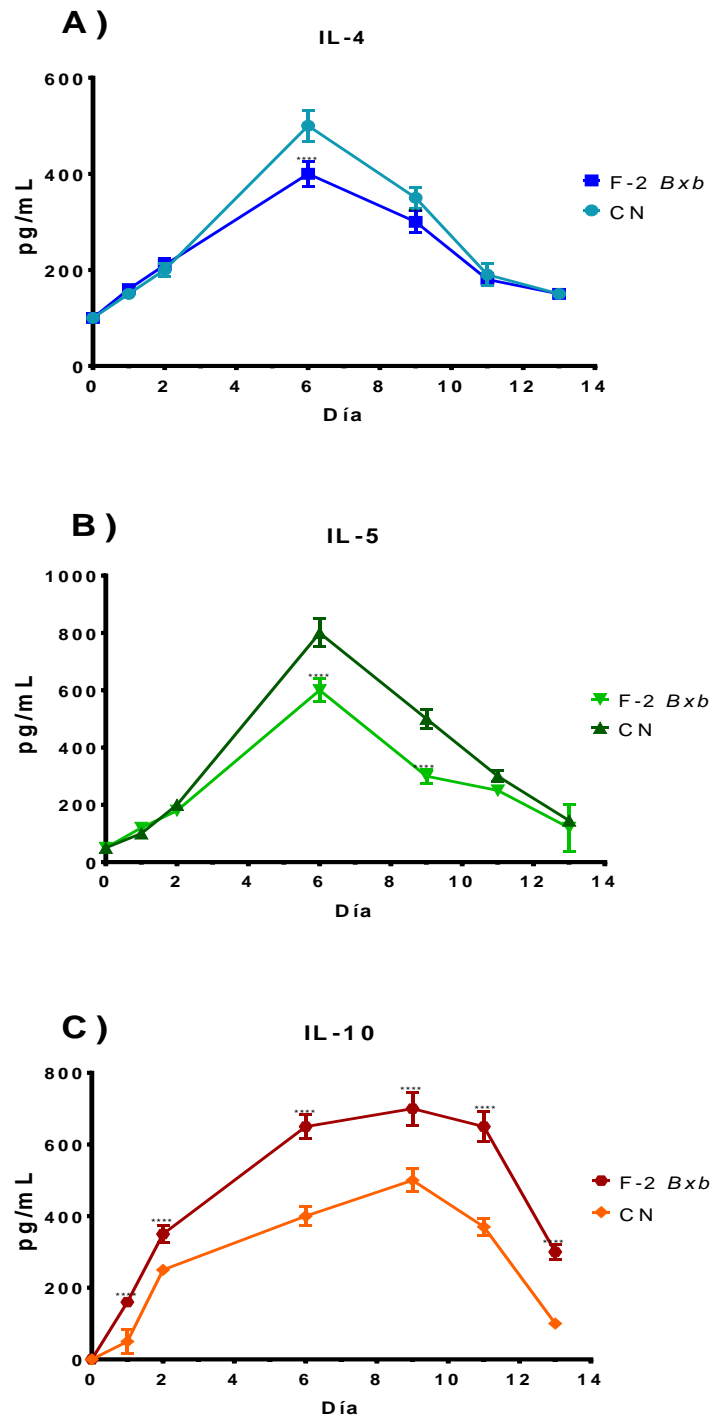


Figura 40. Producción de citocinas antiinflamatorias: A) IL-4, B) IL-5 y C) IL-10 de la fracción más activa (F-2 *Bxb*) y el control negativo (CN) sin tratamiento. Los valores corresponden a la media ($n=5$, \pm EEM) del análisis estadístico ANOVA de dos vías con posthoc Tukey (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



De acuerdo con los resultados anteriores podemos observar una disminución significativa de la expresión por parte de las citocinas IL-4 e IL-5 en la F-2 en comparación con el CN alcanzando su máxima expresión en ambas citosinas en la fase inflamatoria (día 6). Estas citocinas se caracterizan por su participación en la respuesta inmune innata y adaptativa, alergias y reparación de tejidos. Se sintetizan a partir de linfocitos T diferenciados a Th2. Intervienen en el desarrollo, modulación y regulación de la inflamación¹⁰⁴

La IL-10 es una citocina que se encarga de regular la respuesta inflamatoria principalmente. Esta citocina es secretada por monocito, linfocitos T y su subtipo linfocitos Th2, se encarga de bloquear la formación del factor de transcripción, por lo que se inhibe la activación celular y la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α . Algunos estudios han demostrado que en presencia de heridas se generan niveles elevados de IL-10 hasta los primeros 10 días⁹⁷.

Por otra parte, podemos destacar el aumento de la IL-10 por parte de la F-2 en donde se alcanza un pico de máxima expresión a partir del día 9 (fase de granulación). De acuerdo a algunos antecedentes la IL-10 actúa como un potente inhibidor de citocinas incluyendo IL-6, TNF- α e IFN- γ , debido a que degrada el ARNm encargado de la síntesis de estas citocinas¹⁰², tal como pudimos observar en la figura 39. De esta manera es que posiblemente el grupo de la F-2 contenga componentes que estimulen a una mayor producción de IL-10, de esta manera es que los niveles de las citocinas proinflamatorias del grupo con el tratamiento se observaron notablemente disminuidos en comparación con el CN debido al efecto que ejerce la IL-10.



7.4.1. BALANCE DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (TNF- α , IFN- γ e IL-6) / IL-10

Posteriormente, de acuerdo con los datos anteriores se realizó un balance de las citocinas proinflamatorias con la IL-10 para determinar cuál es el tipo de citocinas que predominaron durante los días que corresponden a las fases de cicatrización.

Los valores que se tomaron en cuenta fueron los obtenidos anteriormente en la expresión de las citocinas proinflamatorias de la F-2 contra el CN y se dividieron entre los valores de la IL-10 con cada uno de sus controles respectivamente, de acuerdo con los estándares de la Tabla 12.

Tabla 12. Significado de los valores obtenidos como resultado del análisis del balance con IL-10.

VALORES	RESULTADO
< 1	Antiinflamatorio
= 1	Equilibrio
> 1	Proinflamatorio

En la Figura 41 podemos observar el balance entre la IL-6/IL-10 en el grafico A de la F-2 y el CN, podemos analizar que la F-2 presenta valores por debajo de 1 durante los 13 días incluyendo los que corresponden a las fases de cicatrización por lo que de acuerdo con el análisis establecido presenta una tendencia antiinflamatoria, en este sentido se sugiere que los componentes presenten en F-2 promuevan una mayor actividad antiinflamatoria.

Al analizar los valores de CN de la IIL-6/IL-10 podemos observar que presenta valores encima de 1 durante los 7 primeros días que de acuerdo con la Tabla 12 se promueve una actividad inflamatoria, de los cuales el día 2 y 6 corresponden a las fases de cicatricen de homeostasis e inflamación. Posteriormente a partid del día 9 al 12 se generan valores menores a 1 por lo que se promueve una actividad antiinflamatoria, en la cual se incluye el día 9 (fase de granulación) y el día 11 (fase de maduración).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



En el gráfico B de en medio podemos observar el balance de $TNF-\alpha/IL-10$, para la F-2 podemos observar que presenta valores por debajo de 1 durante los primeros 5 días del ensayo por lo que se promueve un efecto antiinflamatorio por parte de la F-2, sin embargo el día 6 (fase de inflamación) presenta valores por encima de 1 de tal manera que presenta un efecto inflamatorio, posteriormente del día 7 al 13 nuevamente presenta valores por debajo de 1 el cual corresponde a un efecto antiinflamatorio. Mientras que en el caso del CN durante los primeros 8 días (fase de homeostasis y de inflamación) se obtienen valores mayores a 1 por lo que se promueve una actividad inflamatoria, mientras que a partir del día 9 al 12 (fase de granulación y de maduración) existen valores por debajo de 1 estableciendo una actividad antiinflamatoria.

Finalmente, en el grafico inferior C la F-2 durante el primer día valores arriba de 1 por lo que se promueve una actividad inflamatoria y posteriormente del día 2 al 13 presenta valores por debajo de 1 por lo que se promueve una actividad antiinflamatoria, cabe destacar que los valores del día 2 (fase de homeostasis) y día 6 (fase inflamatoria) estuvieron muy cerca de estar en equilibrio al casi obtener el valor de 1. Por otra parte, para el CN durante los primeros 8 días presenta valores por encima de 1 (efecto inflamatorio) y a partid del día 9 presenta valores por debajo 1 (efecto antiinflamatorio).



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino

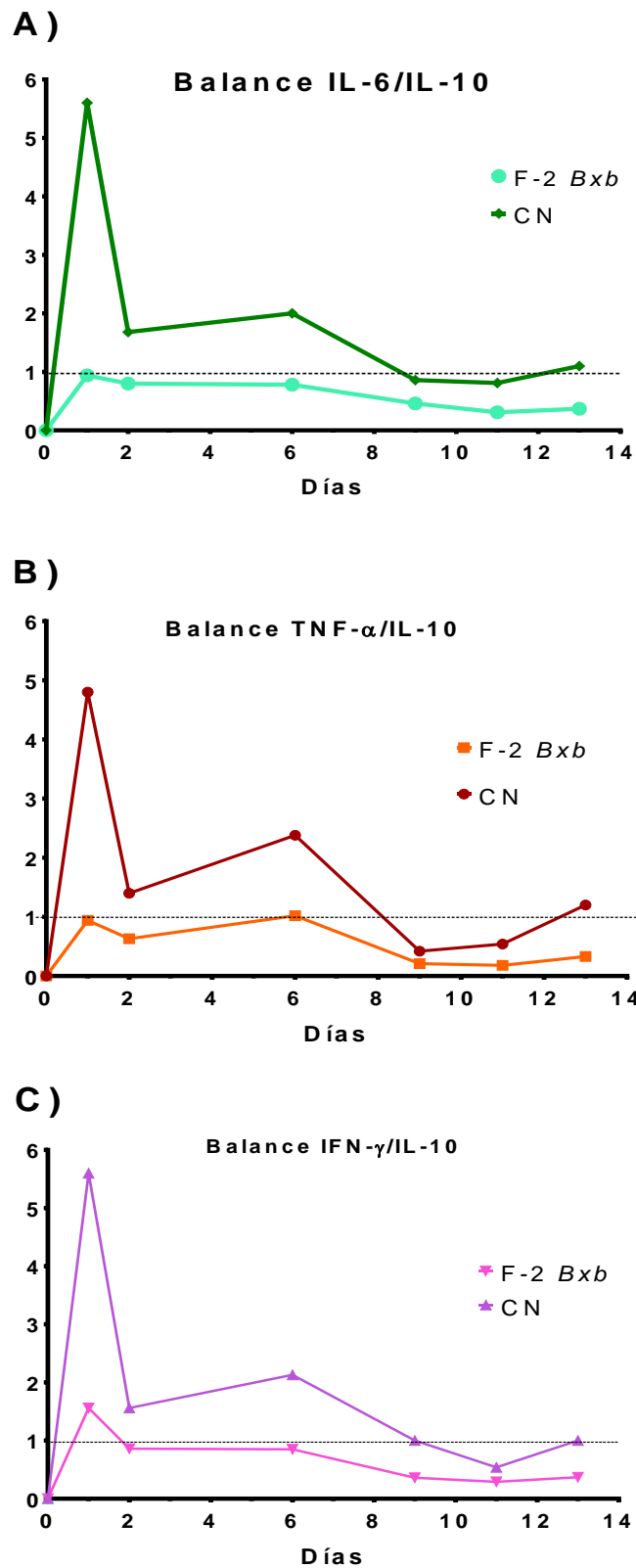


Figura 41. Balance de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α e IFN- γ /IL-10 de la F-2 y el CN.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



De acuerdo con los resultados anteriores podemos observar que en los procesos de cicatrización de heridas existen diferentes tipos de citocinas proinflamatorias que participan para generar un mejor cierre de la herida, sin embargo, las citocinas que son más estudiadas son TNF- α , IFN- γ , IL-6 en los procesos de sepsis o heridas muy graves. De igual manera existen citocinas de la respuesta inflamatoria que tienen la capacidad de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente la IL-10¹⁰⁵. En este sentido en el balance que observamos anteriormente se muestra una tendencia a un comportamiento antiinflamatorio por parte de las citocinas durante las diferentes fases de cicatrización, de esta manera, se puede determinar que el tratamiento de la fracción más activa F-2 contiene componentes que ayudan a promover una actividad cicatrizante mediante un efecto antiinflamatorio a nivel celular.



8. CONCLUSIONES

Podemos concluir que el extracto de acetona de *Bougainvillea x buttiana* presenta efecto cicatrizante. Sin embargo, la fracción 2 obtenida mediante fraccionamiento primario presento un mayor efecto en comparación con los demás grupos experimentales en modelos murinos y promueve una mayor velocidad de cicatrización alcanzando un pico máximo a las 144 horas (fase de inflamación).

De acuerdo con los análisis cromatográficos podemos establecer la presencia de terpenos en la fracción 2, los cuales posiblemente ayudarían a promover la actividad cicatrizante en conjunto con todos los compontes presentes en la fracción.

Finalmente, de acuerdo con el análisis de las citocinas se puede determinar que la fracción 2 promueve una mayor actividad antiinflamatoria de acuerdo con la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias generando un aumento de la IL-10 durante el ensayo en comparación con el control negativo.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



9. PERSPECTIVAS

1. Determinar mediante TLC la presencia de otros compuestos presentes en la fracción más activa.
2. Determinar mediante RMN la presencia de componentes presentes de la fracción más activa.
3. Realizar un estudio de interleucinas *in situ* de la herida con el tratamiento más activo
4. Determinar el comportamiento celular a partir de la fracción 2 en las diferentes fases de cicatrización mediante la tinción de cortes histológicos.



10. REFERENCIAS

1. Avellaneda-oviedo EM, González-rodríguez A, González-porto A, et al. Injertos en heridas. *Heridas Cicatrización*. 2018;8(2):6-15.
2. IGarcía Alonso I. Traumatismos mecánicos abiertos: Las heridas. :1-7. <http://www.oc.lm.ehu.es/Fundamentos/patologia/Apoyo/cap 6 Heridas.pdf>.
3. Abarca-Vargas R, Petricevich VL. *Bougainvillea* Genus: A Review on Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology . *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2018;2018:1-17. doi:10.1155/2018/9070927
4. Guerrero RV, Abarca-vargas R, Petricevich VL. Chemical compounds and biological activity of an extract from *Bougainvillea x buttiana* (var . rose) holttum and standl. 2017:42-46.
5. García A. Reparación de Heridas.; 2007. <http://www.oc.lm.ehu.es/Fundamentos/patologia/Apoyo/Cap 3 Curación de las heridas.pdf>.
6. Rivero NA, Acosta JB. Cicatrización de heridas cutáneas y papel de los miofibroblastos. 2018;13(5):505-510.
7. Ramírez Hernández GA. Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología*. 2010;2(2):69-78. doi:10.1016/S1761-2896(08)70356-X
8. Figueroa LA, Abarca-vargas R, Alanis CG, Petricevich VL. Comparison between Peritoneal Macrophage Activation by *Bougainvillea x buttiana* Extract and LPS and / or Interleukins. 2017;2017.
9. Paulsen Friedrich WJ. Atlas de Anatomía Humana Vol. 1: Anatomía General y Aparato Locomotor. ELSEVIER. España; 2018.
10. Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J Cell Commun Signal*. 2016;10(2):103-120. doi:10.1007/s12079-016-0330-1



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



11. Merino Pérez J, Noriega Borge MJ. La piel: Estructura y Funciones. Open Course Ware. 2011:1-7.
12. Reiriz J. Tejidos. membranas. piel. derivados de la piel. In: Colegio Oficial Enfermeres i Enfermeres. ; 2010:1-37.
13. Franco GN. Histología de la piel. Rev Fac Med UNAM. 2003;46(4):130-133. <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-4/RFM46403.pdf>.
14. Serna J, Vitales M, Lopez MC, Molina A. 4. Dermatología. In: Farmacia Hospitalaria. ; 2010:841-875.
15. Valdés-rodríguez R, Torres-álvarez B, Almeda-valdés JGP. La piel y el sistema endocrinológico. Gac Med Mex. 2012;15:162-168.
16. Buendía A, Mazuecos J, Camacho F. Anatomía y fisiología de la piel. Man dermatologia Sección I Temas Gen. 2018;1:2-27.
17. Saenz de Santa Maria ML. Manifestaciones cutáneas de las enfermedades sistémicas Cutaneous manifestations of systemic diseases. *Dep Dermatologia , Clin las condes*. 2011;22(6):749-756.
18. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):514-525. doi:10.1038/sj.jid.5700701
19. Organization WH. Who Guidelines for Safe Surgery 2009. *Publ World Heal Organ*. 2009:133. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44185/9789241598552_eng.pdf;jsessionid=8C631A5B89D7BF57F4F61FC259599B9B?sequence=1.
20. CENETEC. *Prevención y Diagnóstico de La Infección Del Sitio Quirúrgico*. México; 2018. <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/GPC-IMSS-827-18/ER.pdf>.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



21. Morán EU, Valeria González L. Hospital Luis Calvo Mackenna EC. Clasificación De Las Heridas Operatorias Herida Quirúrgica. :1-4. http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act15198.htm.
22. Yuste Garcia P. Conceptos y definiciones Tipos de heridas quirúrgicas Infección de la herida quirúrgica Factores que influyen Clínica. 2014:5. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/420-2014-03-20-07> Infecciones quirúrgicas.pdf.
23. Rica MC, Margarita L, Matos A. Revista medica sinergia. 2017.
24. Perdomo CR. Los detritos en el proceso para una correcta preparación del lecho de la herida. 2018;29(3):141-144.
25. Pechersky A V, Pechersky VI, Shpilenya ES, Gaziev AH, Semiglazov VF. Regeneration and Cicatrization. *J Stem Cells*. 2016;11(2):89-97.
26. Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología*. 2011;42(1):1-10. doi:10.1016/s1761-2896(08)70356-x
27. Claribeth Guarín-Corredor¹ • Paola Quiroga-Santamaría¹ • Nancy Stella Landínez-Parra MSc². Proceso de Cicatrización de heridas de piel. 16 Oct . 2013;61(4):441-448. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v61n4/v61n4a14.pdf>.
28. Frank S, Kämpfer H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J. Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: A regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J*. 2000;347(1):265-273. doi:10.1042/0264-6021:3470265
29. M. MJ. Thrombin, thrombin inhibitors, and the arterial thrombotic process. *Thromb Haemost*. 1993;70(1):208-211.
30. He S, Blombäck M, Bark N, Johnsson H, Wallen NH. The direct thrombin inhibitors (argatroban, bivalirudin and lepirudin) and the indirect Xa-inhibitor (danaparoid) increase fibrin network porosity and thus facilitate fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 2010;103(5):1076-1084. doi:10.1160/TH09-05-0306



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



31. Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, et al. The IL-6-Soluble IL-6R α Autocrine Loop of Endothelial Activation as an Intermediate Between Acute and Chronic Inflammation: an Experimental Model Involving Thrombin. *J Immunol.* 2001;167(6):3435-3442. doi:10.4049/jimmunol.167.6.3435
32. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RHJ. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* 2011;216(7):753-762. doi:10.1016/j.imbio.2011.01.001
33. Ross R, Everett NB, Tyler R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol.* 1970;44(3):645-654. doi:10.1083/jcb.44.3.645
34. Rossaneis MA, Haddad M do CFL, Mathias TA de F, Marcon SS. Differences in foot self-care and lifestyle between men and women with diabetes mellitus. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2016;24(0). doi:10.1590/1518-8345.1203.2761
35. Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG. Delayed wound healing in immunodeficient TGF- β 1 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2000;115(1):3-11. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00010.x
36. Badiu D, Vasile M, Teren O. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Wound Heal Process Phases Promot.* 2011:73-93.
37. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(6):432-444. doi:10.1038/nri1375
38. Brown EJ. Phagocytosis. *BioEssays.* 1995;17(2):109-117. doi:10.1002/bies.950170206
39. Stout RD. Editorial: Macrophage functional phenotypes: no alternatives in dermal wound healing? *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):19-21. doi:10.1189/jlb.0509311



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



40. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surg.* 2005;31(6):674-686. doi:10.1097/00042728-200506000-00011
41. Singer AJ, Clark RAF. Wound healing. *N Engl J Med.* 1999.
42. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, et al. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *J Immunol.* 2010;184(7):3964-3977. doi:10.4049/jimmunol.0903356
43. Ishida Y, Gao J-L, Murphy PM. Chemokine Receptor CX3CR1 Mediates Skin Wound Healing by Promoting Macrophage and Fibroblast Accumulation and Function. *J Immunol.* 2008;180(1):569-579. doi:10.4049/jimmunol.180.1.569
44. Kalluri R, Neilson EG, Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis Find the latest version : Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1776-1784. doi:10.1172/JCI200320530.For
45. Martinez-Ferrer M, Afshar-Sherif AR, Uwamariya C, De Crombrughe B, Davidson JM, Bhowmick NA. Dermal transforming growth factor- β responsiveness mediates wound contraction and epithelial closure. *Am J Pathol.* 2010;176(1):98-107. doi:10.2353/ajpath.2010.090283
46. Van Hinsbergh VW, Koolwijk P, Hanemaaijer R. Role of fibrin and plasminogen activators in repair-associated angiogenesis: in vitro studies with human endothelial cells. *EXS.* 1997;79:391-411. doi:10.1007/978-3-0348-9006-9_16
47. Möhle R, Green D, Moore MAS, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):663-668.
48. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-321. doi:10.1038/nature07039



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



49. Tredget EE, Yang L, Delehanty M, Shankowsky H, Scott PG. Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury. *J Interf Cytokine Res.* 2006;26(3):179-189. doi:10.1089/jir.2006.26.179
50. Mark Doherty T. T-cell regulation of macrophage function. *Curr Opin Immunol.* 1995;7(3):400-404. doi:10.1016/0952-7915(95)80117-0
51. Martin-Aragon, S. Marcos E. Tratamiento de las cicatrices. *Rev española cicatrizacion Farm comunitaria (Cicatrizacion y heridas).* 2014;22.
52. Heisler EV, Budó M de LD, Schimith MD, Badke MR, Ceolin S, Heck RM. Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña TT - Use of medicinal plants in health care: scientific production of theses and dissertation Brazilian nursing TT - Uso de p. *Enfermería Glob.* 2015;14(39):390-403. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412015000300018&lang=pt.
53. Escamilla B, Castañeda M. *Plantas Medicinales.*; 2015.
54. Paco K, Ponce-Soto LA, Lopez-Illasaca M, Aguilar JL. Determinación del efecto cicatrizante de Piper aduncum (Matico) en fibroblastos humanos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2016;33(3):438. doi:10.17843/rpmesp.2016.333.2329
55. Boakye YD, Agyare C, Ayande GP, Titiloye N, Asiamah EA, Danquah KO. Assessment of wound-healing properties of medicinal plants: The case of Phyllanthus muellerianus. *Front Pharmacol.* 2018;9(AUG):1-12. doi:10.3389/fphar.2018.00945
56. Saini R, Sivanesan I, Keum Y. Phytochemicals of Moringa oleifera: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 2015.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



57. Csupor D, Blazsó G, Balogh Á, Hohmann J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(1):193-195. doi:10.1016/j.jep.2009.09.049
58. Ávalos-Soto J, Treviño-Neávez JF, Verde-Star MJ, et al. Cytotoxic evaluation of *Azadirachta indica* (A. Juss) ethanolic extracts against diferentes cells lines [Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares]. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2014;45(3):39-44. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84975486264&partnerID=40&md5=d0ffbc02970704d24b56e12a09819b13>.
59. Martínez-Cuevas L, Estrada-Soto S, Chavez-Silva F. Determinación de los efectos antidiabético y toxicológico de los extractos orgánicos de *Bocconia arborea* en modelos murinos. 2018:1-86.
60. Villarroel D, Edgar J. Revista de Actualización Clínica Volumen 42 2014. *Rev Actual Clínica.* 2014;20:2190-2194. file:///C:/Users/ALEJANDRA/Desktop/crecimiento y desarrollo cranofacial.pdf.
61. Clemente M, Miguel MD, Felipe KB, et al. Can Medicinal Properties of Watercress be Relevant to Human Health ? A Systematic Review Based on Preclinical Study In vivo. 2019:17-22. doi:10.4103/phrev.phrev
62. Abarca-vargas R, Malacara CFP, Petricevich VL. Characterization of Chemical Compounds with Antioxidant and Cytotoxic Activities in *Bougainvillea x buttiana* Holttum and Standl , (var . Rose) Extracts. 2016. doi:10.3390/antiox5040045
63. Standl. H&. *Bougainvillea x buttiana.* *F Mus Nat Hist, Bot Ser* 23. 2018.
64. Xu Z, Deng M. Identification and Control of Common Weeds: Volume 2. *Identif Control Common Weeds Vol 2.* 2017;2:303-308.
65. Sharma T, Bhide B, Acharya R. Wound healing activity of certain root drugs - A review from classical and ethnomedicinal claims. 2019;13(1):9-12.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



66. Pereira DM, Faria J, Gaspar L, Valentão P, Andrade PB. *Boerhaavia diffusa*: Metabolite profiling of a medicinal plant from Nyctaginaceae. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(8):2142-2149. doi:10.1016/j.fct.2009.05.033
67. Adebayo GI, Alabi OT, Owoyele B V., Soladoye AO. Anti-diabetic properties of the aqueous leaf extract of *Bougainvillea glabra* (Glory of the Garden) on alloxan-induced diabetic rats. *Rec Nat Prod.* 2009;3(4):187-192.
68. Soni R, Mehta NM, Trivedi R, Srivastava DN, Soni R. Effect aqueous extract of *Bougainvillea glabra* choisy on Cutaneous Wound healing in Diabetic Rats. *Asian J Complement Altern Med.* 2013;01(01):12-15.
69. Punjaji SA, Mahavidyalaya D. Some unique herbal remedies against arthritis and rheumatism from imampur ghat areas in ahmednagar district (m.s.) India Salave Ashok Punjaji * Corresponding Author : KeyWords : Herbal remedy , Human interactions with the surrounding Being a beautiful. 2012;6:51-54.
70. Mohd R, Ali S. Evaluation of wound healing potential of polyherbal formulation in experimentally induced. *World J Pharm Res.* 2016;5(9):1456-1466. doi:10.20959/wjpr20169-6861
71. Gogoi J, Nakhuru KS, Policegoudra RS, Chattopadhyay P, Rai AK, Veer V. Isolation and characterization of bioactive components from *Mirabilis jalapa* L. radix. *J Tradit Complement Med.* 2016;6(1):41-47. doi:10.1016/j.jtcme.2014.11.028
72. Prabu D, Nappinnai M, Ponnudurai K, Prabhu K. Evaluation of Wound-Healing Potential of *Pisonia grandis* R.Br: A Preclinical Study in Wistar Rats. 2004;(March):21-27.
73. Ghosh PK, Gaba A. Phyto-extracts in wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16(5):760-820.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



74. Guerrero RV, Vargas RA, Petricevich VL. Chemical Compounds and Biological Activity of an Extract From *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rose) Holttum and Standl. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2017;9(3):42.
75. Guerrero RV, Abarca-vargas R, Petricevich VL. Analgesic Effect of Ethanolic Extract of *Bougainvillea*. 2016;5:224-230.
76. Vargas RA, Guerrero RV, Petricevich VL. Evaluation of Anti-Arthritic Potential of Partitioned Extracts of *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rose) Holttum and Standl. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2018;10(3):117. doi:10.22159/ijpps.2018v10i3.24015
77. Abarca-Vargas R, Guerrero RV, Petricevich VL. Effect of extraction conditions on total phenols contents and flavonoids, and cytotoxic activity of *Bougainvillea x buttiana*. 2016;2017(2):1-8. doi:http://dx.doi.org/10.4172/2161-1459.C1.010
78. Lucha V, Muñoz V, Fornes B, Garcia M. La cicatrización de las heridas. *Enfermería Dermatológica.* 2008;2(3):8-15. doi:10.1016/B978-84-9022-065-8/00007-6
79. Bilevich DE. Cicatrización de Heridas : Una Mirada Integral. *Soc Iberoam Inf Cient.* 2016:1-4.
80. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. SAGARPA. 2001.
81. Carmen M, María A, Alcira MC. Efecto de los anestésicos Enflurano e Isoflurano en ratones con niveles inducidos y deprimidos de citocromo P450 . de drogas R esumen. 2005.
82. Carlos Eduardo González Muñoz,* Claudia Carolina Ríos * Carlos Valdez. Tiempo de cicatrización por segunda intención de piel,comparando la criocirugía con la cirugía convencional. *Rev la Fac Med - Univ Fr Marroqui.* 2009;(9):1-32.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



83. Ramsey, III E, Lu Z, Rangoonwala A, Rykhus R. Multiple Baseline Radar Interferometry Applied to Coastal Land Cover Classification and Change Analyses. *GIScience Remote Sens.* 2008;43(4):283-309. doi:10.2747/1548-1603.43.4.283
84. Campbell LD. SAPN; SSB. PRS. Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research. *Collect Storage, Retr Distrib Biol Mater Res.* 2008;6(1):3-58. doi:10.1089/cpt.2008.9997
85. Guerin JS, Murray DW, McGrath MM, Yuille MA, McPartlin JM, Doran PP. Molecular Medicine Ireland guidelines for standardized biobanking. *Biopreserv Biobank.* 2010;8(1):3-63. doi:10.1089/bio.2010.8101
86. Schumacher, A. O'Garra, P. Schrader et al. Characterization of 4 monoclonal antibodies to mouse interleukin-5 and development of mouse and human IL-5 assay. *J Immunology.* 1980;125:1671–1677.
87. Pedag P, Gotas G, Natural DEM, et al. Propuesta pedagógica gotas de medicina natural para el fortalecimiento y la importancia del uso de las plantas medicinales a través del conocimiento ancestral 1. 2019.
88. Abarca-Vargas R, Petricevich VL. *Bougainvillea* genus: A review on phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/9070927
89. Bonferoni MC, Riva F, Invernizzi A, et al. Alpha tocopherol loaded chitosan oleate nanoemulsions for wound healing. Evaluation on cell lines and *ex vivo* human biopsies, and stabilization in spray dried Trojan microparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;123:31-41. doi:10.1016/j.ejpb.2017.11.008
90. Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Toledo E, Gaforio JJ. Squalene Stimulates a Key Innate Immune Cell to Foster Wound Healing and Tissue Repair. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2018;2018(Figure 1). doi:10.1155/2018/9473094



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



91. Süntar I, Küpeli Akkol E, Keles H, Yesilada E, Sarker SD. Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. *J Ethnopharmacol.* 2013;149(1):103-110.
92. Özay Y, Güzel S, Yumrutaş Ö, et al. Wound healing effect of kaempferol in diabetic and nondiabetic rats. *J Surg Res.* 2019;233:284-296. doi:10.1016/j.jss.2018.08.009
93. Kaisoon O, Konczak I, Siriamornpun S. Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Res Int.* 2012;46(2):563-571. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.016
94. Martín SMM, Martínez MDCJ, Valido PEG, Lescaille MF, Cubiles MAM. In vivo healing activity of the charred powder of *Punica granatum* linn and *Eichhornia crassipes*. *Rev Cuba Med Mil.* 2019;48(2):166-176.
95. Bestagno V, Neira I, Gómez-Gaete P, et al. Estudio del Efecto de un Enjuagatorio de *Rosmarinus officinalis* (Romero) en la Cicatrización de Heridas de Mucosa. *Int J Odontostomatol.* 2017;11(4):411-417. doi:10.4067/s0718-381x2017000400411
96. Kimiko Sakata R, Machado Issy A, Roberto Gerola L, Salomão R. Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol Artículo de revisión Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61(2):137-142.
97. Lopez A, Gonzalez E, Ruiz J, Rivera J. Inmunidad e inflamación en el proceso quirúrgico. *Rev la Fac Med.* 2018;61(4):7-15. <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v61n4/2448-4865-facmed-61-04-7.pdf>.
98. Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología.* 2008;42(1):1-10. doi:10.1016/s1761-2896(08)70356-x
99. Ávila A, Amaya M, Martínez JD, Moreno J. Panorama actual de las alternativas en el tratamiento de la cicatriz hipertrófica y queloide. *Dermatologia Rev Mex.* 2014;58(3):247-261.



Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino



100. Cintron-Machón G, Poveda-Xatruch J. La cicatrización queloide. *Acta Med Costarric.* 2008;50(2):87-93.
101. Hernández CA, Andrea Hernández C, Toro AM. Enfoque y manejo de cicatrices hipertróficas y queloides. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 2011;19:218-228. www.revistasocolderma.com.
102. Sánchez R, Monserrat Sanz J, Prieto Martín A, Reyes Martín E, Álvarez de Mon Soto M, Sánchez García M. Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. *Med Intensiva.* 2005;29(3):151-158. doi:10.1016/s0210-5691(05)74222-4
103. Meyes García MG, García Tamayo F. Citocinas, inflamación y conducnta. *Rev Espec en Ciencias la Salud.* 2005;8(1-2):4-13.
104. González-Costa M, González AAP. La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Rev Habanera Ciencias Medicas.* 2019;6(5):1-15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000100030.
105. Ruiz CM, Teresa M, López R, et al. Variaciones alélicas en los genes de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias , y su asociación con la susceptibilidad y el curso clínico de la sepsis. 2013;26(1):67-76.



VOTOS PROBATORIOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de marzo de 2021.

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Secretario de Investigación

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimado Dr. Esquivel, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Luis Rubén Martínez Cuevas. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. Vera Lucia Petricevich



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERA LUCIA PETRICEVICH | Fecha:2021-03-16 08:03:51 | Firmante

Fbfo7Beb1SDk64syC3+AcrI8XA1wYOYr3QrmMFjm7KI6VufIE9Gsl/CeuXZ4uk93axt+Fd7fPGgAYNwbaoggWIMIWy+S68j5MR9demv4nInyn0ummvki49uOzRuDBk1fz1Cj2OC7IDpZig27XilyHyOzRTI2Viiy5ZqpEBIpd96x+Cf31nfg2zv7IPfA6OS8fpP3Za89/mlwmarstmx+oG3hPlxi59bgBck0E3fr37GpR1YDtISwjUQnIX+evvSdmeyN8hg8uJ96QQj23YiH9J86A1AIK83FZngs8ixshICcCK2IHC/UoQKLxXxs00tMOZJRQSOuKyn5ryiPIM7mWg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ViULhH](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/d9TvCjVAzwugsXqwD5LILUjgdJE6soSc>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de marzo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Luis Rubén Martínez Cuevas. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Rodolfo Abarca Vargas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RODOLFO ABARCA VARGAS | Fecha:2021-03-16 06:16:25 | Firmante

G/7XG5ZvWfy5RjBlnzy4Z90VzRliiOYMPNmsVFx/SRIJHGqDIEEWZ7G372X+87PUx7JHXfQ8wgPfoMtaLznVRmRsrWUllZvzhReeD0x7srOS9z3cdRh7mfXtTZllnEPTUANZ8aNm6pYOJvxdzfOG1ioxj7L2+YB9Wh15+MXm+XmOH7RI3GsBWbJllnMmTahXcCav6p1HkMlys4DQMqFzVK0MdmHW2RCB8eJO00BFncD0lrZvxKsmLA2RAa+yNFj7u7dJ6G5OeozPsHYs3zIqdbb1ylazR2C6r19SMRUwOQ4iJHApWIJ31QP2LjXDU2PfBcjhA9jW+tWFIW8QkT9qSg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



xl8dwj

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/uWaHAiDZkHkPhsVMFDuL9AM53QxUw1n7>



Cuernavaca, Mor., 12 de marzo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Luis Rubén Martínez Cuevas. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS SANTA OLALLA TAPIA | Fecha:2021-03-19 21:31:01 | Firmante

BjLzCwe1W+I2A4YfSQhyArZWb59I3KrZOJYsEZYwFIJCD3UF6kkLti7U/UeQKmlNYVv0bG6DIX1xb+qqKJEivmqlI7Ez2jLoLH1bOxtBV+tEuHGv0eDy/LMxTCjYhuED38o4kVne2mHnz2Fx3nE4r9ZdjEMU9HumCcFDzjWVkyrVjTBhFvTMSfZl86iV0K6K3UtreAOMb2mfSkQ+CHlkl1wONVlzbq8zd33DWVmoyRncuv42MeRao+/K+Zgod5RFisszwYI12KgbloGuVK Ajo0QVkp089uB0+mVoHUrNjaXXrpA3S7Bu3E6/+hbNNCuXxYB/dioDJKGwTjLzuNQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



XQN89b

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dGn7yrpGcrPQ23fq5h97QUAH0pE2ny63>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de marzo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de los compuestos presentes en *Bougainvillea x buttiana* (Var. Rosa) con actividad cicatrizante en modelo murino**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Luis Rubén Martínez Cuevas. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Arturo Villavicencio Rivero



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ARTURO VILLAVICENCIO RIVERO | Fecha:2021-03-23 09:05:11 | Firmante

Ps3oxlI0BcdHUHd53oRiAApM0C+MAMSFN31AINXZmHUvN0GKM3zyj98dL/l2e8hZi0lIks7JwQbReQk4+c73fuEut9PmBfF1sfQl8ex6BKJaQvZn6IBbuwN6aVoyCz+r8zGh02Kfk/rH/G7RqsYbm+2HbmHn3zeza1zhMwVYg0kHWsG1qf1Duck+4jWfGjanNgIHv6glb1QzZzV8vhd9klFiNCNm/Ao/1xhFawkzRDGCLRcY7PHfsypqj3d/vGQp9NpBNu11s20yBHKKa1aFbmUUzVVUUTwV5m2bA72NZx21wUlcWnX0FxDOxnFFagPUqguWJQYslxTjFQGqGxrQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



eoB5b7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WJqie1h5BMcc7xZjH9H98HTcW8JVEBIJ>

