



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE DOCENCIA

JEFATURA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN TÓPICA DE LA CAPACIDAD
CICATRIZANTE Y ANTIINFLAMATORIA DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO Y LAS FRACCIONES
ACUOSA Y DE ACETATO DE ETILO DE LA RAÍZ DE
Sechium edule (chayote) EN RATÓN**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA

B.E. RICARDO DANIEL SANDOVAL VILLARES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

CUERNAVACA, MORELOS. JUNIO DEL 2018

El presente trabajo se realizó en Enero del 2016 a Diciembre del 2107 en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en el laboratorio de Inflamación y enfermedades crónicodegenerativas dirigido por la Dra. Gabriela Rosas Salgado y en el laboratorio de Fitoquímica del Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur (IBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dra. Gabriela Castañeda Corral

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Presidente

Dra. Vera Lucía Petricevich

Secretario

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Primer Vocal

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Segundo Vocal

Dr. Gerardo Joel Barrita Cruz

Tercer Vocal

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Esta tesis conto con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a traves de la beca de posgrado con número de registro 598818

Dedicatoria

A mi madre, por enseñarme a creer en mi, por siempre ser mi mayor impulso y apoyar cada una de mis locuras...

Breathing dreams

like

air.

-F Scott Fitzgerald.

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Rosas, por su paciencia y confianza, por cada palabra de motivación, cariño y aliento, pero también por cada regaño, agradezco mucho que haya compartido su experiencia y conocimientos, por siempre preocuparse por el verdadero aprendizaje sin importar las horas que tuviera que dedicarme. A la Dra Gabriela Castañeda, por siempre ayudarme a exigirme mas a mi mismo. Al Dr. Alejandro Zamilpa por enseñarme lo increíble que es la fitoquímica y brindarnos su experiencia. Al Dr. Ferrer por su apoyo incondicional en cada experimento, contar con usted y su experiencia siempre fue reconfortante. Al Dr. Joel Barrita, por su disposición en cada etapa de este proyecto, así como sus consejos y apoyo moral. Al Dr Arrellín, nunca olvidaré la clase de histología en una servilleta, su experiencia fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Celeste, Marisol, Laura, Brenda, Paty, Lety, Chary, Zimri, Cesar y Alejandro por su apoyo, disposición y guía en los experimentos. A Gaby, por haber coincidido en esta etapa desde que inició, ser apoyo moral y seguir paso a paso hasta el final de la misma.

Quiero agradecer especialmente a Ana por estar ahí siempre, sin importar la fecha ni la hora dispuesta a ayudarme, a Julieta por su paciencia y consideraciones, por ayudarme a levantarme en los momentos que sentí que no podría y compartir un poco de locura cada día. Sin ustedes cada experimento y cada etapa del proyecto no habría sido tan divertida, me llevo las mejores experiencias, recuerdos y anécdotas, aprendí mucho de ustedes.

A mi Familia especialmente a mi mamá por su apoyo incondicional, soy afortunado por tenerte. A Liliana por el apoyo en cada etapa, por cada llamada y mensaje, cada visita y cada palabra de aliento. Por ayudarme a creer en mi, recordarme quien soy y a donde voy.

Gracias a todos.

Índice.....	5
Resumen.....	8
1. Introducción.....	10
1.1 Inflamación.....	10
1.1.1 Aguda.....	11
1.1.1.1 Tránsito celular.....	12
1.1.2 Crónica.....	13
1.1.3 Modelos de inflamación.....	14
1.1.3.1 TPA.....	14
1.2 Cicatrización.....	15
1.2.1 Las etapas de la cicatrización.....	15
1.2.1.1 Hemostasia.....	15
1.2.1.2 Inflamación.....	16
1.2.1.3 Proliferación.....	18
1.2.1.4 Remodelación.....	18
1.2.2. Cicatrización patológica.....	18
1.2.2.1 Obesidad, resistencia a la insulina y cicatrización.....	19
1.3 Modelos de cicatrización.....	23
1.4. Tratamientos antiinflamatorios y cicatrizantes.	24
1.5. Tratamientos alternos para el control de la inflamación y cicatrización.....	25
2. Material vegetal.....	25
2.1. Taxonomía de S. edule.....	25

2.2 Descripción botánica.....	26
2.3 Etnofarmacología de <i>Sechium edule</i>	26
2.4 Farmacología de <i>Sechium edule</i>	27
2.4.1. Compuestos Fenilpropanoides.....	29
2.4.1.1. Actividad biológica reportada en inflamación y cicatrización.....	29
3. Planteamiento del problema.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivo general.....	32
6. Objetivos particulares.....	32
7. Metodología.....	32
7.1 Obtención del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo....	32
7.1.1 Análisis cromatográfico del extracto y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de <i>Sechium edule</i>	33
7.2 Formulación de gel.....	33
7.3 Animales de experimentación.....	33
7.3.1 Modelo murino de inflamación auricular inducido por TPA.....	33
7.3.1.1 Valoración del edema..	36
7.3.1.2 Cuantificación de células Sanguíneas.....	36
7.3.2 Modelo murino de cicatrización.....	37
7.3.2.1 Herida por escisión.....	37
7.3.2.1.1 Aplicación de tratamientos	38
7.3.2.1.2 Cinética de cicatrización	38

7.3.3 Inducción de resistencia a la insulina por obesidad.....	38
7.3.3.1 Medición del peso y longitud naso-anal.....	39
7.3.3.2 Determinación del índice de Lee.....	39
7.3.3.3 Determinación sérica de glucosa y glucosa postprandial.....	40
8.Pruebas estadísticas.....	40
9.Resultados.....	41
9.1. El extracto RSe-HA y las fracciones RSe-AQ Y RSe-AE presentan compuestos fenólicos, principalmente ácido cinámico, cumárico y ferúlico.....	41
9.2 Los diferentes tratamientos obtenidos de la Raíz de <i>Sechium edule</i> controlan la inflamación inducida por TPA de manera tan eficiente como la dexametasona.....	42
9.3 Los diferentes tratamientos en dosis de 221 µg/or obtenidos de La Raíz de <i>Sechium edule</i> regulan el tránsito de las diferentes poblaciones celulares inducidas por la inflamación por TPA.	43
9.4. El extracto RSe-HA en la concentración de 221 µg acelera el proceso cicatricial de heridas por escisión comparado con los controles.....	46
9.5 El extracto RSe-HA acelera el proceso cicatricial de herida por escisión en ratones con obesidad y resistencia a la insulina.	48
10. Discusión.....	52
11.Conclusión.....	55
12. Referencias bibliográficas.....	56

Palabras Clave: Inflamación, Resistencia a la insulina, Cicatrización, Obesidad, Síndrome metabólico, Ácido Cinámico.

Resumen

La cicatrización es un proceso biológico complejo que tiene la finalidad de reparar la integridad del tejido dañado. Existen múltiples factores que pueden generar problemas de cicatrización, entre los cuales podemos destacar problemas nutricionales, obesidad y diabetes. Las personas obesas, frecuentemente se enfrentan a complicaciones en heridas, incluyendo infecciones, dehiscencia, formación de hematomas, seromas, úlceras por presión y úlceras venosas.

En este trabajo se evaluó la capacidad de *Sechium edule* para controlar la inflamación y las patologías asociadas en un modelo de obesidad y resistencia a la insulina, con la finalidad de identificar extractos en los que subyacen estas capacidades, y evaluar si su papel antiinflamatorio favorece el proceso de cicatrización.

Se llevó a cabo la generación de un extracto hidroalcohólico y de sus fracciones acuosa y acetoétilica a las cuales se les realizó un análisis fitoquímico que indicó la presencia de ácido cumárico, cinámico y otros compuestos fenólicos en el extracto RSe-HA, así como ácido ferúlico, cinámico y cumarico, en la fracción RSe-AE y ácido cinámico en la fracción RSe-AQ.

Posteriormente se evaluó la capacidad del efecto antiinflamatorio de *S. edule* en un modelo murino de inflamación auricular inducido por TPA en ratones machos de la cepa ICR de 8 a 10 semanas de edad, para identificar la concentración antiinflamatoria efectiva del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule* aplicadas tópicamente.

Una vez detectadas las 3 mejores concentraciones de los extractos, se evaluó su capacidad cicatrizante, para lo cual se utilizaron ratones machos sanos y con obesidad y resistencia a la insulina de la cepa C57BL/6 mediante el modelo de herida por escisión. Se evaluó la cinética de cicatrización para determinar el extracto o fracción con el mejor efecto cicatrizante.

En el modelo de inflamación auricular inducido por TPA la aplicación tópica del extracto rSe-HA y las Fracciones rSe-AQ y rSe-AE controló el edema y reguló el tránsito celular, mientras que en los ensayos de herida por escisión en ratones sanos y en ratones con obesidad y resistencia a la insulina, el extracto rSe-HA aceleró el cierre de la herida

1. Introducción

1.1 Inflamación

La respuesta inflamatoria es un proceso de protección en el que participan tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa (dependiendo del tipo de inflamación que se trate) que se da cuando hay un daño (físico o metabólico o cuando hay infección y tiene la finalidad de regresar al organismo a las condiciones homeostáticas previas al suceso) ¹.

Este proceso se caracteriza por presentar: calor, dolor, rubor, tumor y pérdida de la función, las cuales reflejan los efectos de citocinas y mediadores inflamatorios sobre los tejidos y los vasos sanguíneos locales. La dilatación y la permeabilidad aumentada en los vasos sanguíneos durante los procesos inflamatorios, llevan al incremento del flujo sanguíneo local y al escape de líquidos hacia los tejidos, y esto explica el aumento de la temperatura, el enrojecimiento y la hinchazón ².

Las células que participan en el proceso son tanto circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos y basófilos) así como las células del tejido conjuntivo (mastocitos, que se sitúan alrededor de los vasos sanguíneos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos residentes) ³.

La inflamación inicia porque los macrófagos, mastocitos y células dendríticas tisulares tienen diferentes tipos de receptores que les permiten reconocer tanto el daño como la infección, posterior a ello se liberan mediadores inflamatorios que pueden ser de origen lipídico como los derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos), aminoácidos modificados (histamina y serotonina) o citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) que son el producto de la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B que permite la expresión de las citocinas. Los mediadores lipídicos provienen de los fosfolípidos de la membrana celular a través de la enzima fosfolipasa A₂, que los descompone en glicerol y ácido araquidónico, por la vía de las ciclooxigenasa produciendo prostaglandinas y tromboxanos ⁴. Diferentes células elaboran prostaglandinas como son los monocitos y macrófagos que sintetizan PGE₂ y PGF₂, los neutrófilos que producen PGE₂ y los mastocitos PGD₂. Las prostaglandinas poseen efectos

fisiológicos como el incremento de la permeabilidad vascular y la dilatación vascular e inducción de la quimiotaxis de los neutrófilos ⁵.

Inductores de inflamación desencadenan la producción de numerosos mediadores inflamatorios los cuales son capaces de alterar la función de varios tejidos y órganos, muchos de estos mediadores inflamatorios tienen efectos en común sobre la vasculatura y el reclutamiento de leucocitos. Estos mediadores pueden derivarse de proteínas plasmáticas o secretadas por células ^{6,7}.

La respuesta inflamatoria puede dividirse en dos tipos: Aguda y crónica

1.1.1 Inflamación aguda

La respuesta inflamatoria aguda se define como una serie de eventos que se dan en los tejidos durante las primeras 6 h después de la inducción del daño o infección, y se resuelve cuando el agente causal es eliminado. Durante este proceso también se da la reparación del tejido dañado y las principales células que participan son los PMNs (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Sus principales características son el edema y el infiltrado de leucocitos ⁸.

El edema es producto de la acción del TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) y de mediadores vasoactivos, como histamina y leucotrienos C₄ y D₄, los cuales estimulan la vasodilatación ^{9, 10}. La histamina además aumenta la vasodilatación indirectamente por el incremento en la producción de prostaglandinas. ¹⁰ Los Factores C3a y C5a del sistema del complemento, tienen un rol dual al estimular la vasodilatación y actuando como quimioatrayentes para las células inflamatorias circulantes que llegan al sitio de herida o infección a través de diapedesis y mantienen el proceso inflamatorio ¹¹. Al exudarse el plasma, se lleva consigo proteínas como IL-8, NAP-2, C5a y C5b, fibrinopéptidos, prostaglandinas y leucotrienos que atraen y activan a los neutrófilos. Estas células fagocitan al patógeno invasor y liberan mediadores como las Proteínas Inflamatorias para Macrófagos 1a y 1b (MIP-1a y MIP-1b) que son quimiocinas que atraen y activan a los monocitos que al llegar al tejido se diferencian a macrófagos y cuando se activan secretan interleucina-1 β (IL-1 β) interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8),

interleucina-12 (IL-12) y TNF- α así como diversos eicosanoides ¹². La IL-1 β favorece el acceso de las células inflamatorias al tejido, ya que activan a las células endoteliales por lo que producen moléculas de adhesión como integrinas, selectinas y otras moléculas de la súper familia Inmunoglobulinas, así como la producción de la quimiocina IL-8; el TNF - α aumentan el edema. Por otra parte, la IL-12 activa las células NK tisulares las cuales en respuesta producen interferón gamma (IFN- γ) que por un lado potencia la activación de los macrófagos ya activados, así como activa a nuevos macrófagos ¹³.

1.1.1.1 Tránsito celular

Bajo condiciones normales, los neutrófilos son producidos únicamente en la médula ósea por un proceso denominado granulopoyesis ¹⁴. Los neutrófilos son liberados a la circulación de manera muy regulada, de hecho, en un estado estable, solo una pequeña fracción de neutrófilos es liberada a la circulación, sin embargo bajo condiciones de estrés como daño o infección, el conteo de neutrófilos en sangre puede aumentar significativamente ^{15, 14}.

Varios tipos celulares son conocidos por participar en las reacciones de inflamación aguda. Las marcadas similitudes en el transcurso de la inflamación, en modelos como el TPA y AA sugieren una actividad predominante de células de origen mielóide sobre las células linfoides en la respuesta inflamatoria aguda ¹⁶. Los mastocitos, debido a su localización y distribución en los espacios perivascuales, pueden responder y reaccionar al flujo transvascular siendo activados de manera temprana durante la inflamación aguda, además debido a su contenido de mediadores como histamina, serotonina y factores de necrosis tumoral, aumentan la permeabilidad vascular y afectan el flujo de neutrófilos. De manera que los mastocitos resultan críticos para la completa expresión de una respuesta inflamatoria, edema, permeabilidad vascular y afluencia de neutrófilos ¹⁷.

1.1.2 Inflamación crónica

La inflamación crónica puede durar mucho tiempo y existe una fuerte interacción entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. En los tejidos bajo esta condición hay linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Los macrófagos producen citocinas, eicosanoides y factores de crecimiento que activan a los fibroblastos. Estos a su vez producen colágena y potencian el proceso inflamatorio activando a otros macrófagos y atrayendo a linfocitos activados, por lo que la respuesta inflamatoria se potencia. En este proceso, el endotelio se activa como respuesta a la IL-1 β , que induce el aumento en la expresión de ICAM1 y VCAM1, que se fijan a las integrinas de los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos circundantes quienes reconocen estas moléculas de adhesión sobre las paredes de los vasos sanguíneos, se adhieren a estos y luego pasan a través de la pared vascular hacia los espacios tisulares. A su vez se produce IL-8 que atrae y activa a más neutrófilos⁵.

En cualquier respuesta inflamatoria la diferencia entre los tipos de moléculas de adhesión que exprese el endotelio determina el tipo de células que serán reclutadas al sitio de inflamación; es decir, ellas determinan la entrada de neutrófilos, monocitos o Linfocitos. Los monocitos que entran a los tejidos en pocos días se diferencian a macrófagos. En el tejido, los linfocitos y macrófagos secretan factor de crecimiento transformante β (TGF- β) que al activar a los fibroblastos los llevan a la producción de fibras de colágena que es una de las características de este tipo de inflamación.¹³ Durante la respuesta inflamatoria crónica, la acumulación de altas concentraciones de macrófagos activados produce lesión tisular severa debido a que dichas células liberan enzimas hidrolíticas, radicales libres y secretan TNF- α . La activación de los macrófagos por el IFN- γ incrementa la síntesis del TNF- α y la acción sinérgica de ambas citocinas mantienen la respuesta inflamatoria crónica.

1.1.3 Modelos de inflamación

Durante muchos años, se han utilizado modelos animales de inflamación aguda para identificar agentes potencialmente antiinflamatorios. El ácido araquidónico y el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) son agentes inflamatorios utilizados como modelos caracterizados por reacciones de inflamación aguda, generación rápida de eritema, edema e infiltración de neutrófilos ¹⁸

Ambos modelos fueron diseñados para evaluar la capacidad de compuestos para prevenir la reacción inflamatoria ¹⁷.

1.1.3.1 TPA

En el caso del TPA, una sola aplicación en la oreja del ratón genera una respuesta edematosa que alcanza su máximo nivel a las 6 horas. También induce infiltración de neutrófilos, los cuales alcanzan sus niveles máximos a las 24 horas ¹⁹. En este modelo, el edema está asociado con un incremento en el contenido de eicosanoides como Prostaglandina E₂ (PGE₂) y leucotrieno B₄ (LTB₄) ^{17, 20}. A pesar de que el mecanismo no está completamente dilucidado, se sabe que induce un incremento de eicosanoides, activación de la proteína cinasa C (PKC) ²¹, la fosfolipasa A2 que resulta en la liberación de ácido araquidónico ²², inducción de la ciclooxigenasa ^{23, 24} y activación de la lipooxigenasa ²⁵.

El uso de inhibidores de moléculas encargadas de la biosíntesis de prostaglandinas como la ciclooxigenasa y de leucotrienos como la 5-lipooxigenasa y LTB₄, han demostrado ser efectivos para contrarrestar el edema en este modelo ²⁶. Esto sugiere que los eicosanoides tienen un papel esencial en la inflamación inducida por el TPA por lo que el modelo ha sido ampliamente utilizado para la búsqueda de compuestos con capacidad antiinflamatoria ^{17, 27}.

1.2 Cicatrización

La cicatrización es un proceso biológico complejo que tiene la finalidad de reparar la integridad del tejido, puede ser dividido en 4 fases, hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación del tejido. La herida puede ocurrir por enfermedad o por cualquier tipo de fuerzas mecánicas o térmicas que dañan el tejido y los vasos provocando una hemorragia con exposición del colágeno, el endotelio y las proteínas intra y extravasculares ^{28, 29}. Independientemente del origen de la herida, el proceso de cicatrización es muy similar.

Durante la etapa de hemostasia e inflamación, que se da inmediatamente después de la lesión, los macrófagos residentes contribuyen al inicio de la respuesta inflamatoria, la cual lleva al influjo de un gran número de neutrófilos al sitio de la herida mientras se forma el coágulo de fibrina y se origina una matriz provisional a su alrededor ³⁰. Durante la etapa de formación de tejido o remodelación se desarrolla un tejido granulado altamente vascularizado dentro de la herida que engloba una gran cantidad de células, principalmente macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. Durante la etapa de reorganización de tejido o remodelación se genera tejido cicatricial caracterizado por un incremento en la deposición de matriz y una disminución en la densidad celular ³⁰.

1.2.1 Las etapas de la cicatrización

1.2.1.1 Hemostasia

El objetivo de este proceso es prevenir la hemorragia, la formación del coágulo y sentar las bases para los siguientes pasos que llevarán al sanado de la herida ³¹. El primer paso es la vasoconstricción que ayuda a la disminución del flujo sanguíneo, a través de la contracción del músculo liso en la capa circular de la pared del vaso mediado por el aumento de los niveles citoplasmáticos de calcio ³². A nivel celular, los mediadores más importantes para la hemostasia son la fibrina y las plaquetas, que minutos después de la lesión al tejido, formarán un coágulo visible a simple vista generado por una matriz de proteínas, que no solo contribuirá a la formación del coágulo, sino que funcionará como un puente para las células inflamatorias, fibroblastos y factores de crecimiento ³¹.

La hemostasia se da a través de tres mecanismos clave que son: la vía extrínseca e intrínseca de la coagulación y la formación del tapón plaquetario.

La vía extrínseca es esencial para la formación del trombo, comenzando por la exposición del factor tisular sobre la superficie subendotelial. El factor tisular se une al factor VII y activa a los factores IX y X ⁸. Por otra parte la vía intrínseca tiene lugar mediante la activación del factor XII, iniciando la cascada proteolítica que resulta en la activación del factor X ²⁹. Ambas vías activan el factor X que convierte la protrombina en trombina cuya función es catalizar la conversión del fibrinógeno en fibrina ²⁹ cuyos monómeros son entrecruzados por el factor XIII y unidos directamente a las plaquetas para la formación del coágulo ^{33, 34}.

Las plaquetas activadas se adhieren y se agrupan en los sitios de colágeno expuesto para formar el tapón plaquetario y detener temporalmente el sangrado, este tapón es reforzado por fibrina, el factor de von Willebrand y filamentos de actina y miosina dentro de las plaquetas ³⁵ que una vez activadas secretan el contenido de sus gránulos, los cuales funcionan como reservorios biológicos de proteínas activas, que participan en todas las etapas de la cicatrización, estos gránulos contienen P-selectina, fibrinógeno, albúmina, factor V y otras proteínas que ayudan en la formación temprana del coágulo y de la matriz ^{36, 37}. Otros gránulos liberan factores de crecimiento como el factor derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante (TGF- β), FGF-2, VEGF, IGF, factor de crecimiento epidermal (EGF) y esfingosina-1-Fosfato (S1P). Estos factores influirán en muchas células, incluyendo fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales a lo largo del proceso cicatricial ^{38, 39}.

1.2.1.2 Inflamación

Durante la cicatrización, la finalidad de ésta etapa es prevenir la infección. A nivel básico la inflamación involucra la entrega coordinada de componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) al sitio de lesión ^{6,7}. Esta respuesta es desencadenada por los receptores de la respuesta inmune innata como los TLRs y NLRs ⁴⁰. El reconocimiento inicial es mediado

por los macrófagos residentes y mastocitos dando lugar a la producción de una gran variedad de mediadores inflamatorios incluyendo quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas¹². El principal y más inmediato efecto de estos mediadores es provocar un exudado inflamatorio local formado principalmente por proteínas plasmáticas y leucocitos que de manera normal estarían restringidos a los vasos sanguíneos permitiendo de esta manera que tengan acceso a través de las vénulas postcapilares al sitio de la herida³¹.

Independientemente del origen de la lesión, los neutrófilos son las primeras células en dar respuesta infiltrando la herida una hora después de la lesión⁸. Varios factores de crecimiento y citocinas como PDGF y la IL-8 atraen a los neutrófilos a la herida. En una herida no infectada, los neutrófilos se mantienen en la zona dañada por poco tiempo, las poblaciones pico se han encontrado entre las 24 y 48 horas⁸. Durante ese tiempo funcionan como removedores tempranos de desechos celulares, partículas foráneas y bacterias. Además de ello, son fuente importante de citocinas proinflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, y TNF- α ^{38,41}

Los monocitos circulantes llegan poco tiempo después que los neutrófilos al sitio de la herida, en donde son activados y subsecuentemente transformados en macrófagos^{42,43}. Al igual que los neutrófilos, los macrófagos remueven desechos celulares, partículas externas y bacterias, sin embargo permanecen por más tiempo (Días a semanas), alcanzando sus picos máximos entre las 48 y 78 horas.^{44,45} Una vez activados, los macrófagos residen en la matriz extracelular provisional de fibrina y secretan factores de crecimiento y citocinas. El proceso inflamatorio es perpetuado a través de la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, y TNF- α por parte de los macrófagos³⁸. Los fibroblastos son estimulados para producir colágeno mediante FGF-2, TGF- β e IGF derivados de macrófagos. El TGF- β promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, mientras que la angiogénesis es estimulada por la liberación de FGF-2, VEGF-A y TGF- β . Además, los macrófagos producen TGF- α , FGF-2 e IGF-1 que influyen de manera positiva el proceso de reepitelización³⁸.

La fase inflamatoria de la cicatrización persistirá tanto como sea necesario, asegurando la protección contra el crecimiento excesivo de bacterias, sin embargo, la inflamación

prolongada puede llevar a daño extenso en el tejido, proliferación retardada y la formación de una herida crónica ⁴⁶.

1.2.1.3 Proliferación

Una vez que el estímulo de la herida cede, se ha dado correctamente la hemostasia y la respuesta inflamatoria ha sido equilibrada, la etapa de proliferación comienza para reparar el daño. Este proceso incluye a la angiogénesis, la formación de tejido granular, deposición de colágeno, epitelialización y retracción de la herida simultáneamente. La proliferación tiene lugar entre los 4 y 12 días después de la lesión ²⁹.

1.2.1.4 Remodelación

La etapa final de la cicatrización dura hasta 2 años concluyendo con el desarrollo normal del epitelio y maduración de la cicatriz. Requiere de un balance entre la síntesis y la degradación, el colágeno y las proteínas depositadas en la herida se vuelven cada vez más organizadas. En algún punto logran una estructura similar a la del tejido que no ha sido dañado, sin embargo, nunca se alcanza el mismo nivel de fuerza en el tejido, logrando solo el 50% de la fuerza tensil original a los tres meses y el 80 % a largo plazo ²⁹.

1.2.2. Cicatrización patológica

Existen cuatro respuestas básicas que pueden darse cuando ocurre una herida. La reparación normal es la respuesta en la que se restablece el equilibrio entre la formación de la cicatriz y su remodelación, es la respuesta típica en la mayoría de los humanos que sufren una herida. Por otro lado, puede darse una respuesta patológica del tejido a la lesión, esta respuesta puede ser una cicatrización excesiva en la que hay demasiada deposición del tejido conectivo, lo que resulta en la alteración de la estructura y la pérdida de la función causando fibrosis, lo que origina formación de queloides, heridas hipertróficas y contracturas ⁴⁷.

De manera opuesta a la fibrosis, la cicatrización deficiente se da cuando la deposición del tejido conectivo es insuficiente, debilitando el tejido a tal grado que puede desprenderse. Las úlceras crónicas son ejemplos de cicatrización deficiente.

El último tipo de respuesta es la regeneración, que ocurre cuando se da la pérdida de la estructura y la función, pero el organismo tiene la capacidad de reemplazar la estructura restaurándola exactamente como se encontraba antes de la lesión. Las salamandras y los cangrejos pueden regenerar tejidos de esta forma, los seres humanos en cambio solo pueden reemplazar algunos tipos de tejido dañado por el proceso de regeneración, tal es el caso del hígado, la epidermis y algunos nervios que pueden ser parcialmente regenerados después de una lesión.

1.2.2.1 Obesidad, resistencia a la insulina y cicatrización

Existen múltiples factores que pueden generar problemas de cicatrización, entre los cuales podemos destacar problemas nutricionales, obesidad y diabetes.

Por más de 100 años, la nutrición ha sido reconocida como un factor muy importante que afecta la cicatrización. La malnutrición, así como deficiencias de nutrientes específicos puede tener un profundo impacto en la cicatrización de heridas provocadas por un trauma o cirugía. Los pacientes con alguna herida crónica, a menudo requieren de nutrientes especiales.

Los problemas nutricionales engloban situaciones de desnutrición que son resultado de una disminución o inadecuada ingesta de alimentos, así como una sobrenutrición causada por el consumo excesivo y deficiente de nutrientes ⁴⁸. Entre las consecuencias que se destacan de estos problemas nutricionales, la obesidad ha tomado relevancia pues en la actualidad, representa un problema de salud pública de primera magnitud, que ubica a México en los primeros lugares a nivel mundial. Según la Organización Mundial de Salud (OMS), en el 2005 había aproximadamente 400 millones de adultos obesos y se estima para el año 2015 serán aproximadamente 2300 millones de personas con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad ⁴⁹.

La obesidad es un problema de salud grave que se asocia a un estado pro inflamatorio crónico de bajo grado que juega un papel importante en la generación de patologías como la resistencia a la insulina, la dislipidemia y la disfunción endotelial que a su vez llevan a la diabetes tipo 2 y a las enfermedades cardiovasculares ⁵⁰, que hoy en día se han convertido en un problema de salud muy importante en nuestro país y en el mundo entero con un alto índice de mortalidad.

El estado inflamatorio que acompaña a la obesidad y que desencadena al síndrome metabólico no corresponde exactamente a la definición clásica de inflamación aguda o crónica, ya que no se acompaña de infección ni de lesiones en el organismo. La dimensión de esta respuesta inflamatoria no es tan grande, pero si es constante. A este estado se le conoce como "metainflamación" (inflamación crónica de "bajo grado" activada metabólicamente) ⁵¹ o incluso "para-inflamación" como un término para definir un estado intermedio entre un estado basal e inflamatorio ¹². Esta forma de inflamación tiene características únicas y sus causas aún no están completamente entendidas ⁵². Durante este estado se producen citocinas como IL1, IL6 y TNF- α que, por un lado, inducen un estado catabólico en músculo, hígado y tejido adiposo, para suministrar energía para la intervención del sistema inmune ⁵¹, por otro lado, actúan sobre el receptor IRS-1 evitando la captura de glucosa por el tejido. Sin embargo, la señal más importante que indica la falla del tejido adiposo es el incremento de los ácidos grasos no esterificados (NEFA) ⁵³, lo que refleja la incapacidad del tejido para amortiguar el exceso de la ingesta de nutrientes que lleva al estado dislipidémico, que es típico del síndrome metabólico (SM). Cuando se da este exceso, el hígado incrementa la producción de apo-B que acarrean triacilgliceroles hacia el tejido adiposo generando la formación lipoproteínas de baja densidad (LDL) ⁵⁴ y de muy baja densidad (VLDL) que son producidas durante la hiperglicemia ⁵³. El tejido adiposo que los captura con mayor avidez es el visceral y luego el subcutáneo y cuando ambos ya no pueden almacenar más lo hacen el hígado, corazón, páncreas y músculo haciéndolos grasos ^{55, 56} e impidiendo su funcionamiento normal. Esto lleva a la lipotoxicidad y en el caso de músculo, hígado, páncreas y tejido adiposo a la resistencia a la insulina (RI). En estudios experimentales en ratón, se ha demostrado que la administración de una dieta hipercalórica induce resistencia a la insulina y afecta el proceso de cicatrización retrasando la contracción de la herida y extendiendo la fase inflamatoria ⁵⁷.

La infección y las lesiones activan el sistema inmune y provocan cambios metabólicos que defienden al organismo contra invasores y facilitan la reparación del tejido dañado. La producción de citocinas y moléculas oxidantes es parte fundamental del mecanismo para la creación de un ambiente hostil para patógenos dentro del cuerpo.

La cicatrización en pacientes con desnutrición es deficiente porque se reduce su capacidad para producir citocinas que son esenciales para la recuperación de infecciones y traumas ⁵⁸.

La resistencia a la insulina es la principal condición asociada a muchas de las características de la diabetes tipo 2, incluyendo dislipidemia, hipertensión, obesidad abdominal, hiperglicemia y arterioesclerosis ⁵⁹. La resistencia a la insulina es un desencadenante para la reacción de fase aguda asociada a las citocinas en la diabetes tipo 2. Las enfermedades del sistema inmune innato pueden por lo tanto verse como una consecuencia de la resistencia a la insulina e hipoglucemia intracelular ¹¹.

En personas sanas, el proceso de cicatrización es guiado y mantenido a través de la integración de múltiples señales liberadas por queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. Durante la hipoxia inducida por la herida, los macrófagos liberan VEGF, los fibroblastos y células epiteliales inducen fosforilación y activación de la eNOS en la médula ósea, dando como resultado un incremento en los niveles de óxido nítrico, lo que desencadena la movilización de las EPCs (Células endoteliales progenitoras derivadas de la médula ósea) de la médula ósea a la circulación ⁶⁰. Las EPCs tienen un papel crucial en el proceso de neovascularización en respuesta a condiciones de isquemia como es el caso de heridas en diabéticos que son complicadas por la disminución del flujo sanguíneo periférico. Las EPCs son movilizadas por la activación de la eNOS en la médula ósea, un proceso que se ve afectado en condiciones de resistencia a la insulina, evitando que las células puedan alcanzar adecuadamente el sitio de la herida ⁶¹. Además la expresión de SDF-1 α está disminuida en las células epiteliales en heridas de diabéticos, lo que también evita la llegada de las EPCs a la herida, limitando por lo tanto la cicatrización ⁶⁰.

Las personas obesas, frecuentemente se enfrentan a complicaciones en heridas incluyendo infecciones, dehiscencia, formación de hematomas y seromas, úlceras por presión y úlceras venosas ⁶². Se ha reportado un incremento en la frecuencia de complicaciones en heridas de pacientes obesos sometidos a operaciones, en particular, una mayor tasa de infección del sitio quirúrgico. Muchas de estas complicaciones pueden ser resultado de una hipoperfusión relativa e isquemia que se produce en el tejido adiposo subcutáneo, así como por una distribución disminuida de antibióticos. Por otra parte, en las heridas quirúrgicas, el aumento de la tensión en los bordes de la herida que es frecuentemente observado en pacientes obesos, también contribuye a la dehiscencia de la herida. La tensión de la herida aumenta la presión en el tejido, reduciendo la microperfusión y la disponibilidad de oxígeno hacia la herida.

De igual forma, el incremento de las úlceras por presión, está influenciado por la hipovascularización que provoca baja perfusión, volviendo el tejido más susceptible a este tipo de daño. Además de que la dificultad de los individuos obesos para cambiar de posición por sí mismos, incrementa el riesgo de lesiones provocadas por presión. Por otro lado, los pliegues en la piel albergan microorganismos que prosperan en áreas húmedas y contribuyen a la infección y descomposición del tejido. Todos estos factores predisponen a las personas obesas a presentar problemas de cicatrización deficiente ^{62, 63, 64}.

Además de las condiciones locales, existen factores sistémicos que juegan un papel crucial en el desarrollo de una cicatrización deficiente y sus complicaciones. Debido a que la obesidad puede estar relacionada con estrés, ansiedad y depresión que son condiciones capaces de alterar la respuesta inmune ⁶².

Hasta hace poco, la función del adipocito era considerada principalmente como de reserva calórica, sin embargo, se ha descubierto que el tejido adiposo, secreta una gran variedad de sustancias bioactivas, conocidas como adipocinas. Tanto los adipocitos como los macrófagos tienen la capacidad de producir moléculas bioactivas como citocinas, quimiocinas, y sustancias con actividad hormonal como la leptina y adiponectina. Las adipocinas tienen un gran impacto en la respuesta del sistema inmune e inflamatoria ^{65, 66}.

existiendo una influencia negativa de las adipocinas sobre la respuesta inmune sistémica que parece afectar de manera similar el proceso de cicatrización.

1.3. Modelos de cicatrización

Existen varios tipos de modelos descritos en la literatura, incluyendo modelos de incisión ⁶⁷, escisión ⁶⁸, quemadura ⁶⁹ y granulación del tejido ⁷⁰. En el modelo de escisión, la curación se produce a través de los bordes de la herida, este tipo de modelo permite la evaluación más amplia de los mecanismos involucrados en la cicatrización. La herida es fácilmente colectada y puede ser analizada mediante métodos inmunohistoquímicos y moleculares, además de permitir la aplicación de medicamentos directamente en la herida, para su evaluación farmacológica ⁷¹.

A pesar de que la piel del ratón consiste en tres capas al igual que la de los humanos (Epidermis, dermis, hipodermis), existen diferencias muy significativas en la anatomía y fisiología de cada capa. En los ratones, la piel está cubierta por una gran cantidad de pelo que atraviesa un ciclo definido de crecimiento con las mismas etapas que en el ciclo de crecimiento del pelo en humanos ⁷². Sin embargo, en los ratones, el pelo dorsal pasa de craneal a caudal y sus características temporales pueden diferir significativamente de las de varias regiones del cuerpo humano. Por ejemplo, el ciclo del pelo del ratón es de aproximadamente tres semanas, mientras que el ciclo piloso del cuero cabelludo humano puede durar varios años ⁷².

Además de esto, la piel del ratón carece de glándulas sudoríparas y posee una capa llamada panículo carnoso que produce una contracción rápida de la herida cuando hay una lesión, mientras que los humanos sanan las heridas mediante la reepitelización y formación del tejido granular. Otro punto a considerar para el diseño de un experimento, es la diferencia significativa de género en la anatomía y fisiología de la piel en ratones, ya que la piel en machos es 40% más fuerte debido a que presentan una epidermis e hipodermis mucho más gruesa que la de las hembras ⁷³.

1.4. Tratamientos antiinflamatorios y cicatrizantes

Los medicamentos antiinflamatorios más utilizados son los antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), estos inhiben las enzimas ciclooxigenasa (COX) y la producción de prostaglandinas; no inhiben las vías de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico (AA), y por lo tanto no suprimen la formación de leucotrieno. Los glucocorticoides en cambio suprimen la expresión inducida de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y con ello, la producción de prostaglandina mediada por dicha ciclooxigenasa. También inhiben la acción de la fosfolipasa A₂, que libera de la membrana celular el ácido araquidónico⁴.

Después de una cirugía, las incisiones suelen ser cerradas uniendo los bordes mediante suturas, grapas, adhesivos o clips. Este proceso ayuda a que los bordes cortados puedan sanar juntos, a lo que se le denomina cicatrización por primera intención. Sin embargo, cuando las heridas no son cerradas de esta manera, generalmente por que el riesgo de infección es alto, o ha habido una pérdida significativa de tejido, las heridas pueden dejarse abiertas para sanar por el crecimiento del tejido en lugar del cierre primario, esto se conoce como cicatrización por segunda intención. Hay riesgo de infección en heridas abiertas que puede afectar el proceso de cicatrización, por lo que suelen utilizarse antisépticos, antibióticos y antiinflamatorios para prevenir o tratar dichas infecciones⁷⁴.

Si la herida es aguda, suele suturarse o utilizarse adhesivos como el 2 octil-cianoacrilato; líquido que al juntar los bordes de la herida, los conserva unidos mientras cicatrizan, así como cintas de poliuretano. En cambio si la herida es crónica pueden utilizarse apósitos o gasas impregnados de medicamentos que pueden permanecer en la herida por más de 24 horas, estos suelen contener carbón activado y plata, en caso de heridas infectadas; así como alginato de calcio, cuyas fibras se hinchan al contacto con la sangre o la secreción de la herida y originan un material gelatinoso que atrapa bacterias y restos celulares⁷⁵.

1.5. Tratamientos alternos para el control de la inflamación y cicatrización

En la medicina tradicional, se han utilizado diferentes extractos de plantas para el tratamiento de una amplia gama de desórdenes, incluyendo la inflamación y cicatrización. Entre los compuestos activos de estos extractos se encuentran los polifenoles; éstas moléculas son metabolitos secundarios de las plantas con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales y antimicrobianas que comienzan a tener gran importancia en el sector salud.

La Ley General de Salud de 1998 define a los fitomedicamentos como un extracto vegetal conformado por una mezcla de compuestos que pueden modificar la evolución y las complicaciones de una enfermedad, por lo tanto, son una alternativa real, para el control integral de las complicaciones de cualquier enfermedad.

En la actualidad existen varios problemas de resistencia, degradación ambiental y contaminación asociada con el uso irracional de los medicamentos, lo que ha renovado el interés en una fuente natural, efectiva y segura de alternativas en el manejo de los problemas de salud. Debido a esto se ha originado un gran interés en la comunidad científica por explorar la actividad farmacológica de las plantas medicinales y confirmar las propiedades que se les atribuyen en medicina tradicional ⁷⁶.

2. Material vegetal

2.1. Taxonomía de *S. edule*

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliópsida

ORDEN: Cucurbitales

FAMILIA: Cucurbitaceae

GÉNERO: *Sechium*

ESPECIE: *Sechium edule* (Jacq.) Sw

Nombre común: Chayote

2.2 Descripción botánica

Es una enredadera herbácea perenne, con zarcillos ramificados para sujeción, de hojas ampliamente ovadas o ligeramente lobuladas y cordadas (en forma de corazón) en la base y apiculadas (cónicas) en el ápice, de 7 a 25 cm de largo, las hojas jóvenes son pubescentes y cuando maduran son de textura áspera. El peciolo es de 3 a 15 cm de largo. Sus flores son unisexuales, de color blanquecino o verdoso en forma de estrella, organizadas en racimos de 10 a 30 cm de largo, al igual que las hojas, éstas son pubescentes; las masculinas poseen nectarios prominentes. El cáliz está dividido en 5 partes. El fruto tiene diferentes formas (ovoide, globoso, subovoide o piriformes) son de color verde pálido a verde oscuro, con o sin espinas; son carnosos y al madurar fibrosos. La pulpa es insípida y presenta una semilla suave y aplanada. Los tallos son largos, huecos y con escasos tricomas. La planta crece de una sola raíz, de la cual se pueden formar muchos tallos, que alcanzan longitudes de 6 a 15 metros. Produce raíces adventicias de forma tuberosa que son comestibles al igual que el fruto ^{77, 78, 79, 80}.

2.3 Etnofarmacología de *Sechium edule*

Sechium edule es una planta originaria de México; es cultivada en huertos en climas templados a cálidos de los 500 a los 1000 msnm y crece de forma natural cerca de ríos y arroyos ^{78,79}; pertenece a la familia Cucurbitaceae, la cual contiene especies que son reconocidos tradicionalmente por tener propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antioxidantes. Como en el caso de *Benincasa hispida* (calabaza blanca) ⁸¹, o para el tratamiento de la diabetes e HTA con *Cucumis sativus* ⁸².

S. edule es conocida en México como “Chayote” y ha sido cultivada tradicionalmente en estados como Veracruz, Puebla, Oaxaca y Chiapas ⁸³, para el consumo del fruto, hojas y partes tuberosas de la raíz a las que se le atribuyen propiedades medicinales para el tratamiento de enfermedades renales y del tracto urinario, como cálculos renales o de vejiga, varices, uretritis, arterioesclerosis, dolor de cabeza e HTA ^{78,79} así como cicatrizante ⁸⁴.

2.4 Farmacología de *Sechium edule*

Sechium edule es una planta perteneciente a la familia Cucurbitaceae; la cual comprende especies que poseen propiedades anti-diuréticas, anti-hipertensivas, anti-cancerígenas, anti-oxidantes y anti-microbianas ⁸⁵. *S. edule*, conocido en México como chayote, ha sido utilizado como tratamiento complementario para la aterosclerosis e hipertensión, así también como diurético y antiinflamatorio ⁷⁹. Dichas propiedades diuréticas de las hojas y semillas, así como las propiedades anti-oxidantes, anti-hipertensivas, antiinflamatorias y para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares de las hojas y fruto, han sido confirmadas por estudios farmacológicos ^{86, 87, 88}.

Por otro lado, cuando se realizaron fraccionamientos fitoquímicos de la planta, se reportó que el fruto, hojas y la raíz contienen diversas cantidades de polifenoles ^{89, 90}. sugiriendo que estos compuestos contribuyan a las propiedades reportadas. Entre esos compuestos se pueden mencionar a la apigenina, luteína y camferol, los cuales tienen efectos vasorrelajantes. Los dos primeros por su posible efecto en la activación de canales de potasio inducidos por Ca^{2+} y/o sensibles a ATP, mientras que la apigenina y el camferol, inducen a la eNOS por lo que incrementa la producción del óxido nítrico vasorrelajante ⁹¹. También se han reportado efectos antioxidantes del extracto etanólico del fruto inhibiendo la generación de O_2 , debido a su capacidad para inhibir a la xantina oxidasa ⁹².

Por otro lado, Lombardo ⁹⁰ reportó que el extracto hidroalcohólico de la raíz de *S. edule* así como también las fracciones metanólicas y acetónicas presentaron efectos antagónicos del AT1R en modelos *in vitro* e *in vivo*, por lo que tienen propiedades antihipertensivas. También en un modelo de competencia, el cual consistió en administrar el extracto al mismo tiempo que se administraba AGII, se mostró que el extracto metanólico evitó el incremento de IL-1 β , IL-6, IFN γ y TNF- α en riñón ⁹⁰.

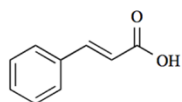
Se ha demostrado que los extractos acuosos e hidroalcohólicos de partes aéreas y semillas de *S. edule* tienen actividad vasodilatadora y en especial el extracto etanólico de las partes aéreas es el que presenta mayor actividad vasodilatadora en comparación con los otros extractos ⁹³. También la raíz de *S. edule* presenta flavonoides con uniones C-glucosídicas y O-glucosídicas ⁸⁹ los cuales tienen propiedades antihipertensivas ⁹⁰.

La fitoquímica del *S. edule* ha sido poco estudiada, sin embargo, se han encontrado algunos metabolitos secundarios, como son compuestos polifenólicos (flavonoides) y saponinas. Se han identificado al menos ocho flavonoides en las raíces, hojas, tallos y frutos de *S. edule*, de los cuales tres son flavonas C-glucosídicas y cinco son O-glucosídicas, detectadas y caracterizadas por resonancia magnética nuclear. Las agliconas están representadas por los complejos de apigenina y luteolina, mientras las unidades de azúcares son glucosa, apiosa y ramnosa. La cantidad total más alta de flavonoides se encuentra en el material seco de las hojas (35.0 mg/10 g), seguido por las raíces (30.5 mg/10 g), y finalmente por los tallos (19.3 mg/10 g) (89). También se han identificado saponinas en el fruto de *S. edule* entre las que destacan el Acetato de β -Sitosterol- β -D-Glucopiranosido y al Acetato Estigmasterol- β -D-Glucopiranosido ⁹⁴.

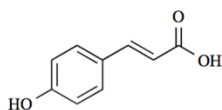
	Extracto o fracción	Moléculas asociadas	Referencia
Anti-inflamatorio	Etérea, clorofórmica y metanólica	Alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides y triterpenos	(94)
Antibiótico	Etanólico		(86)
Anti-ulcerante	Etanólico	Flavonoides	(95)
Anti-oxidante	Etanólico y acuoso	Flavonoides	(86)
Hipo-glicemiante	Etanólico		(96)
Anti-diabético	Etanólico		(97)
Anti-hipertensiva	Hidroalcohólico, metanólico y acetónico	Flavonoides	(90)

2.4.1. Compuestos Fenilpropanoides

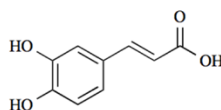
Los fenilpropanoides derivados de plantas comprenden el mayor grupo de metabolitos secundarios producidos por las plantas superiores, principalmente para su protección contra estrés biótico y abiótico como infecciones, lesiones, radiación UV, exposición al ozono, contaminantes y defensa contra herbívoros. Durante los últimos años se ha realizado investigación sobre el uso medicinal de fenilpropanoides naturales y producidos biotecnológicamente como antioxidantes, anticancerígenos, antivirales, agentes antiinflamatorios, cicatrizantes y antibacteriales.⁹⁸ Los fenilpropanoides son sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, el cual es convertido en ácido cinámico,⁹⁹ por lo que es un intermediario clave en las vías del ácido shikímico y la formación de fenilpropanoides, siendo un precursor de flavonoides y de lignina. Debido a su presencia común en plantas y a su baja toxicidad, el ácido cinámico y sus derivados, han sido evaluados como compuestos farmacológicos activos, mostrando una amplia gama de actividades biológicas siendo empleados en el desarrollo de nuevos tratamientos. Entre los derivados del ácido cinámico (1) más comunes se encuentran el ácido cumárico (2), caféico (3) y ferúlico (4)



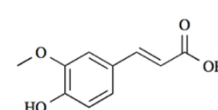
cinnamic acid (1)



p-coumaric acid (2)



caffeic acid (3)



ferulic acid (4)

2.4.1.1. Actividad biológica reportada en inflamación y cicatrización

Se ha reportado que los fenilpropanoides tienen la capacidad de inhibir la mayoría de las enzimas proinflamatorias como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la NADPH oxidasa, enzimas generadoras de eicosanoides como la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, así como las fosfolipasa A₂ que al ser inhibida previene la formación de los derivados del ácido araquidónico que son mediadores de la inflamación. Además la interacción de los fenilpropanoides con receptores como los receptores activados por proliferadores de

peroxisomas (PPARs) y receptores de estrógenos (ERs) resultando en la inhibición de la respuesta inflamatoria a través de la supresión de la transcripción génica inflamatoria ⁹⁸.

Se ha reportado que el ácido cinámico puede inhibir la expresión del factor tisular del endotelio vascular inducido por TNF- α bloqueando la activación de NF- κ B. La alta expresión de factor tisular (TF) por células endoteliales y monocitos ocasionada por sustancias como TNF- α pueden ser responsables de algunas enfermedades trombóticas. El ácido cinámico puede influenciar la expresión local de TF sugiriendo que el ácido cinámico tiene potencial aplicación en la prevención y tratamiento de la inflamación sistémica, además de actuar como agente anticoagulante *in vivo* ¹⁰⁰.

3. Planteamiento del problema

La alteración del proceso de cicatrización cutánea es un grave problema de salud pública. Se ha demostrado en un gran número de estudios que la obesidad afecta el proceso de cicatrización provocando la formación de heridas crónicas las cuales, en condiciones de obesidad y diabetes, son la principal causa de amputaciones de miembros ¹⁰¹. Cada año millones de pacientes sufren heridas, ya sea por quemaduras, intervenciones quirúrgicas o ruptura de tejidos por accidentes de diferente índole, que precisan de un tratamiento eficaz, rápido y seguro lo que hace que la cicatrización de heridas sea un desafío terapéutico. Un gran número de investigadores y comunidades médicas buscan mejorar el cuidado de las heridas con la intención de promover la cicatrización, pero el estudio de nuevos métodos, así como del uso de sustancias orgánicas e inorgánicas completamente efectivas aún permanece como un reto científico, debido a que la cicatrización es un proceso complejo que incluye múltiples eventos resultantes de la interrelación de diferentes estructuras celulares. Este proceso inicia con una respuesta del sistema inmune cuya finalidad es impedir que las heridas tengan complicaciones, posteriormente el proceso inflamatorio, proliferación celular y la reepitelización del tejido conducen al cierre de la herida ¹⁰².

En medicina tradicional, se han utilizado diferentes extractos de plantas como una fuente económica y altamente disponible para el tratamiento de heridas agudas y crónicas, por lo que es de interés estudiarlas y confirmar su actividad biológica. De manera que podamos

obtener alternativas terapéuticas como fitomedicamentos que incidan en el origen multifactorial de las alteraciones del proceso de cicatrización.

La Ley General de Salud de 1998 define a los fitomedicamentos como un extracto vegetal conformado por una mezcla de compuestos que pueden modificar la evolución y las complicaciones de una enfermedad, por lo tanto, son una alternativa real, para el control integral de las complicaciones de la obesidad. En México, plantas del género *Sechium* tienen antecedentes de uso empírico en medicina tradicional, y en el ámbito internacional, hay trabajos en los que se reportan las bondades de plantas de la familia Cucurbitaceae y del género *Sechium* para el control en forma aislada de la inflamación, del estrés oxidativo, de la hiperglicemia, diabetes, dislipidemia y de la hipertensión.

Por otro lado, se ha demostrado que algunos polifenoles del grupo de los flavonoides obtenidos de semillas de la uva son capaces de controlar fenómenos inflamatorios a través de la inducción de células T reguladoras⁵⁹.

Con base a lo expuesto anteriormente, en este trabajo se pretende evaluar la capacidad de *Sechium edule* para controlar la inflamación y las patologías asociadas en un modelo de obesidad, identificar extractos en los que subyacen estas capacidades, y evaluar si su papel anti-inflamatorio se establece a través de la generación de un ambiente inmunorregulador, favoreciendo y coadyuvando al proceso de cicatrización. Por lo que surge la pregunta de investigación del presente trabajo; ¿La aplicación tópica del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule* tienen capacidad antiinflamatoria y cicatrizante en ratones con obesidad y resistencia a la insulina?

4. Hipótesis

La aplicación tópica del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de raíz de *Sechium edule* controla la inflamación y favorecen la cicatrización de heridas en ratones con obesidad y resistencia a la insulina.

5. Objetivo general

Evaluar la capacidad antiinflamatoria y cicatrizante del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule* , aplicados de manera tópica en ratón.

6. Objetivos particulares

-Identificar los compuestos mayoritarios presentes en el extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule*

-Evaluar el efecto de la aplicación tópica del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule* sobre el edema en un modelo de inflamación auricular murino.

-Evaluar el efecto de la aplicación tópica del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule* sobre el tránsito celular en un modelo de inflamación auricular murino.

-Evaluar el efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule* aplicados de manera tópica en ratón.

-Evaluar el efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule* aplicados de manera tópica en ratones con obesidad y resistencia a la insulina.

7. Metodología

7.1 Obtención del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule*.

Para la obtención de los extractos, las raíces de *S. edule* fueron colectadas en la comunidad de Tuxpanguillo, Veracruz, posteriormente se secaron en un cuarto oscuro a temperatura ambiente.

En un contenedor de 20 litros se colocó la planta seca y triturada, se le agregó 6 veces su

peso de alcohol al 60%, al que el 40 % correspondiente de agua se agregó a una temperatura de 55 °C. Se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Se filtró con gasa para separar la parte fibrosa de la fase líquida. Del volumen total obtenido de la fase líquida se separó la quinta parte para hacer la bipartición con acetato de etilo y agua. El restante fue deshidratado primero con un rotavapor (Rotavapor® R-220 SE), y posteriormente se liofilizó hasta obtener solo un polvo.

A partir del extracto hidroalcohólico se generó una separación en dos partes mediante un proceso de extracción líquido-líquido también llamado bipartición. Para esto, el extracto libre de etanol se disueltó en agua (10 mL de agua por cada gramo de extracto) y posteriormente se agregó el mismo volumen de acetato de etilo. Todo esto se realizó en un embudo de separación y se agitó para que los compuestos orgánicos se desplazaran al disolvente orgánico (acetato de etilo). Una vez que se formaron las dos fases en el embudo, por medio de la llave de paso se separaron los dos líquidos y se concentraron a sequedad por destilación a presión reducida. Una vez que se tuvieron las fracciones secas, se procedió a realizar la evaluación.

7.1.1 Análisis cromatográfico del extracto y las fracciones acuosa y acetato de etilo de la raíz de *Sechium edule*.

El análisis cromatográfico fue realizado mediante HPLC utilizando un módulo de separación Waters 2695 equipado con un detector de arreglo de fotodiodos software Empower Pro. (Waters Corporation, USA). La separación química se logró utilizando una columna Supelcosil LC-F (4.6mm x250 mm I.D. 5 µm) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA)

7.2 Formulación del Gel

Para la administración de las diferentes concentraciones de los extractos a evaluar se formuló un gel utilizando Carbopol 940 en una concentración del 15%.

7.3 Animales de experimentación

7.3.1 Modelo murino de inflamación auricular inducido por TPA

Dado que este proyecto consta de dos etapas, en la primera se evaluó la capacidad

antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo en el modelo de inflamación auricular murino inducido por TPA, para lo cual, se utilizaron ratones machos de la cepa ICR de 8 a 10 semanas de edad, que se mantuvieron en condiciones de esterilidad y temperatura en el Bioterio de la Facultad de Medicina, con un ciclo 12 – 12 h de luz / oscuridad, con alimento y agua *ad libitum* y con una temperatura de 22 °C. El cuadro 1 muestra el número de animales que se utilizaron por grupo.

Para poder evaluar la capacidad del efecto antiinflamatorio de *S. edule* en el modelo murino de inflamación auricular inducido por TPA, los ratones se anestesiaron a profundidad quirúrgica con Pentobarbital sódico [150 microlitos en 1 mL].

Se aplicó tópicamente el 13 acetato - 12-O-tetradecanoilforbol (2.5 µl de TPA disuelto en 20 µl de acetona), sobre la oreja izquierda y 20 µl de gel en la oreja derecha. Se aplicaron 10 µl en superficie interna y 10 µl en la externa de la oreja en su región central. Después de 15 min de la aplicación, se administró el extracto o Dexametasona (0.2 mg por oreja), utilizando este último como referencia antiinflamatoria o control positivo (+). Los tratamientos del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato etilo de raíz de *Sechium edule* se administraron con diferentes concentraciones 145, 167, 192, 221 y 254 µg/oreja izq. La oreja derecha de cada ratón se consideró como control negativo, a la cual solo se le aplicó el gel vehículo para la dilución de los extractos.

Tabla 1.- Grupos experimentales para la evaluación de la capacidad antiinflamatoria del extracto RSe-HA y de las fracciones RSe-AQ y RSe-AE en modelo murino de inflamación auricular.

Grupos N=4	Oreja derecha Gel carbopol 940	Oreja izquierda TPA (2.5µg/oreja)	Oreja izquierda TPA (2.5 µg/oreja) + dexametasona	Exp 1 Oreja Izquierda TPA (2.5µg/oreja)+ RSe-HA.	Exp 2 Oreja Izquierda RSe-AQ.+ TPA (2.5µg/oreja + RSe-AQ	Exp 3 Oreja Izquierda RSe-AE.+ TPA (2.5µg/oreja) +RSe-AE
<i>Naive</i>	No	No	no	no	no	No
TPA	Si	Si	no	no	no	No
TPA / dexametasona	Si	No	si	no	no	No
Extracto o fracción 145 µg	Si	No	no	si	si	Si
Extracto o fracción 167 µg	Si	No	no	si	si	Si
Extracto o fracción 192 µg	Si	No	no	si	si	Si
Extracto o fracción 221 µg	Si	No	no	si	si	Si
Extracto o fracción 254 µg	Si	No	no	si	si	Si

Cada grupo fue constituido por 4 ratones. En la oreja derecha (control) se aplicó el gel

carbopol con excepción del grupo *naive* que no recibió ningún tratamiento, en la oreja izquierda se aplicó el TPA y a los 15 minutos el tratamiento farmacológico o experimental. TPA (Sigma - Aldrich, St Louis, MO, México). Dexametasona (Sigma - Ardrich).

7.3.1.1 Valoración de edema

Seis horas después de la aplicación del TPA y los extractos los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂. De la parte central de las orejas de cada ratón, se tomó con un sacabocado una muestra de 6 mm de diámetro, la cual será pesada en una balanza analítica con la intención de que a través del peso se valorara el edema. El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{I_c - I_t}{I_c} \times 100$$

7.3.1.2 Cuantificación de células sanguíneas

Para conocer un poco más el estado de los ratones con inflamación auricular por TPA, una vez que anestesiados se les tomaron 4 muestras sanguíneas a diferentes tiempos a través de vena caudal de la cola, donde se realizó una pequeña incisión con ayuda de un bisturí. Antes de aplicar el TPA se tomó una gota de sangre que fue colocada en un portaobjetos esmerilado de 26 mm x 76 mm, con un grosor de 0,4 mm.

previamente identificado y se procedió a realizar un frotis. Este procedimiento se realizó en 4 tiempo, es decir: 1 frotis basal (0 horas) y los siguientes 3 frotis se realizaron cada 2 horas post TPA (2, 4 y 6 horas), los frotis fueron teñidos por la tinción de Wright y se contó el 100% de las células visualizándolas con aceite de inmersión en un microscopio óptico en el objetivo de 100 X.

7.3.2 Modelo murino de cicatrización

Posteriormente se evaluó la capacidad cicatrizante del extracto y fracciones de *S.edule*, para lo cual se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J de 7 semanas de edad a los que se les mantuvo en las condiciones ya mencionadas. El número de animales y grupos experimentales se describen en la tabla 2.

Tabla 2.- Grupos experimentales para la evaluación de la capacidad cicatrizante de *S.edule* en modelo murino de cicatrización.

Grupos DE 4 RATONES	Herida por escisión
Control NAIVE	--
Tratamiento Farmacológico	Recuperón
Se-HA	Concentración Efectiva
Se-AQ	
Se-AE	

El manejo de los animales de laboratorio se realizó con estricto apego a la NOM vigente (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Los procedimientos experimentales realizados en este proyecto de investigación fueron sometidos ante el Comité para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la UAEM.

7.3.2.1 Herida por escisión

Los ratones fueron anestesiados individualmente con Isoflurano por vía inhalatoria, se

rasuró el pelo de la espalda, se esterilizó con benzal y posteriormente se realizó una escisión en la piel. Las heridas se marcaron con un sacabocado de 0.4 cm y la escisión se realizó con tijeras Iris.

7.3.2.1.1 Aplicación de los tratamientos

Inmediatamente después de la realización de las heridas, se aplicó la primera dosis del gel con la concentración de extracto o fracción correspondiente, y las siguientes se aplicaron cada 24 horas hasta que la herida cerró completamente. Las concentraciones del extracto y sus fracciones fueron de 221 µg

7.3.2.1.2 Cinética de cicatrización

La evaluación del procedimiento se realizó a través de una cinética comparando el tamaño de las escisiones expuestas a los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo experimental. Para lo cual, se tomaron fotografías cada tercer día a la misma hora con una cámara DSLR canon 7D montada en trípode a una distancia focal de 135mm y evaluadas con el programa Metamorph 6.1. Con estos datos se calculó el % de eficiencia en la cicatrización con la fórmula:

$$\% \text{ cicatrización} = \frac{A_i - A_t}{A_i} \times 100$$

Siendo:

A_i = Area inicial

A_t = área de la herida que recibió el tratamiento experimental

7.3.3 Inducción de resistencia a la insulina por obesidad

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL6J de 4 semanas de edad que se alimentaron con una dieta hipercalórica (HarlanTD.06414 Adjusted Calories Diet (60/Fat) de manera crónica. Las calorías de esta dieta están distribuidas de la manera siguiente: 60% corresponden a grasa (de las cuales 37% son saturadas, 47% monosaturadas y 16% poliinsaturadas, 18.4% a proteína y el 21.3% a carbohidratos).

Los ratones se clasificaron como se muestra en la siguiente Tabla, de acuerdo a la dieta y el tratamiento que se utilizó.

Tabla 3. Grupos experimentales

Grupo	Semanas	Cantidad de ratones por grupo	Dieta	Tratamiento
1	15	10	Hipercalórica	RSe-HA 221µg
2	15	10	Hipercalórica	Recoveron
3	15	10	Hipercalórica	Sin tratamiento

Luego de 15 semanas se realizó una evaluación de los valores de cada ratón con respecto a sus valores iniciales.

7.3.3.1 Medición del peso y longitud naso-anal

Los ratones fueron pesados en una balanza digital y medidos desde la punta de la nariz al ano (LNA) al inicio del protocolo (semana 0) y a la semana 15.

7.3.3.2 Determinación del índice de Lee

Con los valores obtenidos de las mediciones de peso y LNA se calculó el índice de Lee de obesidad que es proporcional al índice de masa corporal en humanos, usando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de obesidad de Lee} = (\text{peso (g)} \times 0.33) / (\text{longitud naso-anal (cm)})^2$$

Esto se calculó a las 0 y 15 semanas

7.3.3.3 Determinación sérica de glucosa y glucosa postprandial

Para la determinación sérica de glucosa, se mantuvo a los ratones con un ayuno previo de 12 horas y se tomó una muestra de sangre periférica de la punta de la cola, teniendo así la medición basal. Posteriormente se administró oralmente una solución de glucosa a 2 g/Kg de peso del ratón. La glucosa en sangre fue medida a los 120 min. Las determinaciones se realizaron con un glucómetro de marca Accu-chek Performance de Roche. Esto se realizó al inicio del experimento y a las 15 semanas.

8. Pruebas estadísticas

El área relativa de cada herida fue comparada utilizando la prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnett. Los valores obtenidos que presentaron una P menor a 0.05, fueron considerados como significativos.

9. Resultados

9.1. El extracto RSe-HA y las fracciones RSe-AQ Y RSe-AE presentan compuestos fenólicos, principalmente ácido cinámico, cumárico y ferúlico

EL análisis por HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia) realizado al extracto Hidroalcohólico y a las fracciones Acuosa y Acetato de etilo permitió identificar por medio de sus espectros UV algunos de los tipos de moléculas que las conforman. En la Figura 1 en el panel A se presenta el cromatograma del extracto extracto RSe-HA, en el cual se lograron identificar ácido ferúlico y cinámico en el tiempo de retención 10.20 y 12.49 min respectivamente, así como algunos espectros característicos de compuestos fenólicos. En el panel B se muestra el espectro de la fracción RSe-AE en donde se identificó ácido cumárico, ferúlico y cinámico en los tiempos de retención de 10.13, 10.78 y 12.35 respectivamente y algunos espectros característicos de flavonas y cumarato. Por último, en el panel C se muestra el cromatograma de la fracción RSe-AQ donde se identificó ácido cinámico en el tiempo de retención 12.55.

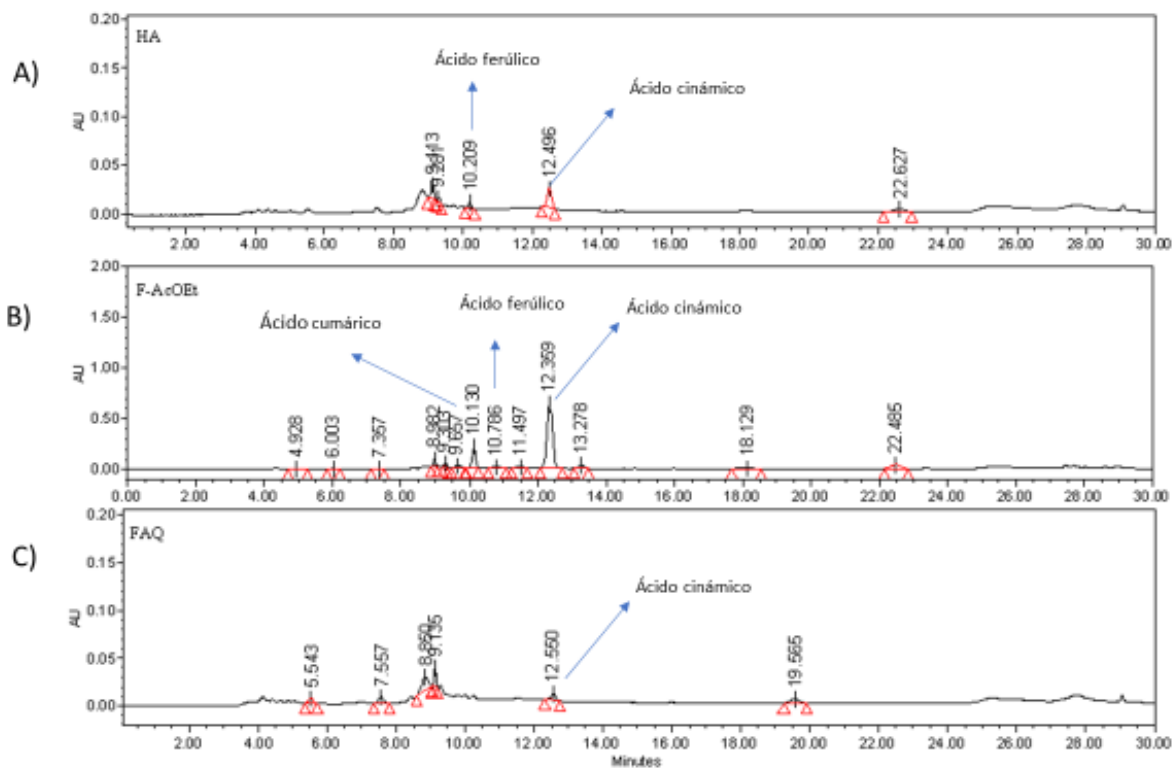


Figura 1 Análisis cromatográfico del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de raíz de *S. edule*. A) Análisis HPLC del extracto RSe-HA. B) Análisis HPLC de la fracción RSe-AE. C) Análisis HPLC de la fracción RSe-AQ.

9.2 Los diferentes tratamientos obtenidos de LA Raíz de *Sechium edule* controlan la inflamación inducida por TPA de manera tan eficiente como la dexametasona.

La inflamación juega un papel crítico tanto en el proceso cicatricial como en la calidad del mismo. con la intención de discriminar entre los tres tratamientos, así como determinar la concentración efectiva, se probaron en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA los 3 tratamientos experimentales a las concentraciones de 145, 167, 192, 221 y 254 µg comparándolos contra la dexametasona como control. en la Figura 2 se muestra que los 3 tratamientos fueron tan eficientes como la dexametasona para contrarrestar el efecto del TPA. En el panel A y C se observa que tanto el extracto RSe-HA como en la fracción RSe-AE respectivamente, las 5 concentraciones probadas tuvieron efecto antiinflamatorio estadísticamente similar a la dexametasona. Mientras que en la fracción RSe-AQ (Panel B) las concentraciones con el mejor efecto fueron 145, 167 y 221 µg. Del extracto y las fracciones se puede decir que 221 µg fue la dosis efectiva en todas ellas.

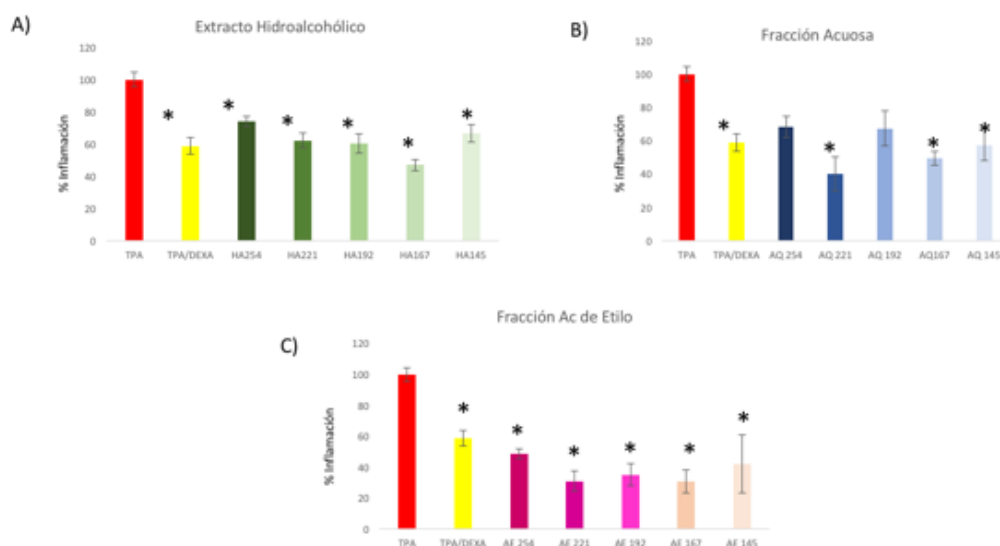


Figura 2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto RSe-HA y las fracciones RSe-AQ y RSe-AE a las concentraciones de 145, 167, 192, 221 y 254 µg/or. Modelo de inflamación auricular murino inducido por TPA con dexametasona como control positivo. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) $n=8$ por grupo

9.3 Los diferentes tratamientos en dosis de 221 µg/or obtenidos de La Raíz de *Sechium edule* regulan el tránsito de las diferentes poblaciones celulares inducidas por la inflamación por TPA

Durante los procesos inflamatorios, hay comunicación entre el lugar de la inflamación y la médula ósea a través de factores de crecimiento, así como quimiocinas que dirigen a las células de neoformación hacia el lugar de la inflamación. Una manera de analizar la actividad antiinflamatoria de los tratamientos experimentales, es a través de las proporciones de las células circulantes durante el tiempo experimental (6 horas). Los resultados de los conteos celulares realizados cada 2 horas, indicaron que como era de esperarse, los neutrófilos aumentaron de manera importante mientras que los linfocitos disminuyen (Figura 3A).

En esta cinética se puede observar que desde las 2 horas todos los grupos aumentaron el porcentaje de estas células, tanto los experimentales a dosis de 221 µg/oreja (RSe-HA 50%, el RSE-AQ 53% y RSe-AE 39%) como los controles (blanco 63%, TPA 74%, Dexametasona 65%). Esto refleja, en el caso del grupo blanco, el efecto del corte mismo de la cola desde el tiempo cero y que se repitió cada dos horas durante el experimento para obtener la muestra, lo cual se sumó, al del TPA en los demás grupos. Desde las 2 horas se observó el efecto regulador del tránsito celular inducido por los tratamientos experimentales, ya que el aumento de estas células fue solo entre el 39% y el 53% (RSe-AE y RSe-AQ respectivamente) siendo menores que el propio blanco (63%) y la dexametasona (65%).

A las 4 horas el TPA mantiene significativamente ($P > 0.05$) el porcentaje más alto de neutrófilos (72%) mientras que entre el blanco (55%), la dexametasona (63%) y las fracciones RSe-FAQ (65%) y RSe-FAE (54%) no presentan diferencias estadísticas. Por

otro lado el grupo tratado con el extracto RSe-HA (40%) fue el que presentó significativamente ($P>0.05$) el menor porcentaje de células en este tiempo.

En la medición final a las 6 horas, el TPA mantiene el porcentaje mayor de neutrófilos (78%) a diferencia del grupo blanco (48%) el cual no presenta diferencias significativas con el tratado con el extracto RSE-HA (52%) mientras que los grupos tratados con las fracciones RSe-FAQ (65%) y RSe-FAE (61%) dexa (68%) se comportaron de manera estadísticamente similar a la dexametasona, lo que parece indicar que a pesar de lograr un comportamiento similar al grupo blanco en las primeras dos horas, solo retrasan el tránsito de las células que al final aumentan al mismo nivel que el del tratamiento farmacológico.

Los datos fueron linealizados y se calculó la tasa de crecimiento mediante las ecuaciones de la recta, se observó que los grupos experimentales mantuvieron una tasa de crecimiento menor que el grupo blanco, el tratamiento farmacológico y el grupo tratado con TPA. (Figura 3B)

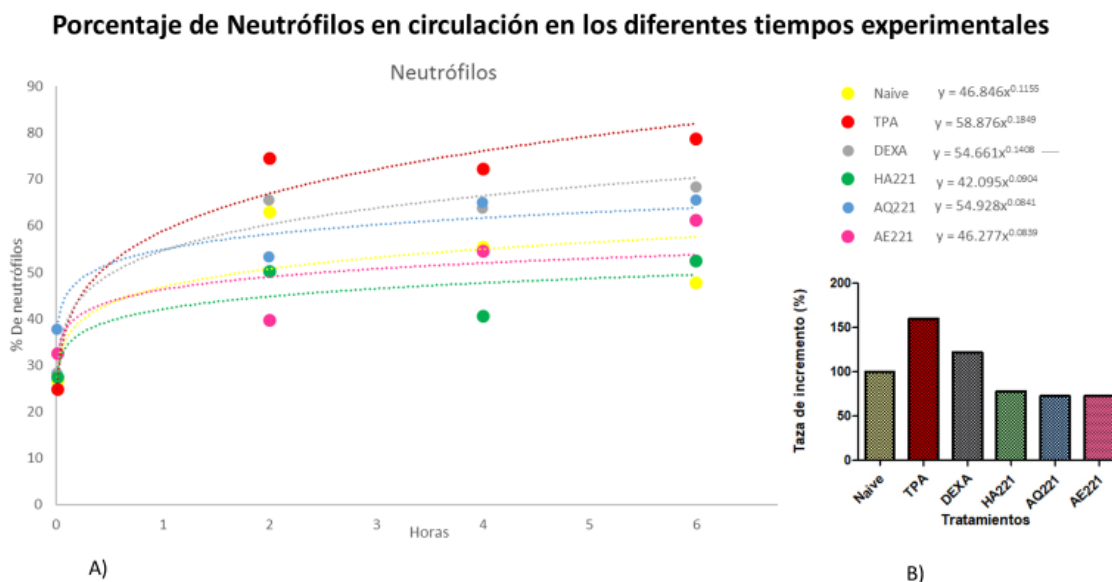


Figura 3. Neutrófilos en circulación en los diferentes tiempos experimentales. A) Porcentaje de células sanguíneas a las 0, 2, 4 y 6 horas experimentales en los diferentes tratamientos farmacológico (Dexametasona), experimentales (RSe-HA, RSe-FAQ Y RSe-FAE 221 μ g) y grupo naive. **B)** Tasa de crecimiento de neutrófilos

En la Figura 4 se observa el porcentaje de neutrófilos que están en tránsito a las 6 horas. La aplicación tópica del TPA indujo un incremento significativo ($P < 0.05$) del 31% con respecto al grupo naive, y a su vez el grupo naive no presentó diferencias significativas con los grupos RSe-Ha y RSe-FAE lo que nos indica que estos tratamientos experimentales pueden influir en el porcentaje de células en tránsito llevándolas al nivel de los ratones naive a pesar de la presencia de TPA. Estos resultados indican que la capacidad antiinflamatoria del extracto RSe-Ha y RSe-FAE no solo se limitan al control del edema, sino que también influyen en el reclutamiento celular, lo que se puede ver a través de la concentración de neutrófilos en tránsito, siendo que estas células son las primeras que responden ante estímulos inflamatorios como el que induce el TPA.

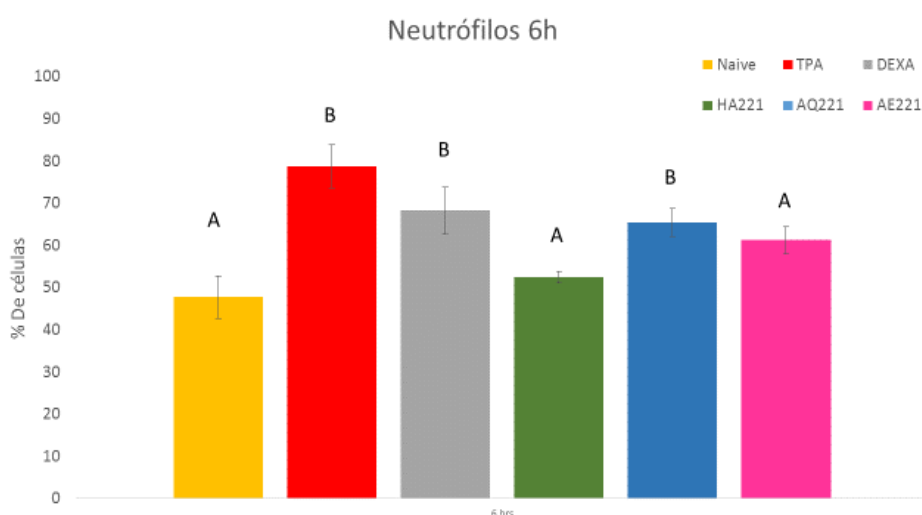


Fig. 4. Porcentaje de células sanguíneas a las 6 horas experimentales en los diferentes tratamientos farmacológico(Dexametasona), experimentales (RSe-HA, RSe-FAQ Y RSe-FAE 221 μ g) y grupo naive. $P > 0.05$

Las proporciones entre ambas células se muestran en la Tabla 4, en donde se observa que el tratamiento con TPA indujo 4.18 neutrófilos por cada linfocito, a diferencia del grupo blanco que tenía 1 neutrófilos por linfocito, valor más bajo que el inducido por la dexametasona (2.1). Por otro lado, de los tratamientos experimentales, las fracciones RSe-

FAQ y RSe-FAE 221 μg presentaron proporciones de 1.92 y 1.58 respectivamente, valores que están entre los del grupo de la dexametasona. Por otro lado, las dosis del extracto RSe-HA 221 μg disminuyó aún más la proporción entre estas células, siendo de 1.11, valor estadísticamente similar al grupo *Naive*.

Tabla 4. Proporción de neutrófilos/ linfocitos a diferentes tiempos.

Tratamientos	0 horas	2 horas	4 horas	6 horas
<i>Naive</i>	0.36678201	1.7027	1.27586	0.93170732
TPA	0.33445946	2.92157	2.75238	4.18421053
Dexametasona	0.39929329	1.89855	1.77083	2.1496063
HA 221	0.38888889	1.01515	0.68067	1.11111111
AQ 221	0.60887097	1.17033	1.88406	1.92647059
AE 221	0.48507463	0.65975	1.21111	1.58064516

9.4. El extracto RSe-HA en la concentración de 221 μg acelera el proceso cicatricial de heridas por escisión comparado con los controles

Una vez determinada tanto la capacidad antiinflamatoria como las dosis de los diferentes tratamientos, se procedió a evaluar la capacidad cicatrizante de los mismos en heridas por escisión.

De acuerdo a los resultados anteriores, la dosis de 221 μg fue una de las más eficientes para contrarrestar la inflamación, por lo cual, esta fue a la que se le evaluó su capacidad cicatricial. En la Figura 5 (Panel A-Ñ) se muestran las imágenes del proceso cicatricial en los días 0, 6 y 15, así como la cinética del porcentaje de cicatrización de las heridas (Panel O).

En el panel A), D), G), J) Y M) se muestra la herida inicial de cada condición, se presentaron diferencias significativas en el día 3 en el tratamiento RSe-HA donde la herida tratada lleva un 33% de avance, a diferencia del grupo sin tratamiento que presenta un 0.5%

de avance y el grupo con tratamiento farmacológico que muestra un 6% (Panel O). En el panel B), E), H), K) Y N) se observa la herida en el día 6 donde se puede observar que la herida tratada con RSe-HA (Panel H) tiene un porcentaje de cicatrización del 68%, con respecto al área de la herida inicial, mientras que el control sin tratamiento tiene un porcentaje de 34% y el de tratamiento farmacológico tiene un porcentaje de 44%, lo que se relaciona con los valores graficados en el panel O donde se representa la cinética del cierre de la herida inducido por el RSe-HA en comparación con los demás tratamientos, donde el avance en el cierre de la herida fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que el de los demás tratamientos.

En el panel P se muestra el tiempo que tomó cada uno de los tratamientos para alcanzar el 50% del cierre de la herida en donde podemos observar que tanto el extracto RSe-HA como el tratamiento farmacológico recoveron llevaron la herida al 50% de cierre un 39% y 24% más rápido en comparación con el grupo sin tratamiento.

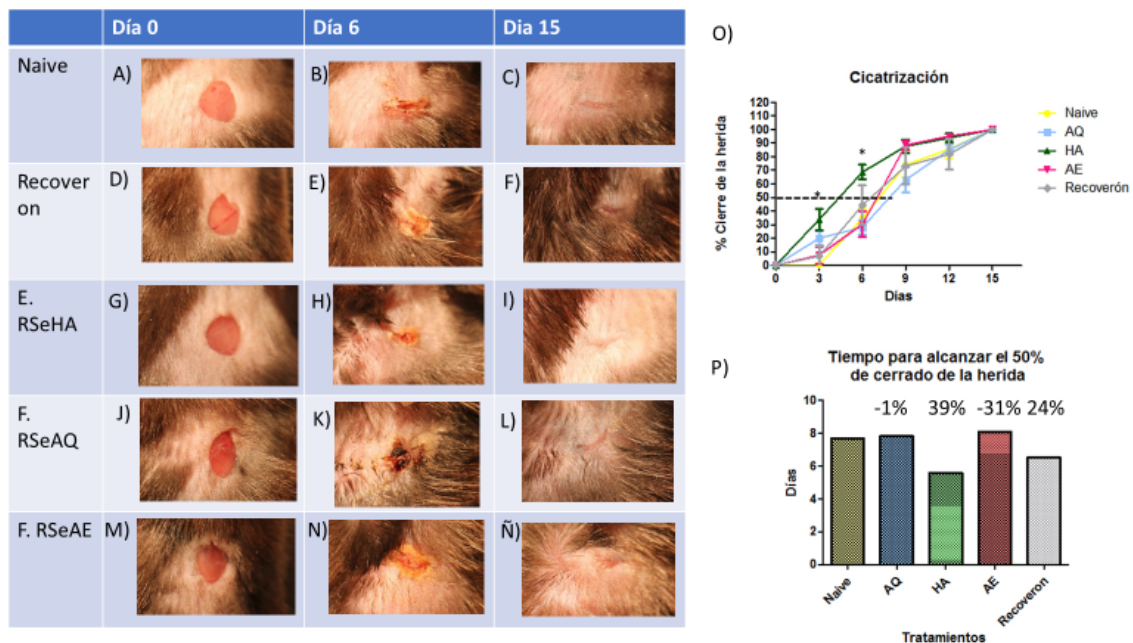


Figura 5. Cinética de cicatrización. O) Porcentaje de cicatrización con respecto a la herida inicial en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 en el modelo de Escisión. Se encontraron diferencias significativas en el día 3 y 6 entre el extracto Hidroalcohólico con respecto del grupo Naive y el tratamiento farmacológico con una $P < 0.05$. **P) Tiempo para alcanzar el 50% de cierre de la herida**

Se realizó una curva de decaimiento (Figura 6A) para determinar la velocidad de cicatrización general para cada uno de los tratamientos los datos fueron linealizados y se calculó la tasa de decaimiento mediante las ecuaciones de la recta en donde al igual que en los resultados anteriores tanto el extracto RSe-HA como el tratamiento farmacológico recoveron mostraron mayor velocidad siendo 45% y 51% más rápidos en el proceso de cicatrización respectivamente (Figura 6B).

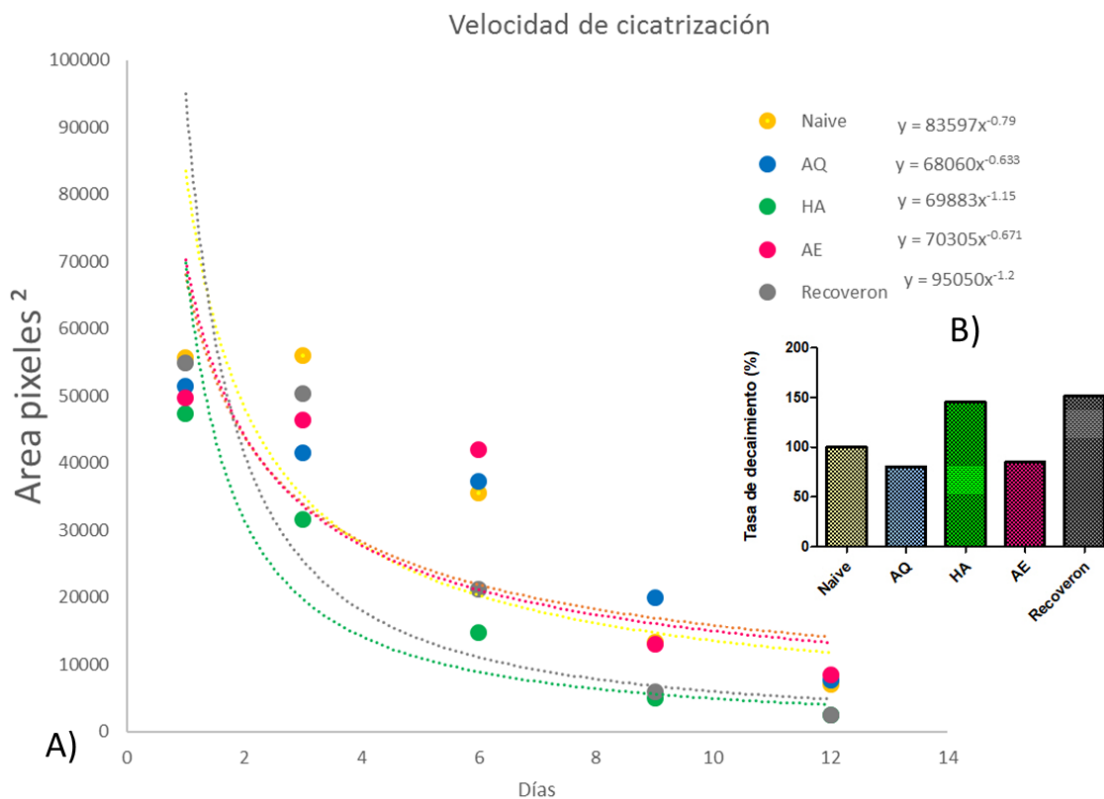


Figura 6. Calculo de velocidad de cicatrización. A) Velocidad de cicatrización. Las heridas fueron tratadas con el extracto Hidroalcohólico y las fracciones acuosa y acetato de etilo de raíz de *S.edule* como tratamiento experimental y con el tratamiento farmacológico recoverón como control positivo. **B) Tasa de decaimiento**

9.5 El extracto RSe-HA acelera el proceso cicatricial de herida por escisión en ratones con obesidad y resistencia a la insulina.

La capacidad cicatricial extracto hidroalcohólico de raíz de *S. edule* fue evaluado mediante heridas realizadas por escisión en ratones que fueron alimentados con una dieta hipercalórica (HarlanTD.06414 Adjusted Calories Diet (60/Fat) de manera crónica por 15

semanas comparado con ratones que fueron alimentados con una dieta isocalórica.

Antes de iniciar la administración de la dieta, las condiciones metabólicas fueron evaluadas para corroborar que se trataba de ratones sanos, 15 semanas después de la administración de la dieta se evaluó nuevamente el índice de Lee y se observó un aumento significativo del 15% ($P < 0.005$) en el grupo con dieta hipercalórica en comparación a la semana 0 (Figura 7). Y se evaluó la glucosa postprandial observándose diferencias significativas ($P < 0.005$) en los ratones sometidos a la dieta hipercalórica en la semana 15 (Panel C), los cuales no pudieron regresar a las condiciones de la medida inicial de glucosa (Figura 8).

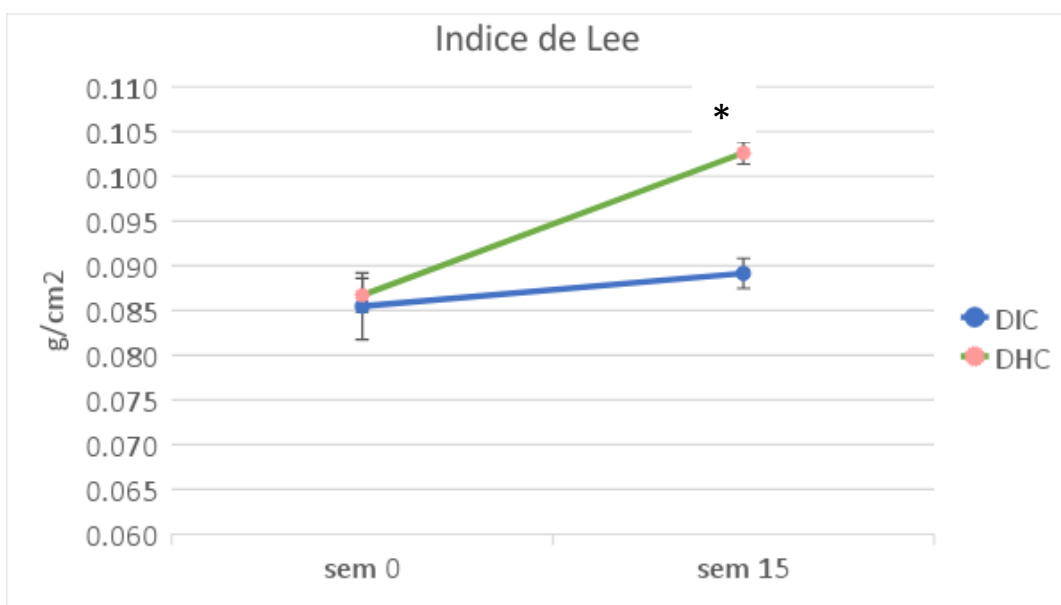


Figura 7. Calculo de Indice de Lee. Los parámetros para calcularlo se midieron en la semana 0 y 15 en ratones sometidos a dieta hipercalórica (DHC) y dieta isocalórica (DIC).

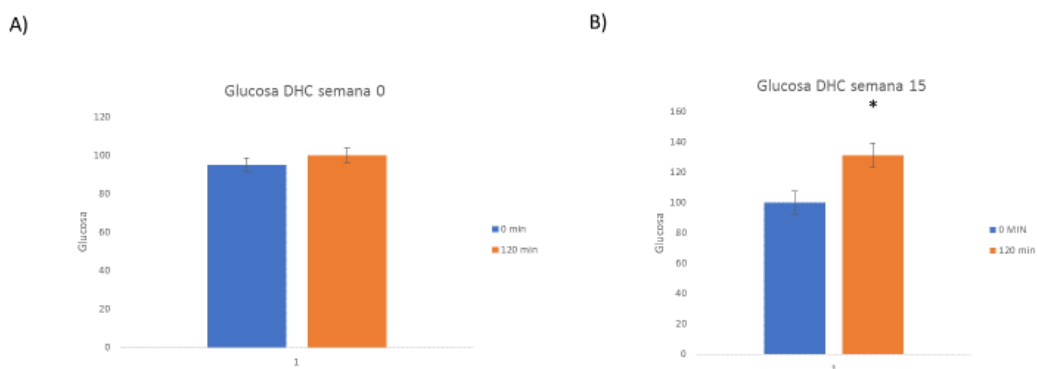


Figura 8. Medición de glucosa postprandial. Se realizaron mediciones en la semana 0 y en la semana 15 de la dieta hipercalórica (panel A y B)

En la Figura 9 (Panel A-L) se muestran las imágenes del proceso cicatricial en los días 0, 3, 6 y 15, así como la cinética del porcentaje de cicatrización de las heridas (Panel M).

En los grupos con dieta hipercalórica que fueron tratados con el extracto Hidroalcohólico se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día 3 con un porcentaje de cicatrización del 31% y en el día 6 con un porcentaje de cicatrización del 59% mientras que las heridas tratadas con el tratamiento farmacológico Recoverón no habían disminuido sino que aumentaron un 10% en el día 3 que posteriormente se redujo a un 10% de avance en el día 6 con respecto al tamaño de la herida inicial por la inflamación como se muestra en la Fig. 9 panel M.

En el panel N se muestra el tiempo que tomó cada uno de los tratamientos para alcanzar el 50% del cierre de la herida en donde podemos observar que tanto el extracto RSe-HA como el tratamiento farmacológico recoverón llevaron la herida al 50% de cierre un 61% y 12% respectivamente más rápido en comparación con el grupo sin tratamiento.

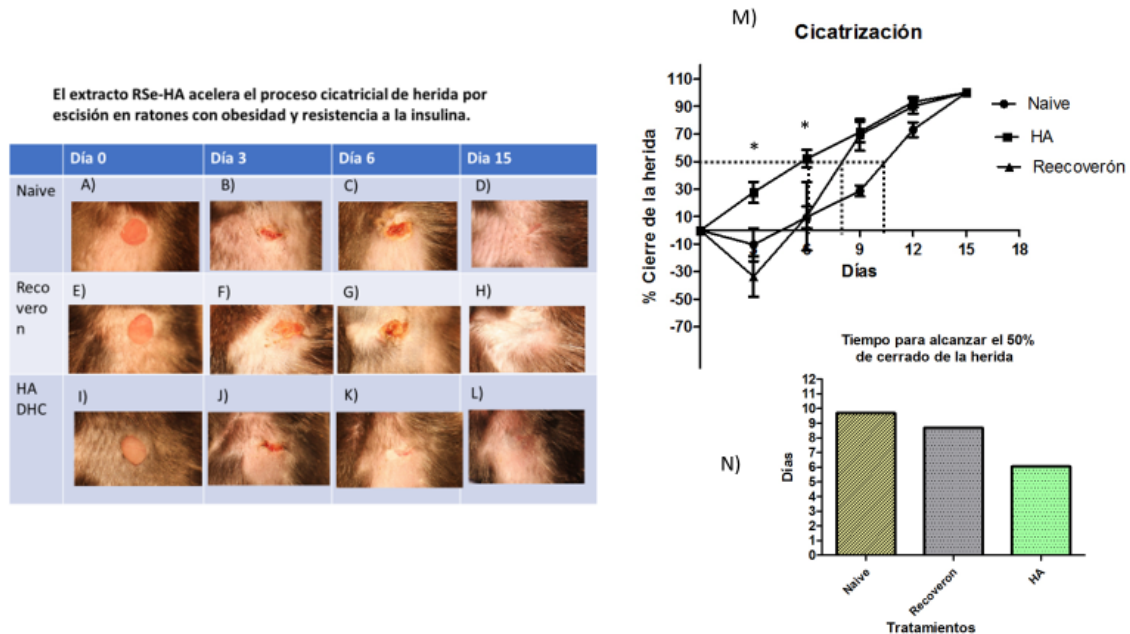


Figura 9. Cinética de cicatrización. Porcentaje de cicatrización con respecto a la herida inicial en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 en el modelo de Escisión. Se encontraron diferencias significativas en los días 3 y 6 entre el extracto Hidroalcohólico con respecto al tratamiento farmacológico con una $P < 0.05$.

Se realizó una curva de decaimiento (Fig. 10A) para determinar la velocidad de cicatrización general para cada uno de los tratamientos los datos fueron linealizados y se calculó la tasa de decaimiento mediante las ecuaciones de la recta en donde al igual que en los resultados anteriores tanto el extracto RSe-HA como el tratamiento farmacológico recoveron mostraron mayor velocidad siendo 111% y 186% más rápidos en el proceso de cicatrización respectivamente (Fig. 10B).

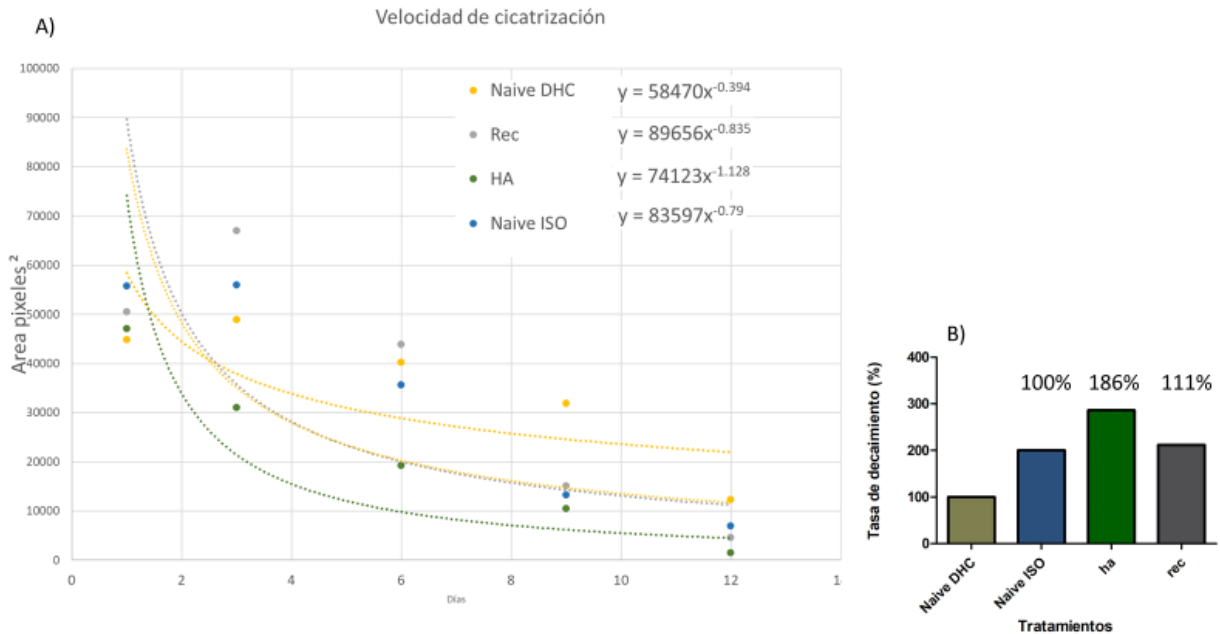


Fig 10. A) Velocidad de cicatrización. Las heridas fueron tratadas con el extracto Hidroalcohólico y con el tratamiento farmacológico recoverón como control positivo.

B)Tasa de decaimiento

10. Discusión

En la medicina tradicional mexicana se ha reportado que *Sechium edule* puede actuar como antiinflamatorio, lo cual ha sido reportado en la investigación experimental. En este trabajo de investigación se realizó un estudio biodirigido partiendo del extracto Hidroalcohólico de *S. edule* con el fin de encontrar el tipo de moléculas responsables de su capacidad antiinflamatoria mediante el modelo de inflamación auricular inducido por TPA, modelo que está estrechamente relacionado con la infiltración de células como: neutrófilos y macrófagos, así como la inducción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β y la generación de ROS ¹⁰³. Esta generación de agentes inflamatorios se da debido a la estimulación de la vía del ácido araquidónico, el cual es oxidado por la ciclooxigenasa-2 y la lipooxigenasa, las cuales desencadenarán la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, desencadenando respuestas inflamatorias que conllevan una vasoconstricción, vasodilatación, agregación plaquetaria entre otros eventos ¹⁰⁴. Para evaluar el efecto de los tratamientos experimentales en el modelo de TPA se consideró el

edema y el tránsito celular.

Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos experimentales del extracto RSe-HA y de las fracciones RSe-AQ y RSe-AE disminuyeron significativamente el edema inducido por la aplicación tópica del TPA, siendo la concentración de 221 μg la dosis efectiva en todas ellas presentando un comportamiento estadísticamente similar a la dexametasona (Figura 2)

El análisis fitoquímico indicó la presencia de ácido cumárico, cinámico y otros compuestos fenólicos en el extracto RSe-HA, así como ácido ferúlico, cinámico y cumarico, en la fracción RSe-AE y ácido cinámico en la fracción RSe-AQ. De acuerdo con la bibliografía, se ha reportado que estos tres compuestos actúan como agentes antiinflamatorios sobre la vía de la lipooxigenasa desacoplando el sitio catalítico de la enzima y se ha propuesto entre los posibles mecanismos de acción antiinflamatoria de los fenilpropanoides su inhibición en la síntesis de prostaglandinas y del metabolismo del ácido araquidónico^{105, 99, 106}. Por lo que se estaría evitando la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas y la extravasación de neutrófilos.

En procesos inflamatorios, los neutrófilos son las primeras células que son reclutadas al sitio de daño. Por lo tanto, cuantificar las proporciones de las células sanguíneas durante un proceso inflamatorio, permite conocer la respuesta celular al proceso. A lo largo del experimento, los neutrófilos incrementaron su porcentaje principalmente en el grupo tratado con TPA (Figura 3) llegando a ser 4.1 veces más neutrófilos que linfocitos a las 6 horas (tabla 4). En el modelo de TPA las prostaglandinas son las principales responsables del aumento de los neutrófilos¹⁰⁷ lo que fue disminuido por el tratamiento farmacológico y por los tratamientos experimentales especialmente el extracto RSe-HA, esto puede deberse a la presencia de fenilpropanoides cuyo efecto sobre la COX2 y el metabolismo del ácido araquidónico inhibe la neoformación de neutrófilos, llevando la proporción de estas poblaciones celulares al nivel del control sin tratamiento.

Durante la cicatrización, el proceso inflamatorio es una etapa crítica y de gran importancia para el correcto restablecimiento del tejido, sin embargo, un exceso en la actividad inflamatoria puede tener efectos contraproducentes. Durante la inflamación se genera una gran infiltración de neutrófilos que son responsables de liberación de grandes cantidades de

enzimas como la colagenasa (MMP8) que es responsable de la destrucción de la matriz del tejido conectivo y de la elastasa, la cual es capaz de destruir algunos importantes factores cicatriciales como PDGF y TGF- β ^{108, 109}.

Aunado a esto, las heridas crónicas generan un ambiente que contiene un exceso de especies reactivas de oxígeno que dañan aún más las células y los tejidos cicatriciales¹¹⁰.

En la práctica médica, para el tratamiento de heridas crónicas, suele utilizarse una combinación de medicamentos con actividades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes. En trabajos previos se demostró la capacidad de *S. edule* para controlar condiciones en las que la inflamación juega un papel crítico, como la disfunción endotelial en la que las condiciones pro-oxidantes y pro-inflamatorias, fueron satisfactoriamente controladas⁹⁰ (Castro y Trejo, 2014 en espera de publicación).

En el presente estudio, se evaluó la capacidad inflamatoria y cicatrizante del extracto RSe-HA y de las fracciones RSe-AQ y RSe-AE, observándose que los tres tratamientos tuvieron actividad antiinflamatoria en el modelo murino de inflamación auricular inducido por TPA, siendo tan efectivas como el tratamiento farmacológico dexametasona. En los ensayos de cicatrización, el extracto RSe-HA 221 μ g presentó una mejora significativa en la cicatrización en ratones sanos

En ratones obesos el proceso cicatricial se da de manera deficiente, en condiciones normales las EPCs son movilizadas por la activación de la eNOS en la médula ósea, un proceso que se ve afectado en condiciones de resistencia a la insulina, evitando que las células puedan alcanzar adecuadamente el sitio de la herida⁶¹. Además la expresión de SDF-1 α está disminuida en las células epiteliales en heridas de diabéticos, lo que también evita la llegada de las EPCs a la herida, limitando por lo tanto la cicatrización⁶⁰, también se ha reportado que durante el proceso de cicatrización en organismos de edad avanzada y con obesidad, la respuesta inflamatoria se encuentra alterada, dándose una disminución en la síntesis de colágeno¹¹¹.

De acuerdo a los resultados obtenidos la reparación de la herida fue más eficiente en el grupo experimental tratado con el extracto rSe-HA, grupo en el cual el proceso de cicatrización fue incluso más efectivo que en el grupo de ratones con dieta isocalórica, sin

obesidad ni resistencia a la insulina (Figura 9).

El ácido cinámico es un ácido orgánico que se encuentra de manera natural en muchas plantas, tiene baja toxicidad y un amplio espectro de actividades biológicas.

El ácido cinámico y sus derivados, como el ácido cumárico y el ferúlico, son conocidos por su capacidad antioxidante, gracias a sus fuertes propiedades secuestradoras de radicales libres. Los ácidos hidroxicinámicos especialmente tienen gran capacidad antioxidante debido al hidroxilo del grupo fenilo ¹¹².

De igual forma los tres compuestos presentan actividad antibacterial, siendo el ácido ferúlico el que presenta la mayor actividad y al igual que el ácido cumárico, tiene además tiene actividad fungicida ¹¹³.

El efecto antiinflamatorio del ácido cinámico ha sido reportado y se ha visto que los ácidos hidroxicinámicos son inhibidores de la activación de NF- κ B ¹¹⁴. La activación del factor del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-KB) está asociado con la inflamación, el aumento en la proliferación celular y apoptosis. Por lo que la inhibición de NF- κ B generalmente es una estrategia en el tratamiento de la inflamación ¹¹⁵.

Los resultados obtenidos hasta ahora, demuestran la capacidad tópica antiinflamatoria del extracto RSe-HA y de las fracciones RSe-AQ y RSe-AE, así como la capacidad cicatrizante en el extracto RSe-HA, lo que puede deberse a la presencia de compuesto fenólicos de tipo fenilpropanoides con capacidad, antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana.

11. Conclusión.

La aplicación tópica del extracto rSe-HA y las Fracciones rSe-AQ y rSe-AE controló el edema y reguló el tránsito celular en el modelo de inflamación auricular inducido por TPA y aceleraron el cierre de la herida en el modelo de herida por escisión en ratones sanos y en ratones obesos con resistencia a la insulina

12. Referencias Bibliográficas

1. Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-776.
2. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2010). *Janeway's immunobiology* (7th ed.). New York: Garland Science
3. Abbas, N., Zou, L. P., Pelidou, S. H., Winblad, B., & Jiezh, Z. (2000). Protective effect of Rolipram in experimental autoimmune neuritis: protection is associated with down-regulation of IFN- γ and inflammatory chemokines as well as up-regulation of IL-4 in peripheral nervous system. *Autoimmunity*, 32(2), 93-99.
4. Brunton Laurence L., Lazo John S., Parker Keith L. (2007) "Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica". Undécima Edición. McGraw Hill.
5. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. y Kuby, J. (2006). *Inmunología*. 6ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México.
6. Majno, G., & Joris, I. (2004). *Cells, tissues, and disease: principles of general pathology*. Oxford University Press.
7. Kumar, V., Cotran, R. S. & Robbins, S. L. 2003. *Robbins Basic Pathology*. Saunders
8. Lawrence WT. Wound healing biology and its application to wound management. In: O'Leary JP, Capota LR, editors. *Physiologic basis of surgery*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1996. p. 118–35.
9. Lewis T., Grant R.T. (1924) Vascular reactions of the skin to injury. The liberation of an histamine-like substance in injured skin, the underlying cause of factitious urticaria and of wheals produced by burning and observations upon the venous control of certain skin reactions
10. Hebda, P. A., Collins, M. A., & Tharp, M. D. (1993). Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatologic clinics*, 11(4), 685-696.
11. Fernández-Real, J. M., & Ricart, W. (1999). Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia*, 42(11), 1367-1374.
12. Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454:

428–35.

13. Serhan C. Ward P. A, Gilroy D.W. Fundamentals of inflammation, Cambridge U. Press. 2010
14. Christopher, M. J., & Link, D. C. (2007). Regulation of neutrophil homeostasis. *Current opinion in hematology*
15. Starckx, S., Van den Steen, P. E., Wuyts, A., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (2002). Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. *Leukemia & lymphoma*, 43(2), 233-241.
16. Zhang, Y., Ramos, B. F., & Jakschik, B. A. (1992). Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*, 258(5090), 1957-1959.
17. Rao, T. S., Currie, J. L., Shaffer, A. F., & Isakson, P. C. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, 17(6), 723-741.
18. Stanley, P. L., Steiner, S., Havens, M., & Tramposch, K. M. (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology and Physiology*, 4(4), 262-271.
19. Young, J. M., Wagner, B. M., & Spires, D. A. (1983). Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acid-induced ear edema. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(1), 48-52.
20. Puigneró, V., & Queralt, J. (1997). Effect of topically applied cyclosporin A on arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation in mouse ear. *Inflammation*, 21(3), 357-369.
21. Wang, H. Q., Kim, M. P., Tiano, H. F., Langenbach, R., & Smart, R. C. (2001). Protein kinase C- α coordinately regulates cytosolic phospholipase A2 activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. *Molecular Pharmacology*, 59(4), 860-866.
22. Kast, R., Fürstenberger, G., & Marks, F. (1993). Phorbol ester TPA-and bradykinin-induced arachidonic acid release from keratinocytes is catalyzed by a cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *Journal of investigative dermatology*, 101(4), 567-572.
23. Scholz, K., Fürstenberger, G., Müller-Decker, K., & Marks, F. (1995). Differential

expression of prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes in vivo and in vitro. *Biochemical Journal*, 309(Pt 1), 263.

24. Sánchez, T., & Moreno, J. J. (1999). Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 57(2-3), 119-131.

25. Werz, O., Klemm, J., Samuelsson, B., & Rådmark, O. (2001). Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 97(8), 2487-2495.

26. Murakawa, M., Yamaoka, K., Tanaka, Y., & Fukuda, Y. (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochemical pharmacology*, 71(9), 1331-1336.

27. Fürstenberger, G., Csuk-Glänzer, B. I., Marks, F., & Keppler, D. (1994). Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 15(12), 2823-2827.

28. Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.

29. Young, A., & McNaught, C. E. (2011). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 29(10), 475-479

30. Minutti, C. M., Knipper, J. A., Allen, J. E., & Zaiss, D. M. (2017, January). Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 61, pp. 3-11). Academic Press.

31. Baum, C. L., & Arpey, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic surgery*, 31(6), 674-686.

32. Khalil RA, van Breemen C. Mechanisms of calcium mobilization and homeostasis in vascular smooth muscle and their relevance to hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Raven Press; New York: 1995. pp. 523-40

33. Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R., & Meh, D. A. (2001). The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936(1), 11-30.

34. Blombäck, B., Hessel, B., Hogg, D., & Therkildsen, L. (1978). A two-step fibrinogen–fibrin transition in blood coagulation. *Nature*, 275(5680), 501.
35. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007 Mar
36. Ofosu, F. A., & Nyarko, K. A. (2000). Human platelet thrombin receptors: Roles in platelet activation. *Hematology/Oncology Clinics*, 14(5), 1185-1198.
37. Monaco, J. L., & Lawrence, W. T. (2003). Acute wound healing: an overview. *Clinics in plastic surgery*, 30(1), 1-12.
38. Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), 835-870
39. Szpaderska, A. M., Zuckerman, J. D., & DiPietro, L. A. (2003). Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *Journal of dental research*, 82(8), 621-626.
40. Barton, G. M. A (2008)calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.*
41. Hübner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fässler, R., & Werner, S. (1996). Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*, 8(7), 548-556.
42. Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746.
43. Wright, S. D., & Meyer, B. C. (1985). Fibronectin receptor of human macrophages recognizes the sequence Arg-Gly-Asp-Ser. *Journal of Experimental Medicine*, 162(2), 762-767.
44. Brown, EJ (1995). Phagocytosis. *BioEssays* 17, 109-117
45. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., ... & Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *cell*, 88(2), 277-285.
46. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002 Dec 19;420: 846e52.
47. Van Zuijlen, P. P., Angeles, A. P., Kreis, R. W., Bos, K. E., and Middelkoop, E., Scar assessment tools: implications for current research, *Plast Reconstr Surg*, 109, 1108 (2002)

48. Chen CCH., Schilling LS., Lyder CH.. A concept analysis of malnutrition in the elderly. *J Adv Nurs*2001;36:131–142 [[PubMed](#)]
49. Morales G. 2010. Obesidad un enfoque multidisciplinario. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de ciencias de la salud, Área Académica de Medicina. 978-607-482-117-8. Pag. 146-153.
50. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 11(2):85-97.
51. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444: 860–7.
52. Monteiro R. 2009. Chronic Inflammation in the Metabolic Syndrome: Emphasis on Adipose Tissue. In *Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome*. Edited by Raquel Soares and Carla Costa. First edition. 65-84.
53. Laclaustra M, Corella D and Ordovas JM. 2007. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 17: 125–39.
54. Parhofer KG and Barrett PH. 2006. Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res.* 47:1620–30.
55. Romanski SA, Nelson RM and Jensen MD. 2000; Meal fatty acid uptake in adipose tissue: gender effects in nonobese humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279: E455–62.
56. Sethi JK and Vidal-Puig AJ. 2007. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 48: 1253–62.
57. Otranto, M., Nascimento, A. P. D., & Monte-Alto-Costa, A. (2013). Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice. *Wound Repair and Regeneration*, 21(3), 464-472.
58. Grimble, R. F. (1992). Dietary manipulation of the inflammatory response. *Proceedings of the Nutrition Society*, 51(2), 285-294.
59. Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.
60. Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1219-1222.
61. Gallagher, K. A., Liu, Z. J., Xiao, M., Chen, H., Goldstein, L. J., Buerk, D. G., ... &

- Velazquez, O. C. (2007). Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α . *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1249-1259.
62. Wilson, J. A., & Clark, J. J. (2004). Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Advances in skin & wound care*, 17(8), 426-432.
63. Anaya, D. A., & Dellinger, E. P. (2006). The obese surgical patient: a susceptible host for infection. *Surgical infections*, 7(5), 473-480.
64. Greco JA, 3rd, Castaldo ET, Nanney LB, Wendel JJ, Summitt JB, Kelly KJ, et al. (2008). The effect of weight loss surgery and body mass index on wound complications after abdominal contouring operations. *Ann Plast Surg* 61:235-24
65. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. (2005). Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:547-566
66. Calabro P, Yeh ET. (2007). Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem* 42:63-91
67. Charles D, Williams K, 3rd Perry LC, Fisher J, Rees RS. An improved method of in vivo wound disruption and measurement. *J Surg Res* 1992;52:214-8.
68. Frank S, Kampfer H. Excisional wound healing: an experimental approach. In: DiPietro LA, Burns AL, editors. *Wound healing: methods and protocols*, vol. 78. Totowa: Humana Press, 2003:3-16.
69. Oluwasanmi J, Chvapil M. A comparative study of four materials in local burn care in rabbit model. *J Trauma* 1976;16: 348-53.
70. Holm-Pedersen P, Zederfeldt B. Granulation tissue formation in subcutaneously implanted cellulose sponges in young and old rats. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1971;5:13-6.
71. Greenhalgh DG, Warden GD. Wound care models. In: Souba WW, Wilmore DW, editors. *Surgical research*. London: Academic Press, 2001:379-91.
72. R. M. Porter, "Mouse models for human hair loss disorders," *Journal of Anatomy*, vol. 202, no. 1, pp. 125-131, 2003.
73. L. Azzi, M. El-Alfy, C. Martel, and F. Labrie, "Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 124, no. 1, pp. 22-27, 2005.

74. Norman, G., Dumville, J. C., Mohapatra, D. P., & Crosbie, E. J. (2015). Antibiotics and antiseptics for surgical wounds healing by secondary intention. *The Cochrane Library*.
75. Andrades, Sepúlveda, S., & González, J. (2004). Curación avanzada de heridas. *Rev Chil Cir*, 56(4), 396-403.
76. Chah, K. F., Eze, C. A., Emuelosi, C. E., & Esimone, C. O. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1), 164-167.
77. Aung, L. H., Ball, A., & Kushad, M. (1990). Developmental and nutritional aspects of chayote (*Sechium edule*, Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44(2), 157-164.
78. Argueta Villamar, A., Cano Asseleih, L. M., & Rodarte, M. L. (1994). Atlas de las plantas de las medicina tradicional Mexicana. *Mexico: Instituto Nacional Indigenista 1786p. ISBN, 1093031427, 9682973244-9682973252*.
79. Lira, R. (1996). Chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*, 8.
80. Vaughan, J. G., & Geissler, C. A. (1997). *The new Oxford book of food plants*. Oxford university press.
81. Huang, H. Y., Huang, J. J., Tso, T. K., Tsai, Y. C., & Chang, C. K. (2004). Antioxidant and angiotension-converting enzyme inhibition capacities of various parts of *Benincasa hispida* (wax gourd). *Nahrung/Food*, 48(3), 230-233.
82. Mukherjee, P. K., Nema, N. K., Maity, N., & Sarkar, B. K. (2013). Phytochemical and therapeutic potential of cucumber. *Fitoterapia*, 84, 227-236.
83. Pipitone, U. (2006). *Oaxaca prehispánica*. Centro de Investigación y Docencia Económicas.
84. Restrepo, M., Quintero P., Julio., N (2015) El milagro de las plantas. Aplicaciones medicinales y orofaríngeas
85. Rahman, A. H. (2003). Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*)-a vegetable for good health. *Natural product radiance*, 2(5), 249-250.
86. Ordonez, A. A. L., Gomez, J. D., & Vattuone, M. A. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*, 97(3), 452-458.
87. Hayashi, A., Nakayama, T., Aoyagi, Y., & Kimoto, K. (2005). Purification of nicotianamine from hayatouri (*Sechium edule*) and estimation of quantitative determination

method. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)*.

88. Gordon, E. A., Guppy, L. J., & Nelson, M. (2000). The antihypertensive effects of the Jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *The west indian medical journal*, 49(1), 27-31.
89. Siciliano T, De Tommasi N, Morelli I, Braca A. Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(21):6510-5.
90. Lombardo E. G. Comparación fitoquímica entre raíces de *Sechium edule* con actividad antihipertensiva cultivadas en campo y raíces propagadas en hidroponía. México. Tesis de maestría Ciencias en desarrollo de productos bióticos. IPN. 2008.
91. Olszanecki, R., Gebaska, A., Kozlovski, V. I., & Gryglewski, R. J. (2002). Key words: flavonoids, nitric oxide synthase, macrophages. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 53(4), 571-584.
92. Jiwajinda, S., Santisopasri, V., Murakami, A., Kawanaka, M., Kawanaka, H., Gasquet, M., ... & Ohigashi, H. (2002). In vitro anti-tumor promoting and anti-parasitic activities of the quassinoids from *Eurycoma longifolia*, a medicinal plant in Southeast Asia. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1), 55-58.
93. Lozoya, M. (1980). Medicina tradicional. *México, DF: CEESTEMIMPEPLAM*, 3(10), 67.
94. Salama, A. M., Polo, A. E., Contreras, C. R., & Maldonado, L. (1986). Analisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades anti-inflamatoria y cardiaca de los frutos de *Sechium edule*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 15(1), 79-82.
95. Sateesh, G., Hussaini, S. F., Kumar, G. S., & Rao, B. S. S. (2012). Anti-Ulcer Activity of *Sechium Edule* Ethanolic Fruit Extract. *The Pharma Innovation*, 1(5).
96. Maity, S., Firdous, S. M., & Debnath, R. (2013). Evaluation of antidiabetic activity of ethanolic extract of *Sechium edule* fruits in alloxan-induced diabetic rats. *World J Pharm Pharm Sci*, 2(5), 3612-3621.
97. Simpson, R., & Morris, G. A. (2014). The anti-diabetic potential of polysaccharides extracted from members of the cucurbit family: A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3(2), 106-114.

98. Korkina, L., Kostyuk, V., De Luca, C., & Pastore, S. (2011). Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *11*(10), 823-835.
99. de Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N., dos Reis Barreto de Oliveira, R., & de Sousa, D. P. (2014). A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, *19*(2), 1459-1480.
100. Li, X., Wen, Z., He, X., & He, S. (2006). Effects of cinnamic acid on expression of tissue factor induced by TNF α in endothelial cells and its mechanisms. *Journal of the Chinese Medical Association*, *69*(5), 207-212.
101. Pence, B. D., & Woods, J. A. (2014). Exercise, Obesity, and Cutaneous Wound Healing: Evidence from Rodent and Human Studies. *Advances in Wound Care*, *3*(1), 71–79.
102. Jurjus, A., Atiyeh, B. S., Abdallah, I. M., Jurjus, R. A., Hayek, S. N., Jaoude, M. A., ... & Tohme, R. A. (2007). Pharmacological modulation of wound healing in experimental burns. *Burns*, *33*(7), 892-907.
103. Kim, K. R., Jeong, C. K., Park, K. K., Choi, J. H., Park, J. H. Y., Lim, S. S., & Chung, W. Y. (2010). Anti-inflammatory effects of licorice and roasted licorice extracts on TPA-induced acute inflammation and collagen-induced arthritis in mice. *BioMed Research International*, 2010.
104. Handa, O., Yoshida, N., Fujita, N., Tanaka, Y., Ueda, M., Takagi, T., ... & Yoshikawa, T. (2006). Molecular mechanisms involved in anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors. *Inflammation Research*, *55*(11), 476-480.
105. Hadjipavlou-Litina, D., & Pontiki, E. (2015). Aryl-acetic and cinnamic acids as lipoxygenase inhibitors with antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activity. *Advanced Protocols in Oxidative Stress III*, 361-377.
106. Godoy, M. E., Rotelli, A., Pelzer, L., & Tonn, C. E. (2000). Antiinflammatory activity of cinnamic acid esters. *Molecules*, *5*(3), 547-548.
107. Fernández, M. A., Heras, B., Garcia, M. D., Sáenz, M. T., & Villar, A. (2001). New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *53*(11), 1533-1539.
108. Yager, D. R., Zhang, L. Y., Liang, H. X., Diegelmann, R. F., & Cohen, I. K. (1996).

Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(5), 743-748.

109. Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9(1), 283-289.

110. Wenk, J., Sabiwalsky, A., Dissemond, J., Meewes, C., Brenneisen, P., Wlaschek, M., ... & Meyer-Ingold, W. (2001). Selective pick-up of increased iron by deferoxamine-coupled cellulose abrogates the iron-driven induction of matrix-degrading metalloproteinase 1 and lipid peroxidation in human dermal fibroblasts in vitro: a new dressing concept. *Journal of investigative dermatology*, 116(6), 833-839.

111. Yamaguchi, Y., & Yoshikawa, K. (2001). Cutaneous wound healing: an update. *The Journal of dermatology*, 28(10), 521-534.

112. Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362-372.

113. Barber, M. S., McConnell, V. S., & DeCaux, B. S. (2000). Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways. *Phytochemistry*, 54(1), 53-56.

114. Nagasaka, R., Chotimarkorn, C., Shafiqul, I. M., Hori, M., Ozaki, H., & Ushio, H. (2007). Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2), 615-619.

115. Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *cell*, 109(2), S81-S96.