



Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

EFFECTOS DEL *Aloe vera* EN COMBINACIÓN CON EL ACEITE ESENCIAL
DE *Melaleuca alternifolia* EN EL TRATAMIENTO LOCAL DE HERIDAS
CRÓNICAS CUTÁNEAS Y MUSCULARES EN MODELOS DIABÉTICOS.

TESIS QUE PRESENTA:

I.B.T. LIZBETH GONZÁLEZ PALOMARES

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL

DIRECTORES DE TESIS:

D.C ROCÍO DEL CARMEN MONTOYA PÉREZ.

D.C RAFAEL SALGADO GARCIGLÍA.

Morelia, Michoacán, agosto de 2022.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Diabetes mellitus.....	5
1.1.1 Clasificación etiológica de la Diabetes mellitus	7
1.1.2 Complicaciones de la diabetes mellitus	8
1.1.3 Factores inflamatorios e inmunológicos presentes en las complicaciones diabéticas. 26	
1.1.4 Fatiga muscular.....	27
1.1.5 Estrés oxidante	29
1.1.6 Tratamientos alternativos.	31
1.2 <i>Aloe vera</i>	32
1.3 <i>Melaleuca alternifolia</i>	33
1.4 Aceites esenciales.....	34
1.4.1 Terpenos.....	35
2 JUSTIFICACIÓN	38
3 HIPÓTESIS	38
4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo general:.....	39
4.2 Objetivos particulares:.....	39
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1 Animales.....	40
5.2 Diseño experimental.....	40
5.3 Inducción de diabetes experimental	41
5.4 Determinación y monitoreo de diabetes crónica.....	41
5.5 Creación de herida.....	42
5.5.1 Procedimiento pre-quirúrgico	42
5.5.2 Procedimiento quirúrgico.....	42
5.5.3 Procedimiento post-quirúrgico.....	42
5.6 Tratamiento.....	43
5.6.1 Formulación de dosis	43
5.7 Manejo de la herida.....	44

5.8	Eutanasia.....	44
5.9	Análisis de cierre de la herida	45
5.10	Pruebas de tensión muscular y resistencia a la fatiga	45
5.11	Evaluación de estrés oxidante.....	47
5.11.1	Determinación de especies reactivas de oxígeno.....	47
5.11.2	Relación GSH/GSSG.....	48
5.12	Análisis estadístico.....	48
6	RESULTADOS.....	49
6.1	Efecto del gel <i>Aloe vera</i> adicionado con aceite esencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre la cinética de cierre de la herida	49
6.2	Efecto del gel de <i>A. vera</i> adicionado con aceite esencial de <i>M. alternifolia</i> sobre la tensión muscular y el tiempo a la fatiga.	52
6.3	Efecto del gel de <i>Aloe vera</i> adicionado con aceite esencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre los niveles de glutatión como marcador de estrés oxidante	54
7	DISCUSIÓN	57
8	CONCLUSIÓN.....	60
9	PERSPECTIVAS.....	61
10	REFERENCIAS.....	62

RESUMEN

Recientemente se ha demostrado que el estrés oxidante, generado por las interleucinas proinflamatorias propias de las heridas es coadyuvante en la fisiopatología de la *Diabetes mellitus*. La cicatrización de las heridas es un proceso biológico complejo donde el principal objetivo de la intervención clínica es la promoción de la restauración de los tejidos. Las heridas pueden ser clasificadas como agudas o crónicas. Algunos estudios en animales han indicado que el *Aloe vera* puede ayudar a la cicatrización de las heridas. Considerándose el uso de gel de *Aloe vera* adicionado con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* como tratamiento alternativo en las heridas diabéticas, dada la inhibición de microorganismos patógenos de amplio espectro y la capacidad regenerativa sobre las células epiteliales en un tiempo menor, disminuyendo notablemente el costo del tratamiento. En el presente trabajo de investigación se utilizó como modelo experimental ratas macho de la cepa Wistar, las cuales se dividieron en grupos diabéticos y grupos sanos y a su vez en grupos heridos y grupos sin herir. A cada rata a inducir la patología se le administró estreptozotocina a una dosis de 45 mg/kg preparada *in situ* en buffer de citratos 1.0 M por vía intraperitoneal. En presencia tópica del gel adicionado con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* en grupos diabéticos, la tensión se recupera en su totalidad con respecto a la tensión de los grupos diabéticos y diabéticos sin tratamiento. En el caso de los grupos diabéticos podemos observar un aumento estadísticamente significativo en la tensión total del grupo tratado con gel *Aloe vera* adicionado con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 4% y el grupo sano tratado con gel *Aloe vera* en comparación con los grupos diabéticos sin tratamiento. Se observaron y registraron las etapas en los procesos de cicatrización de heridas dentro de los diferentes grupos en los días 3, 6, 9, 12 y 15 del experimento.

Palabras clave: *Diabetes mellitus*, heridas diabéticas, estrés oxidante, *Aloe vera*, aceite esencial, *Melaleuca alternifolia*.

ABSTRACT

Recently it has been shown that oxidative stress, generated by the pro-inflammatory interleukins of wounds, is an adjunct in the pathophysiology of Diabetes mellitus. Wound healing is a complex biological process where the main objective of clinical intervention is the promotion of tissue restoration. Wounds can be classified as acute or chronic. Some animal studies have indicated that Aloe vera can aid wound healing. Considering the use of Aloe vera gel added with essential oil of *Melaleuca alternifolia* as an alternative treatment in diabetic wounds, given the inhibition of broad-spectrum pathogenic microorganisms and the regenerative capacity on epithelial cells in a shorter time, significantly reducing the cost of treatment. In the present research work, male rats of the Wistar strain were used as an experimental model, which were divided into diabetic groups and healthy groups and in turn into injured groups and non-injured groups. Each rat to induce the pathology was administered streptozotocin at a dose of 45 mg / k prepared in situ in 1.0 M citrate buffer by the intraperitoneal route. In the topical presence of the gel added with essential oil of *Melaleuca alternifolia* in diabetic groups, the tension is fully recovered with respect to the tension of the diabetic and diabetic groups without treatment. In the case of the diabetic groups, we can observe a statistically significant increase in the total tension of the group treated with Aloe vera gel added with essential oil of *Melaleuca alternifolia* at 4% and the healthy group treated with Aloe vera gel compared to the diabetic groups without treatment. The stages in the wound healing processes within the different groups were observed and recorded on days 3, 6, 9, 12 and 15 of the experiment.

Key words: Diabetes mellitus, diabetic wounds, oxidative stress, Aloe vera, essential oil, *Melaleuca alternifolia*.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una patología multifactorial crónico degenerativa que se desarrolla por la hiperglucemia en sangre. Uno de los principales factores que desarrollan esta enfermedad es el déficit de insulina o la resistencia a la misma, dada por un inadecuado funcionamiento en las células β de los islotes de Langerhans ubicados en el páncreas (ADA, 2008). A nivel mundial existen 422 millones de personas que presentan esta enfermedad (OMS, 2019); en México la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó al 2018 que la tasa de incidencia de morbilidad es del 10.3% en personas mayores de 20 años (ENSANUT, 2018) y solo en el Estado de Michoacán el programa sectorial de salud 2015-2021 reportó para el 2018, 3,956 defunciones en el año a causa de complicaciones propias de esta enfermedad (POSESAEM 2015-2021).

Así mismo, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó que en Michoacán el porcentaje de la población mayor de 20 años diagnosticada con esta enfermedad es del 9.9% (Fig. 1). La diabetes se puede diagnosticar según los niveles de glucosa plasmática, ya sea el valor de glucosa plasmática en ayunas (FPG) o el valor de glucosa plasmática postprandial de 2 h (PG de 2 h) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT por sus siglas en inglés), de 75 g o los criterios de hemoglobina glicosilada (HbA1C) (Tabla 1) (ADA, 2020).



Figura 1. Porcentaje de la población de 20 años y más con diagnóstico médico previo de diabetes, por entidad federativa 2018. (ENSANUT, 2018)

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para *diabetes mellitus*. (ADA, 2020).

Criterios de diagnóstico de diabetes mellitus	
FPG $\geq$ 126 mg/dl (7mmol/L)	El ayuno se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 h.
PG de 2h $\geq$ 200 mg/dl (11.1 mmol/L) durante la OGTT.	La prueba debe realizarse según lo descrito por la OMS, utilizando una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.
A1C $\geq$ 6,5% (48 mmol/mol).	La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método que esté certificado por NGSP y estandarizado para el ensayo DCCT.
$\geq$ 200 mg/dl (11,1 mmol/L)	En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucemia, una glucosa plasmática aleatoria

1.1.1 Clasificación etiológica de la Diabetes mellitus

Existen distintos factores que desencadenan la patología clasificándola en varios grupos, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) la clasifica en cuatro principales: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): resulta de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con una deficiencia de insulina propensa a cetoacidosis.

- Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): va desde la resistencia a la insulina por una deficiencia relativa propia de la insulina o bien un defecto secretor de la insulina.

- Diabetes mellitus gestacional (DMG): se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa, con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo.
- Otros tipos específicos: Se clasifican por su etiología específica, incluye una amplia variedad de condiciones poco comunes, principalmente formas genéticas específicas de diabetes asociada con otras enfermedades o bien la inducida por fármacos.

1.1.2 Complicaciones de la diabetes mellitus

Pueden ser microvasculares (lesiones de los vasos sanguíneos pequeños) y macrovasculares (lesiones de vasos sanguíneos más grandes). Las complicaciones microvasculares son lesiones oculares (retinopatía) que conllevan a la ceguera; lesiones renales (nefropatía) que desencadenan en insuficiencia renal; y lesiones de los nervios que ocasionan impotencia sexual y pie diabético (que a veces obliga a amputar como consecuencia de infecciones muy graves). Las complicaciones macrovasculares incluyen las enfermedades cardiovasculares, como los ataques cardíacos, los accidentes cerebrovasculares y la insuficiencia circulatoria en los miembros inferiores (OMS, 2020).

1.1.2.1 Neuropatía diabética

La neuropatía diabética está presente en el 40-50 % de los pacientes con diabetes después de 10 años del comienzo de la enfermedad, aunque menos del 50 % de estos pacientes presentan síntomas (Meltzer *et al.* 1998) (Fig. 2).

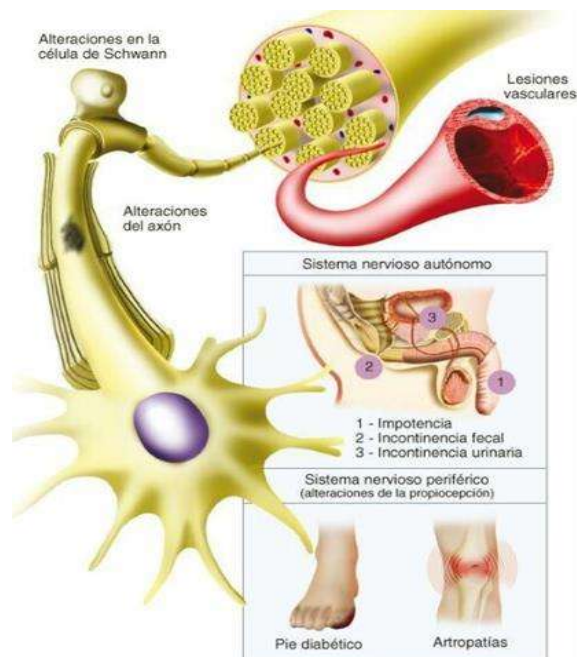


Figura 2. Neuropatía periférica, neurona hiperglucémica y sus complicaciones sistémicas (Alleman *et al.* 2015).

1.1.2.1.1 Etiología de la neuropatía diabética

La diabetes puede lesionar los nervios por distintos mecanismos, como el daño directo por la hiperglucemia y la disminución del flujo sanguíneo que llega a los nervios como resultado del daño de los pequeños vasos. La lesión de los nervios puede manifestarse por pérdida sensorial, lesiones de los miembros e impotencia sexual. Es la complicación más común de la diabetes (OMS, 2020). Sin embargo, no existe una clasificación unánimemente aceptada de neuropatía diabética según la presencia de síntomas y/o signos de disfunción nerviosa en personas con diabetes; ya que la existencia de cuadros mixtos y las diversas formas en que pueden estar presentes en un mismo paciente varían su diagnóstico.

La neuropatía diabética se divide en dos grandes grupos: (Mediavilla *et al.* 2001)

Neuropatía somática o sensorial Que a su vez se subdividen en:

– Polineuropatía sensitivo-motora simétrica distal, es la forma más frecuente presente en el paciente diabético. Afecta fundamentalmente a las extremidades inferiores, provocando síntomas sensoriales como hormigueos, hiperestesia, quemazón y dolor, o bien síntomas motores, como espasmos, fasciculaciones y calambres, u otros, como acorchamiento e insensibilidad térmica o al dolor (Mediavilla *et al.* 2001).

– Neuropatía aguda dolorosa, que suele ser de inicio agudo; aparece más frecuentemente en varones y afecta simétricamente a las porciones distales de las extremidades inferiores, sobre todo las plantas, se caracteriza por dolor agudo, quemante y acompañado de hiperestesias cutáneas (Mediavilla *et al.* 2001).

– Neuropatía motora proximal simétrica. Suele presentarse en mayores de 50 años caracterizándose por dolor seguido de debilidad muscular y amiotrofia de comienzo insidioso y carácter progresivo que afecta, sobre todo, a caderas y ambos muslos (Mediavilla *et al.* 2001).

Neuropatías focales y multifocales: suelen presentarse en mayores de 50 años con diabetes de larga evolución, caracterizándose por dolor de comienzo agudo o subagudo acompañado de otros síntomas en el territorio del nervio afectado, se dividen en:

– Mononeuropatías. Afectan a un solo nervio. La forma más frecuente es la afección del tercer par craneal que cursa con dolor periorbitario, paresia muscular y diplopía con conservación de la movilidad pupilar. También puede afectarse más raramente el VI, IV o VII pares craneales o algunos nervios de extremidades como perineal, mediano cubital.

– Neuropatía proximal asimétrica. Es de presentación poco frecuente y suele afectar a pacientes con diabetes mal controlada por períodos prolongados y, en general, mayores de 60 años. Su inicio es agudo o subagudo cursando con dolor intenso en la cara anterior del muslo y, en ocasiones, también en región lumbar, glúteo o periné seguido a las pocas semanas de debilidad muscular y amiotrofia controlada por períodos prolongados y, en general, mayores de 60 años. Su inicio es agudo o subagudo cursando con dolor intenso en la cara anterior del muslo y, en ocasiones, también en región lumbar, glúteo o periné seguido a las pocas semanas de debilidad muscular y amiotrofia (Mediavilla *et al.* 2001).

Neuropatía autonómica.

La diabetes mellitus es la causa más frecuente de neuropatía autonómica, afectando entre el 20-40 % de los diabéticos, aunque sólo el 5 % de los casos presentan síntomas. Dada la ubicuidad del sistema nervioso autónomo hace que las posibles manifestaciones clínicas de disfunción abarquen varios órganos y sistemas, siendo más frecuentes las gastrointestinales, las genitourinarias, las cardiovasculares y las sudorales (Grupo de Estudio de la Diabetes en Atención Primaria de Salud, 1999; Mediavilla *et al.* 2001).

1.1.2.1.2 Cuadro clínico

Hay muchas manifestaciones clínicas, que dependen de los nervios afectados, por ejemplo, entumecimiento o dolor de las extremidades e impotencia sexual. La disminución de la sensibilidad en los pies puede impedir que los diabéticos reconozcan a tiempo los cortes o rasguños, que se infectan y agravan. Si estas infecciones no se tratan a tiempo, pueden obligar a efectuar la amputación (OMS, 2020).

1.1.2.1.3 Diagnóstico

El diagnóstico temprano se establece cuando los enfermos o el personal sanitario reconocen los signos tempranos, y también mediante un examen clínico cuidadoso a intervalos periódicos (OMS, 2020).

1.1.2.1.4 Tratamiento

Si se detectan a tiempo y se mantiene el control de la glucemia, estas complicaciones pueden evitarse o retrasarse (OMS, 2020). El correcto control glucémico mejora, o por lo menos retarda la progresión de la neuropatía diabética. La supresión del tabaco y alcohol es punto clave en los tratamientos. Para el control del dolor se pueden emplear analgésicos simples (AAS) como paracetamol y antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Para el control del dolor superficial se puede utilizar crema de capsaicina 0,025-0,075 en aplicación tópica cada 6 h. Y en caso de dolor profundo se utiliza carbamacepina, 200-400 mg/día o mexiletina 450-675 mg/día. Se puede asociar imipramina 50-100 mg/día o amitriptilina 25-150 mg/día. Si estuvieran presentes calambres musculares, se emplea fisioterapia, diazepam y metaxolone (8 mg/6 h) (Mediavilla *et al.* 2001).

1.1.2.1.5 Prevención

El estricto control glucémico retarda la progresión de la neuropatía diabética. La educación sanitaria, como en toda la diabetes, es un pilar importante en la prevención y el tratamiento precoz de la neuropatía. Se debe vigilar la presencia de otros factores de riesgo para el desarrollo de polineuropatía periférica como son la ingesta de alcohol, nutrición escasa, exposición a tóxicos, uso de ciertos fármacos o compresión y aprisionamiento de nervios (CDC, 2013).

Las revisiones del paciente diabético deben incluir una detallada anamnesis sobre la presencia de dolor, parestesias o calambres en extremidades inferiores, existencia de mareos al pasar de la posición de decúbito a sedestación o a bipedestación, sensación de plenitud gástrica, diarreas, disfunción eréctil y pérdida

de los síntomas que se producen en la hipoglucemia (Mediavilla *et al.* 2001). En cuanto a exploraciones, se debe evaluar la sensibilidad térmica, dolorosa y vibratoria. Igualmente se explorarán los reflejos rotulianos y aquileas y la sensibilidad profunda mediante el signo de Romberg o la posición del dedo gordo del pie (Cano-Pérez *et al.* 1999).

1.1.2.2 Aterosclerosis

La aterosclerosis es la acumulación de grasas, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias, en las mujeres con diabetes tiene hasta cuatro veces mayor prevalencia que en los hombres con diabetes. La lesión radica en los miembros inferiores, sobre todo en el área infrapatelar o distal en arterias tibioperoneas y pedias (Mediavilla *et al.*, 2001) (Fig. 3).

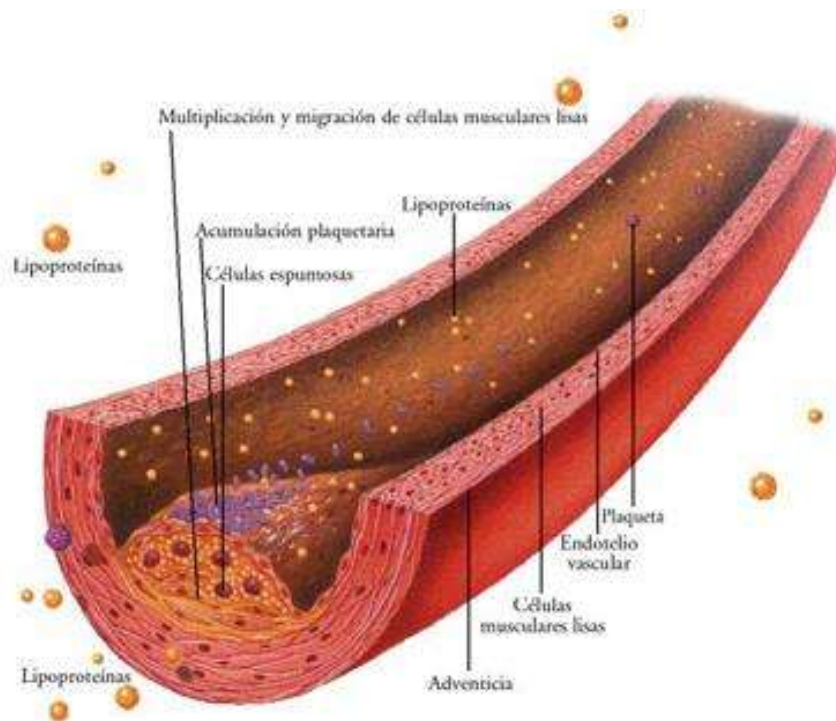


Figura 3. Aterosclerosis diabética (<https://cienciamx.wordpress.com, 2011>).

1.1.2.2.1 Etiología de la aterosclerosis.

La hiperglucemia daña los vasos sanguíneos mediante el proceso conocido como aterosclerosis o endurecimiento y obstrucción de las arterias. Este estrechamiento de las arterias puede reducir el flujo de sangre al músculo cardíaco (infarto del miocardio), del encéfalo (accidente cerebrovascular) o de los miembros inferiores (dolor y curación tórpidas de las heridas infectadas) (OMS, 2020).

1.1.2.2.2 Cuadro clínico

Las manifestaciones clínicas son diversas: van desde dolor de pecho hasta dolor de piernas, confusión y parálisis. Se dividen en (OMS, 2020):

Claudicación intermitente. Definida como la imposibilidad de caminar una determinada distancia a causa de un dolor o adormecimiento en los músculos de las piernas. Se considera grave cuando aparece después de andar una distancia inferior a 150 m en un terreno llano y a paso normal.

Dolor en reposo. A medida que se agrava la enfermedad vascular periférica aparece dolor en reposo que, generalmente, se describe como un dolor profundo de los músculos del pie, que está presente en reposo o por la noche. Frecuentemente acompañado de arteropatía y neuropatía. Si predomina el componente isquémico, el pie estará frío, pálido y aumentará el dolor con la elevación del mismo; si predomina el neurológico, el pie está caliente, insensible y a veces con subedema (Mediavilla *et al.*, 2001).

Gangrena seca. Si la enfermedad continúa progresando puede producirse ulceración y/o gangrena que suele comenzar a partir del primer dedo del pie. El componente infeccioso está ausente, aunque es necesario buscar con minuciosidad lesiones vecinas que pueden infectar el área necrótica (UKPDSG, 2000).

1.1.2.2.3 Diagnóstico

Si bien la detección temprana puede hacer más lenta la evolución, es incluso más importante reconocer a tiempo otros factores de riesgo como el tabaquismo, la hipertensión arterial y la obesidad (OMS, 2020).

1.1.2.2.4 Tratamiento

El control de estos factores de riesgo y de la glucemia puede prevenir o retrasar las complicaciones cardiovasculares (OMS, 2020). La mejor forma de tratamiento de la claudicación intermitente es el control de los factores de riesgo, como dejar de fumar, reducir peso, controlar las concentraciones de lípidos y la hipertensión, alcanzar un buen control glicémico y realizar un programa de ejercicio activo e intenso. El tratamiento vasodilatador, al igual que la simpatectomía, ha sido generalmente ineficaz. Las técnicas más eficaces en el tratamiento de la arteropatía periférica son las endovasculares (angioplastia con balón, aterectomía, angioplastia con láser) y las de revascularización, que los pacientes diabéticos toleran extraordinariamente bien, con una evolución excelente y unas tasas de morbilidad y mortalidad iguales a las de pacientes no diabéticos y no superiores a las de las amputaciones (Gibson, 1998). Por tanto, se deberá enviar al paciente a cirugía vascular de forma preferente cuando se tiene una gangrena seca sin infección o claudicación invalidante o disminución rápida de la distancia de claudicación, y de forma urgente cuando haya gangrena seca con áreas sugestivas de infección o dolor en reposo (Mediavilla, 2001).

1.1.2.2.5 Prevención

Las medidas más eficaces en la detección precoz de la arteropatía periférica son detectar claudicación o dolor en extremidades inferiores en reposo, junto con la inspección minuciosa de los pies con palpación de pulsos pedios y tibiales posteriores,

más la realización de Doppler de extremidades inferiores cuando esté indicado. (Mediavilla *et al.*, 2001).

1.1.2.3 Úlceras diabéticas

Se define como úlcera diabética a la alteración clínica de base causal neuropática e inducida por la hiperglucemia mantenida en la que, con o sin coexistencia de isquemia, y previo desencadenante traumático, produce lesión y/o ulceración del pie (SEACV, 1997).

La afección del pie diabético, causada por alteraciones de los vasos sanguíneos y los nervios, a menudo se complica con heridas que obligan a amputar. Es una de las complicaciones más costosas de la diabetes, especialmente en los grupos humanos que no usan calzado apropiado. Es consecuencia de trastornos vasculares y nerviosos. El examen y los cuidados frecuentes de los pies pueden ayudar a evitar la amputación. Los programas de cuidado integral de los pies pueden reducir las amputaciones en un 45 % a un 85 % (OMS, 2020).

Pequeños traumatismos provocan la lesión tisular y la aparición de úlceras. La presencia de una neuropatía periférica, una insuficiencia vascular y una alteración de la respuesta a la infección hace que el paciente diabético presente una vulnerabilidad excepcional a los problemas de los pies (ADA, 2019) (Fig.4).

La diabetes mellitus constituye una de las principales causas de amputación no traumática de los pies. La prevalencia de amputaciones entre los diabéticos es del 2 % y la incidencia de úlceras del 65 %. El riesgo de desarrollo de úlceras aumenta en los pacientes con una evolución de la diabetes superior a 10 años, de sexo masculino, con un escaso control metabólico y que presentan complicaciones cardiovasculares, oculares o renales (ADA, 2019).



Figura 4. Úlceras diabéticas (Bioxmedical [®])

1.1.2.3.1 Factores metabólicos presentes en el proceso de formación de úlceras durante la *Diabetes mellitus*

Los factores metabólicos, se resumen como un conjunto de alteraciones caracterizadas por cambios en las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), la elevación de las concentraciones de triglicéridos y el aumento de la presión arterial e hiperglucemia que predisponen al individuo a desarrollar enfermedades como diabetes y exacerbar sus complicaciones (Zimmet *et al.*, 2005).

En un tejido adiposo sano, se considera normal que prevalezca la sensibilidad a la acción de la insulina, mediada por la adiponectina y la leptina; mientras que en un sujeto con diabetes, predomina la resistencia a la acción de la insulina, mediada por la resistina y complicada por la reducción en las concentraciones de adiponectina y la pérdida de la respuesta celular a la acción de la leptina. Así, en un individuo con un peso normal de acuerdo con su talla, la presencia de adiponectina hace posible la captación periférica de la glucosa postprandial, que resulta de la absorción intestinal

de los productos de la digestión y en respuesta a la producción pancreática de insulina. (Zimmet *et al.*, 2005).

1.1.2.3.1.1 -Productos de glucosilación final avanzada

Es una reacción no enzimática que depende de la elevación de la glucosa extracelular e intracelular. Conduce a la adición de azúcares reductores a las proteínas, lípidos y nucleótidos. La glucosa puede unirse a grupos amino generando la formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGE-de las siglas en inglés) (Huebschmann, 2006). Estos productos lesionan las células modificando las proteínas intracelulares implicadas en la regulación de la transcripción de genes. Los precursores de los productos finales de la glucosilación avanzada pueden difundir al exterior de la célula y modificar las moléculas de la matriz extracelular generando disfunción celular por cambios en la señalización entre la matriz y la célula. La difusión al compartimento extracelular de AGE modifica proteínas circulantes como la albúmina; estas proteínas circulantes modificadas pueden unirse y activar receptores de AGE, causando la producción de citosinas inflamatorias y factores de crecimiento implicados en la patología vascular (Huebschmann, 2006). En los nervios periféricos, la glucosilación del componente proteico de la mielina es identificada por macrófagos que se unen a los AGE; este fenómeno provoca la desmielinización a través de la digestión de las proteínas A1 y P2 de la mielina, condición que provoca el daño a nivel de los nervios, provocando una neuritis por reacciones inmunológicas anormales lo que disminuye la velocidad de conducción sensitivo-motora y el flujo sanguíneo endoneural (Gutiérrez-Gutiérrez, 2009). A su vez, a nivel extracelular afecta a las proteínas relacionadas con la membrana basal al reducir su intercambio y origina el engrosamiento de la misma. Causa también atrapamiento irreversible de proteínas plasmáticas, tanto inmunoglobulinas como albúmina, y con ello una disminución de la actividad de proteoglucanos, alterando su acción neurotrófica para promover el crecimiento y la regeneración neuronal (Dorantes *et al.* 2016).

1.1.2.3.1.2 -Vía de los polioles

En condiciones fisiológicas, la glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato por la enzima hexoquinasa. En presencia de un exceso de glucosa, la hexoquinasa se satura, activando la vía de los polioles. En esta vía, la enzima aldosa reductasa, participa de modo conjunto con la glucosa para oxidar el NADPH hasta NADP y producir sorbitol (Romero-Mestre, 1998). El exceso de glucosa hace posible una mayor activación de esta vía, y por tanto de síntesis de sorbitol. La acumulación de éste causa estrés osmótico, ya que tiene lugar una depleción compensatoria de otros osmolitos como mioinositol y taurina. La disminución del mioinositol está asociada con alteraciones del potencial redox celular y con la reducción de la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ (Yorek *et al.*, 1989). Esto genera una acumulación de iones de sodio en la región interna de la axolema, que reduce el potencial de membrana a este nivel y con ello la velocidad de conducción nerviosa.

-Activación inadecuada de la proteína cinasa C

La activación de la vía de los polioles se acompaña de una sobreproducción de fructosa intracelular, que después de convertirse en fructosa-6-fosfato, entra en la vía glucolítica y, así, la vía de los polioles y la glicólisis se acoplan. Como resultado el gliceraldehído3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se incrementan, y finalmente se forma el diacilglicerol (DAG). El cual constituye un activador natural de la proteína cinasa C (PKC), la que aumenta en la diabetes mellitus (Hernández *et al.*, 2011). La activación de la PKC da lugar a una variedad de efectos en la expresión génica produciendo alteraciones celulares estructurales y funcionales. Entre ellas se encuentran la disminución de la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y, como consecuencia, de la producción de óxido nítrico (NO), e incremento de la endotelina-1, dando lugar a vasoconstricción e hipoxia tisular. También induce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en las células del músculo liso vascular, dando lugar a un aumento de la permeabilidad vascular, que promueve la angiogénesis. Induce a su vez la síntesis de factor de crecimiento transformante β

(TGF- β 1), el cual estimula la producción de proteínas como la fibronectina y el colágeno, y su acumulación en la matriz extracelular, lo que aumenta el espesor de la membrana basal y produce oclusión capilar. A su vez estimula la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), que disminuye el proceso de la fibrinólisis, dando lugar a la oclusión vascular. La PKC activa el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), aumenta la expresión de moléculas de adhesión, e incrementa la transcripción de genes proinflamatorios. Tanto el factor de crecimiento transformante β como el NF- κ B, son estimulantes de la inflamación y fibrosis (Hernández *et al.*, 2011).

1.1.2.3.1.3 -Vía de las hexosaminas y resistencia a la insulina

La fructosa vía sorbitol contribuye en la activación de la vía de las hexosaminas, debido a que la formación de las glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato y la glutamina, mediante una reacción irreversible catalizada por la fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA). La glucosamina-6-fosfato, a través de reacciones subsecuentes da origen a la UDP-N-acetilglucosamina y a la UDP-N-acetilgalactosamina, que se utilizan en la formación de glicoproteínas y proteoglicanos. El aumento del flujo a través de esta vía está relacionado con la expresión de genes como factor de crecimiento transformante β (TGF β), y del inhibidor del activador de plasminógeno1 (PAI-1), dando lugar a la oclusión capilar y vascular, tal y como ocurría con la activación de la PKC (Díaz-Flores, 2004). Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo la activación de las hexosaminas induce resistencia a la insulina. Por un lado, la glucosamina es responsable de impedir la acción de la insulina, al inhibir la fosforilación y la activación para el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1). Por otro lado, algunas de las proteínas que participan en la acción de la insulina, como los sustratos del receptor de insulina-1 y el transportador de glucosa 4 (GLUT4), necesitan ser fosforiladas para que la insulina ejerza su acción; sin embargo, la N-acetilglucosamina se une a ellas, formando un

enlace del tipo “O-” glicosídico (O-NaGlc), impidiendo el proceso de fosforilación, y disminuyendo por tanto la acción de la insulina. Ya que la insulina influye en la salud axonal normal, a través de factores de crecimiento neuronal (NGF), la resistencia a la insulina provocada por la activación de este factor metabólico, va a dar lugar a la apoptosis neuronal, y como consecuencia van a aparecer neuropatías diabéticas (Olmos *et al.*, 2012).

1.1.2.3.1.4 -Estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son productos potencialmente tóxicos para la función nerviosa. Se ha demostrado que, en el desarrollo de neuropatías en sujetos diabéticos, existe un aumento de la producción de ERO, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$) y peróxidos orgánicos e inorgánicos; así como una disminución de las defensas antioxidantes. Existen varios mecanismos implicados en el incremento del estrés oxidativo. Entre ellos se encuentran la auto-oxidación de la glucosa, que en solución acuosa y en presencia de metales de transición, como el hierro y cobre, se auto-oxida a enedíoles. En esta reacción se producen acetaldehídos intermediarios oxidados y ERO con alto poder oxidante (Otto-Buczkowska, 2016). A su vez el mecanismo de formación de productos de glicosilación avanzada anteriormente descrito está implicado en la generación del estrés oxidativo por su interacción con receptores específicos. Se han descrito receptores para los productos de glicosilación avanzada en numerosas células, incluyendo a los monocitos, macrófagos, células endoteliales, y células mesangiales. Las proteínas glicadas que se unen a estos receptores inducen la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno y contribuyen a la disminución de los niveles intracelulares de antioxidante. Dan lugar a un estado pro-inflamatorio, a la proliferación de células del endotelio y músculo liso arterial y a la activación de factores de transcripción como el NFkB, sensible al estado óxido-reductor (Díaz-Flores, 2004). Además, la hemoglobina glicosilada constituye una fuente de aniones superóxido en la pared vascular de los

diabéticos. Se ha demostrado que la hiperglucemia favorece la producción de anión superóxido mitocondrial, lo que ocasiona entre otros efectos adversos, la activación de la vía de los polioles y de las hexosaminas anteriormente descritas, y consecuentemente una disminución de los niveles de NADPH. La disminución de concentración de NADPH afecta negativamente la actividad de otras enzimas que también lo requieren, como la sintasa del óxido nítrico (NOS), la glutatión reductasa, la catalasa y la NADPH oxidasa. Algunas de ellas participan en los mecanismos antioxidantes; por lo tanto, la disminución de NADPH explicaría la deficiencia de los sistemas antioxidantes dependientes de glutatión en pacientes con diabetes. Para que el glutatión realice su acción como principal antioxidante intracelular en respuesta a las ERO es requisito indispensable que mantenga su forma reducida (GSH), por acción del glutatión reductasa sobre la forma oxidada (GSSG), lo que requiere el consumo de NADPH (Díaz-Flores, 2004).

1.1.2.3.2 Clasificación de las lesiones

La manera más empleada de cuantificar las lesiones ulcerativas, es la clasificación de Wagner, la cual enlista las lesiones en cinco grados de complejidad evolutiva, y es utilizada para unificar los criterios de los tratamientos (Wagner, 1981) (Fig. 5):

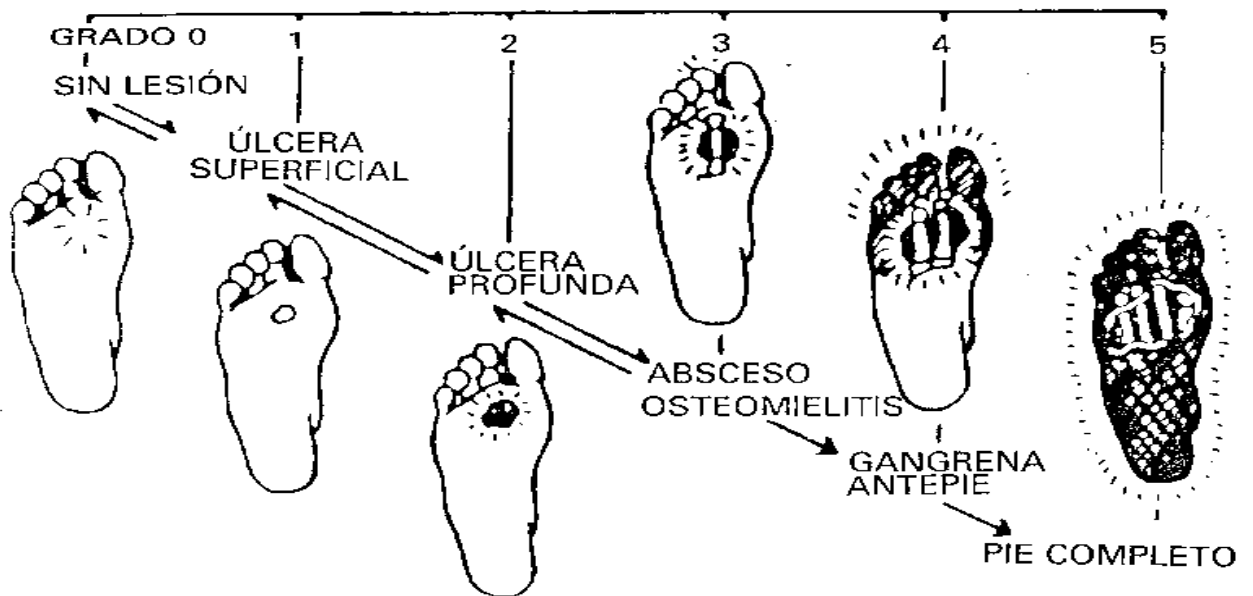


Figura 5. Clasificación de Wagner. Evolución ulcerativa. (Wagner, 1981)

1.1.2.3.2.1 Clasificación de Wagner:

- *Grado 0.* No hay lesión, pero se trata de un pie de riesgo (callos, fisuras, hiperqueratosis).
- *Grado 1.* Úlcera superficial. Suelen aparecer en la superficie plantar, en la cabeza de los metatarsianos o en los espacios interdigitales.
- *Grado 2.* Úlcera profunda que penetra en el tejido celular subcutáneo, afectando tendones y ligamentos, pero no hay absceso o afección ósea.

- *Grado 3.* Úlcera profunda acompañada de celulitis, absceso u osteomielitis.
- *Grado 4.* Gangrena localizada, generalmente en talón, dedos o zonas distales del pie.
- *Grado 5.* Gangrena extensa.

1.1.2.3.3 Prevención

La prevención viene dada por la identificación de los pacientes con pie de alto riesgo que son aquellos con mayor probabilidad de padecer neuropatía y/o arteropatía como son: fumadores, diabéticos de más de 10 años de evolución con control glucémico muy deficiente, existencia de otras complicaciones macro y microvasculares y con higiene deficiente, aislamiento o baja condición social que favorecen la presencia de infecciones. A estos factores habría que añadir, como factores exacerbantes de un pie de riesgo, la presencia de anomalías en el estado de la piel y las uñas del pie y la presencia de alteraciones biomecánicas como callosidades.

La detección precoz de los diabéticos con pie de riesgo por medio de la inspección periódica por parte del paciente y del personal sanitario, la palpación de pulsos y el uso del monofilamento 5.07 para evaluar la sensibilidad a la presión y táctil serán las medidas más adecuadas de prevención del pie diabético. Igualmente, el uso de calzado adecuado y las visitas regulares al podólogo evitarán el desarrollo de las complicaciones del pie (Mediavilla *et al.* 2001).

1.1.2.3.4 Tratamientos

1.1.2.3.4.1 Tratamientos alopáticos.

El tratamiento exitoso de la infección en los pies de pacientes con DM sigue siendo un desafío. Aunque el diagnóstico de la infección sigue siendo una decisión clínica, la presencia en pies insensibles a la neuropatía diabética más la insuficiencia vascular coexistente significa que la expresiones a menudo atípica. Las heridas frecuentemente producen crecimiento polimicrobiano, por lo que diferenciar organismos comensales de organismos patógenos puede ser difícil; los aislamientos de bacterias de las heridas del pie diabético a menudo son resistentes a múltiples fármacos. Los pacientes afectados a menudo tienen muchas otras comorbilidades, que no solo afectan la elección del régimen antimicrobiano apropiado, sino que también impiden la curación. Además, mucha controversia rodea el manejo de la osteomielitis, con los méritos y el papel de la cirugía aún por decidir (Powlson *et al.* 2010).

– *Hiperqueratosis o grietas.* Crema hidratante a base de lanolina o urea después de un correcto lavado y secado de los pies o uso de vaselina salicilada al 10 %. Las callosidades deben ser escindidas por un podólogo. Las grietas se tratan a base de antisépticos suaves y rodetes de protección.

– *Deformidades (hallux valgus, dedos en martillo, pie cavo).* Valorar la posibilidad de prótesis de silicona o plantillas y/o cirugía ortopédica.

– *Úlcera superficial.* Reposo absoluto del pie lesionado, cura tópica diaria con suero fisiológico y aplicación de antisépticos locales suaves. Valorar la presencia de posibles infecciones.

– *Úlcera profunda.* Reposo absoluto del pie lesionado. Se debe sospechar la posible existencia de infección. Se realizará desbridamiento de tejidos necróticos y toma de cultivo más radiografía. Como tratamiento empírico y hasta la llegada del antibiograma podemos usar amoxicilina/clavulánico (500 mg/6-8 h) o una quinolona (ofloxacino 400 mg/12 h o ciprofloxacino 750 mg/12 h). Si la lesión presenta tejido necrótico o aspecto fétido se asocia una quinolona con clindamicina o metronidazol

(Mediavilla *et al.* 2001). Se deriva al hospital de manera preferente siempre que exista sospecha de isquemia o infección, pie de grado 2 o 3 y las úlceras de más de 4 semanas de evolución. La derivación será urgente si el pie presenta celulitis superior a 2 cm, osteítis, sospecha de infección por anaerobios o afección sistémica (Cano-Pérez *et al.* 1999).

1.1.3 Factores inflamatorios e inmunológicos presentes en las complicaciones diabéticas.

La inflamación se desencadena por una cascada de factores, como las citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión que inician la interacción entre los leucocitos y el endotelio vascular y guían la migración de los leucocitos hacia el tejido lesionado. La inflamación crónica es un rasgo característico de las complicaciones diabéticas. En estudios clínicos, los marcadores inflamatorios circulantes se incrementan en pacientes con diabetes, y los valores de estos marcadores inflamatorios parecen predecir la aparición y progresión de las complicaciones diabéticas. Se ha demostrado también la existencia de anticuerpos localizados en el perineuro y en los axones, así como una inmunoglobulina autoinmunitaria que favorece la apoptosis de las neuronas (Dorantes *et al.* 2016).

Las respuestas inflamatorias también son inducidas por la activación de complejos proteicos intracelulares llamados inflamasomas. La activación del inflamasma requiere dos señales esenciales: 1) la señal de cebado y 2) la señal de activación (Bauernfeind *et al.* 2009). La señal de cebado inducida por estímulos inflamatorios extracelulares es un paso activo que conduce a la activación de factores de transcripción inflamatorios, incluidos NFκB, AP1 e IRF, y posteriormente induce la expresión de componentes del inflamasma y moléculas efectoras, como los receptores que reconocen patógenos (PRR), procaspasa-1, procaspasa-11, inflamasma asociado a apoptosis (ASC) y proIL-1β (Bauernfeind *et al.* 2009). Por

otro lado, la señal desencadenante está representada por la activación de los PRR y el ensamblaje del inflamasoma, lo que da como resultado la piroptosis mediada por gasdermina D (GSDMD) y la maduración y secreción de IL1 β y pro-IL18 inducidas por la caspasa - 1 (Bauernfeind *et al.* 2009). La activación del inflamasoma también podría ser inhibida por:

- 1) Interactores de proteínas endógenas, como el dominio de reclutamiento de la caspasa (CARD): proteínas dominio de pirina (PYD), proteínas motivo tripartito (TRIM), proteína de fusión leucémica promielocítica (LPM), modulador 3 de señalización de proteína G, choque térmico proteína 90-supresor de G-dos alelos de complejo Skp1, y I B quinasa α , (Martin *et al.* 2014).
- 2) Modificaciones postraduccionales de los componentes del inflamasoma, (Yang *et al.* 2017).
- 3) Procesos biológicos, como la autofagia, la inhibición de la generación de especies de oxígeno reactivas mitocondriales (mtROS), la supresión de la liberación del ADN mitocondrial (ADNmt) y la señalización de la hemooxigenasa-1 (Stutz *et al.* 2017).

1.1.4 Fatiga muscular

La fatiga muscular durante la diabetes se ve asociada a un fenómeno fisiológico debido a la hipo o hiperglucemia o bien a una combinación de ambas. La fatiga se ha definido como un síntoma subjetivo o una acción de decremento (Wessely, 1998). Existen tres fases en el decline de la fuerza cuando un músculo es sometido a estímulos eléctricos a un nivel máximo mediante tétanos isométricos (Allen *et al.* 2008). En la primera fase se reduce la fuerza entre un 80-90 % en 60 s, debido al incremento de la concentración de fosfato inorgánico (Pi) el cual inhibe la formación de los puentes cruzados. En la fase dos, la fuerza permanece relativamente constante y el suplemento de ATP se da a través de la degradación aeróbica y anaeróbica del glucógeno y en la fase tres la fuerza empieza a

disminuir principalmente debido a la reducción de la liberación de Ca^{2+} del RE, observado como la reducción de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al catión (Allen *et al.* 2008) (Fig. 6), sin embargo, también se ha identificado como un síndrome *per se* (síndrome de fatiga crónica) (Ream *et al.* 1996). La fatiga es generalmente denominada como complicaciones múltiples que abarcan fisiología, psicología y componentes situacionales, como eventos patológicos (Fritschi *et al.* 2010).

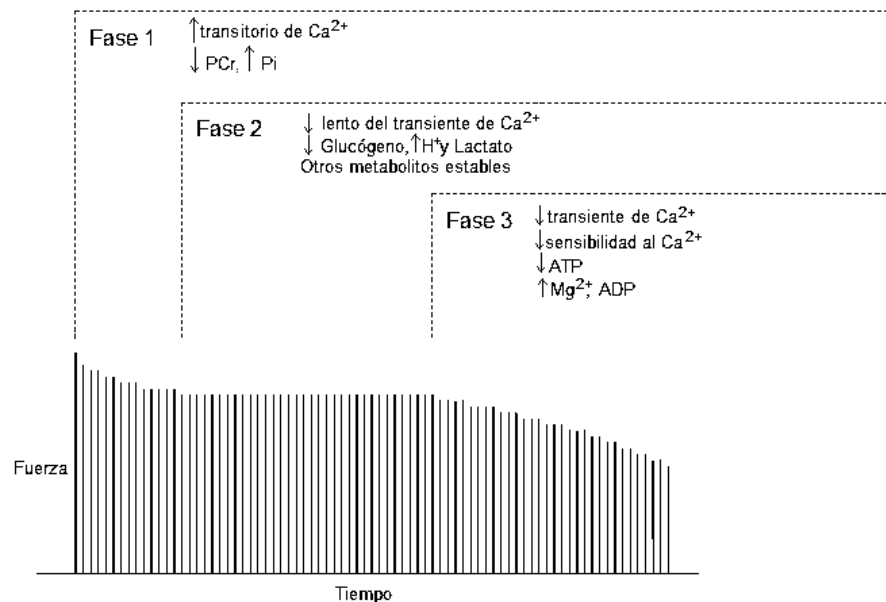


Figura 6. Esquema de fatiga de una fibra aislada, estimulada eléctricamente isométricamente. (Modificada de Allen *et al.*, 2008)

La fatiga crónica se asocia a enfermedades como el cáncer, enfermedad de obstrucción pulmonar crónica, artritis reumatoide, depresión y fibromialgia, pero en el caso de diabetes mellitus juega un papel muy importante. Un criterio común es que la fatiga resulta de procesos fisiológicos periféricos solos o en combinación con la fisiología del sistema neurológico. Se divide en periférica y central según los procesos y sistemas involucrados.

La fatiga periférica se ha descrito como un fenómeno fisiológico, que involucra un órgano terminal como el músculo esquelético o cardíaco y se ha definido como la disminución de la capacidad de tensión (fuerza) muscular con estimulación repetida (Fritschi *et al.* 2010). La fatiga periférica, como la que se observa en el músculo esquelético, se produce por una combinación de patologías neurológicas, músculo esqueléticas y metabólicas, como reducciones en las reservas de glucógeno hepático o muscular, reducción del consumo de oxígeno durante la actividad y cambios en las fibras musculares que resultan de la inactividad física o el envejecimiento (Fritschi *et al.* 2010).

1.1.5 Estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se producen en los músculos activos y tienen un papel importante en la fatiga. La evidencia más convincente de que las ERO contribuyen a la fatiga proviene de experimentos con captadores de ERO añadidos de forma exógena que pueden reducir la tasa de fatiga en los músculos aislados, en animales y los humanos. A pesar de la evidencia de algún papel de las ERO en la fatiga muscular, muchos aspectos siguen siendo inciertos, particularmente la fuente de las ERO, la identificación de estas y el mecanismo por el cual contribuyen a la fatiga (Allen *et al.* 2008). El incremento de las ERO en general y del $O_2^{\cdot-}$ en particular generan un aumento de la actividad de la proteína cinasa C (PKC), activando señales intracelulares de estrés metabólico y oxidativo, caracterizado por incrementos en las actividades de NF- κ B, p38, MAPK y Jak/STAT, las cuales activan diferentes vías metabólicas, encienden la expresión genes y provocan una respuesta masiva y de largo plazo. Esta condición genera un incremento de la concentración del $NO^{\cdot}$ al estimular a la sintetasa correspondiente. La señalización intracelular de estrés y el incremento del $NO^{\cdot}$ inducen a su vez el incremento de diferentes citocinas, tales como ET1, resultando en la activación de las NADPH y NADH oxidasas, con reducciones adicionales del poder reductor y de la capacidad antioxidante total. Todo

lo anterior termina incrementando en un círculo vicioso las concentraciones de ERO y en particular del $O_2^{\cdot-}$, que al reaccionar con el $NO^{\cdot}$ en exceso da por resultado el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) que también es un potente oxidante, generando sistemas de daño y disminuyendo la $NO^{\cdot}$ disponible y sus efectos benéficos al sistema circulatorio. Así mismo, el O_2 en las células endoteliales se puede al convertirlo a H_2O_2 por la acción de la enzima catalasa, el cual induce apoptosis y angiogénesis patológica, con consecuencias en la arquitectura y la función vascular.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo es que la hiperglucemia en general y el estado metabólico propio de la DM en particular pueden generar daño y estrés oxidante en los órganos, de manera específica en las extremidades inferiores. El daño oxidante se presenta cuando hay un aumento de la concentración de moléculas oxidantes, sean endógenas o exógenas, o cuando existe la reducción de las defensas antioxidantes. Las enfermedades metabólicas, como la DM, tienen grandes posibilidades de tener una participación de elementos oxidativos en su génesis, evolución o complicaciones ya que pueden generar estados oxidantes o afectar la generación o la eficiencia de recuperación de los mecanismos antioxidantes (Quintanar-Escorza, 2009).

Existen evidencias experimentales que sugieren que el estrés oxidante puede determinar el inicio y la progresión de las complicaciones tardías de la DM. Estas evidencias (Likidilid *et al.* 2010) muestran que pacientes con DM presentan un aumento en el estrés oxidativo y los procesos de inflamación, siendo mayores en aquellos que presentan complicaciones propias de la patología, caracterizadas por una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes y un incremento de los productos de oxidación (Takayanagi *et al.*, 2011).

La pérdida de balance en el equilibrio pro-oxidante/antioxidante que se ha observado en la DM puede explicar el daño oxidativo que presentan las macromoléculas, dando lugar a alteraciones oxidativas en el DNA, las proteínas y los lípidos (Srivatsan *et al.* 2009). De igual forma las deficiencias en los sistemas antioxidantes

se han asociado con un incremento en el riesgo de las complicaciones de la DM (Calderón-Salinas, 2011).

1.1.6 Tratamientos alternativos.

La Organización Mundial de la Salud, ha definido a la Fitomedicina como la aplicación de principios activos de origen vegetal en terapéutica, basado en el conocimiento científico moderno. Esta base se sostiene en los pilares fundamentales de la farmacología y la terapéutica moderna: farmacodinamia, farmacocinética, estudios preclínicos, clínicos y la divulgación de éstos a través de medios reconocidamente validados por las comunidades científicas (Morales *et al.* 2009).

Los remedios tradicionales, especialmente las formulaciones a base de plantas, promueven la cicatrización de heridas de una manera sorprendente, ya que influyen en etapas únicas o múltiples durante la cascada de cicatrización de heridas. Esta cascada comprende varios eventos fisiológicos sistemáticos cuyo objetivo es reparar el tejido dañado, ya sea total o al menos parcialmente (Budovsky *et al.* 2015). El proceso se puede clasificar en 3 fases principales; la fase inflamatoria (restablecimiento de la homeostasis e inflamación local), la fase proliferativa (granulación, contracción del tejido y comienzo de la epitelización) y finalmente la fase de remodelación, que decide la fuerza y apariencia del tejido después de la cicatrización (Kasuya *et al.* 2014).

Los aceites esenciales, aislados de diversas fuentes vegetales, se utilizan comúnmente en el tratamiento de primeros auxilios de heridas, quemaduras o abscesos. Estudios recientes arrojan luz sobre sus propiedades antimicrobianas, pesticidas, promotoras de la cicatrización y antioxidantes, debido a sus compuestos

farmacológicamente activos, por ejemplo: borneol, alcanfor, terpinen-4-ol, eucaliptol y muchos otros compuestos (Woollard *et al.* 2007).

1.2 *Aloe vera*.

El *Aloe vera* (también conocido como *Aloe barbadensis* Mill., *Aloe indica* Royle, *Aloe perfoliata* L. var. *vera* y *A. vulgaris* Lam) es una planta perteneciente a la familia Liliaceae, de la cual hay más de 360 especies conocidas (Vogler *et al.* 1999). Son plantas suculentas perennes parecidas a los cactus y se caracterizan por presentar hojas sin tallo, grandes, gruesas y carnosas que tienen forma de lanza y tienen un ápice afilado y un margen espinoso (Fig. 7) (Steenkamp *et al.* 2007). De la planta se obtienen dos productos distintos: el látex amarillo, que se conoce como jugo de aloe, y la pulpa de la hoja que es la porción más interna de la hoja y está compuesta por el parénquima celular cuya función básica es el almacenamiento de alimentos y nutrientes que contienen el gel de *Aloe vera*. La pulpa cruda contiene aproximadamente 98.5 % de agua y el 1.5 % restante contiene una variedad de compuestos que incluyen vitaminas, minerales, enzimas, polisacáridos, compuestos fenólicos y compuestos orgánicos solubles en agua y ácidos liposolubles (Hamman *et al.* 2008). La pulpa de la hoja se presenta comúnmente como ungüento tópico sobre heridas en forma de gel, crema o mucílago.

La evidencia de estudios en animales ha resaltado los posibles efectos del *Aloe vera* en la cicatrización de las heridas (Takzare *et al.* 2009). Gracias a las enzimas hidrolizantes de prostaglandina y bradiginina presentes en el *Aloe vera*, incluidas la carboxipeptidasa y la bradiginasa, tienen la capacidad de reducir el dolor y la inflamación (Takzare *et al.* 2009). Se ha postulado que los polisacáridos derivados del aloe, como la manosa-6-fosfato, son sustancias de crecimiento activo, especialmente en la epitelización (Steenkamp *et al.* 2007). Generada por

la unión de manosa-6-fosfato a los receptores de fibroblastos, lo que induce la proliferación fibroblástica, que en última instancia ayuda a promover la deposición de colágeno y la reorganización de los tejidos. Se ha demostrado que el acemanano, otro polisacárido, regula al alza la actividad de los glóbulos blancos en el proceso de cicatrización de heridas (Tamura *et al.* 2009). Además, las propiedades antibacterianas de antraquinonas, un compuesto orgánico responsable del pigmento natural del *Aloe vera*, es beneficioso para minimizar las infecciones (Tamura *et al.* 2009).



Figura 7. *Aloe vera*.

1.3 *Melaleuca alternifolia*.

La especie *Melaleuca alternifolia* pertenece a la familia Myrtaceae, es un árbol que no supera los 6 m de altura, con hojas estrechas, dispuestas en forma alterna, flores blancas en ramillete, con estambres reunidos en la base en cinco grupos (Fig. 8). Se trata de una planta autóctona de la costa oriental de Australia, de cuyas hojas se produce uno de los aceites esenciales más activos desde el punto de vista medicinal. Es utilizado como cicatrizante y antibacteriano (Hammer *et al.*, 2008).



Figura 8. *Melaleuca alternifolia*

1.4 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales (AE) son extractos vegetales aromáticos muy complejos y concentrados. Pueden contener más de una centena de moléculas aromáticas en proporciones muy variables. Son estas distintas combinaciones de moléculas las que aportan a los aceites esenciales sus propiedades tan particulares y las causantes de su olor característico. Los principales usos de los AE abarcan el cuidado terapéutico (vía oral, transcutánea, cutánea, pulmonar). Se deben utilizar excipientes apropiados para todas las vías de absorción, en especial para la vía oral. Son hidrosolubles, por tanto, no se debe utilizar el agua como excipiente, es preferible utilizar aceites vegetales, una base limpiadora (gel), alcohol o una base de crema neutra (Morales *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales tienen numerosas propiedades medicinales. Son eficaces frente a numerosos gérmenes y hongos distintos, así como frente a los virus. Cada aceite esencial tiene su propia propiedad terapéutica específica.

El AE de *M. alternifolia*, es un líquido incoloro o amarillo pálido que se obtiene de las hojas y ramas tiernas por destilación en corriente de vapor de agua. Una vez condensada, la fase clara del aceite de color amarillo pálido se separa de la destilación

acuosa. El rendimiento de aceites es típicamente de 1 a 2 % del peso húmedo de material vegetal (ISO 4730:2004), sus propiedades son (OMS, 2004):

- Densidad relativa: 0.885 a 0.906
- Solubilidad: escasamente soluble en agua y miscible con solventes no polares.
- Índice de refracción: 1.475 a 1.482
- Rotación óptica: +5° a +15

1.4.1 Terpenos

El AE de *M. alternifolia* está compuesto por hidrocarburos terpénicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes y sus asociados (Fig. 9). Los terpenos son hidrocarburos volátiles, aromáticos y pueden ser considerados polímeros de isopreno, que tienen la fórmula C_5H_8 . El componente mayoritario es el terpinen-4-ol, alcohol monoterpénico cuyo porcentaje supera el 30 % y suele situarse alrededor del 40 % aunque puede alcanzar el 48 %. Le siguen γ -terpineno y α -terpineno. Y el 1,8-cineol en un máximo del 15 % (Cox *et al.*, 2001). La estabilidad del AE de *M. alternifolia* cambia particularmente en presencia del oxígeno atmosférico, pero también cuando el aceite es expuesto a la luz y a las altas temperaturas. Los niveles de α -terpineno, γ -terpineno y terpinoleno disminuyen, mientras que los niveles de p-cimeno incrementan hasta diez veces. Los procesos de oxidación conducen a la formación de peróxidos, endoperóxidos y epóxidos. Las principales vías de oxidación y degradación se muestran en la (Fig. 10) (Brophy *et al.*, 1989). A continuación, se resumen los principales componentes y sus rangos de concentración aceptables de acuerdo con la norma ISO correspondiente (Tabla 2) (ISO, 4730:2004).

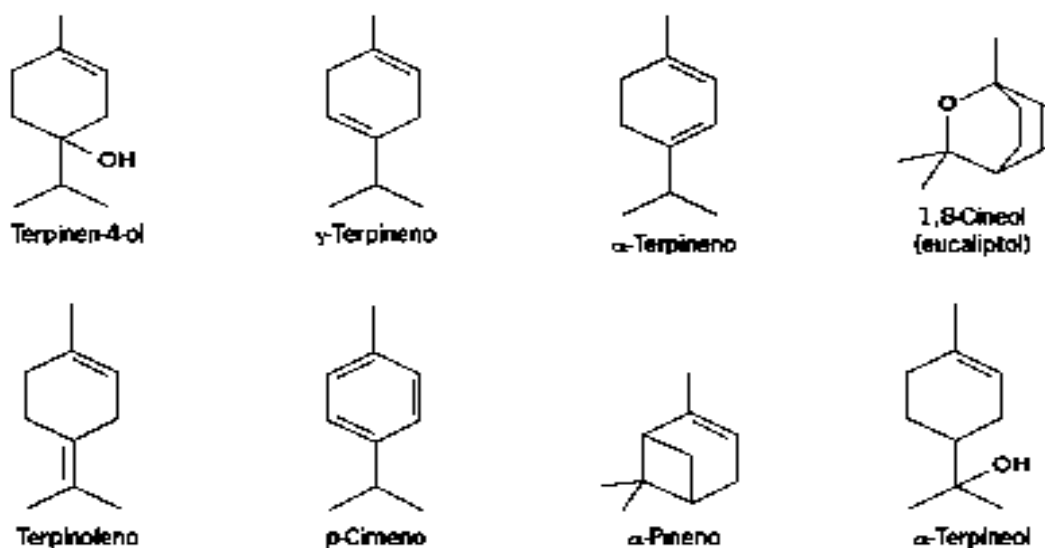


Figura 9. Principales componentes del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*. (Cox *et al.*, 2001).

Tabla 2. Composición del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*: rangos (%) aceptables para los principales componentes según la norma ISO 4730. (ISO, 2004)

Componente	%	Componente	%
Terpinen-4-ol	≥ 30	α -Terpineol	1.5-8
γ -Terpineno	10-28	Acromadendreno	Trazas-7
α -Terpineno	5-13	δ -Cardineno	Trazas -8
1,8-Cineol(eucaliptol)	≤ 15	Limoneno	0.5-4
Terpinoleno	1.5-5	Sarbineno	Trazas -3.5
p-Cimeno	0.5-12	Globulol	Trazas -3
α -Pineno	1-6	Viridiflorol	Trazas -1.5

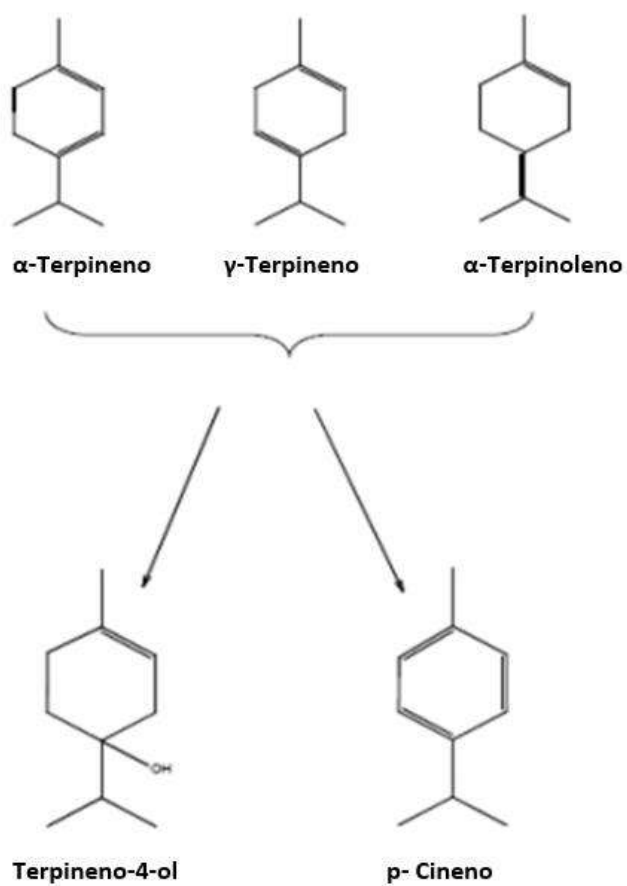


Figura 10. Productos finales de la hidrólisis y oxidación de los componentes del AE de *Melaleuca alternifolia* (Modificado de Brophy *et al.*, 1989).

2 JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las patologías con mayor tasa de incidencia a nivel mundial. Una de sus complicaciones tardías es el pie diabético y/o úlceras diabéticas. Actualmente, se emplean tratamientos altos en costos por lo que se ha buscado la utilización de terapias alternativas como la fitoterapéutica tópica. El *Aloe vera* induce la proliferación fibroblástica, ayudando a promover la deposición de colágeno y la reposición de los tejidos. Por su parte, el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, posee efectos antimicrobianos y cicatrizantes, debido a su alto contenido de terpenoides. Por ello se considera que su utilización tópica conjunta es un tratamiento eficaz en el tratamiento local de heridas crónicas cutáneas y musculares en organismos con diabetes, mejorando la cicatrización y el funcionamiento general del tejido tratado.

3 HIPÓTESIS

El gel de *Aloe vera* en conjunto con el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* optimizan el proceso de cicatrización ya que controla la proliferación bacteriana causante de retrasar este proceso en lesiones ulcerativas exacerbadas por diabetes, mejora la contracción de músculo dañado y disminuye el estrés oxidante en el tejido regenerado.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* adicionado en gel de *Aloe vera* en el tratamiento local de heridas crónicas cutáneas y musculares crónicas inducidas durante la diabetes experimental.

4.2 Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* adicionado en gel de *Aloe vera* sobre el tiempo y eficiencia en la cicatrización de heridas crónicas inducidas durante la diabetes experimental.
- Determinar el efecto del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* adicionado en gel de *Aloe vera* sobre la tensión muscular y la resistencia a la fatiga en músculo dañado por heridas crónicas inducidas durante la diabetes experimental.
- Analizar el efecto del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* adicionado en gel de *Aloe vera* sobre el estrés oxidante del tejido cicatrizado (epitelial y muscular) de heridas crónicas inducidas durante la diabetes experimental.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Wistar adultas con un peso de entre 230-250 g. Las cuales se mantuvieron en el bioterio del IIQB, en cajas de acrílico, bajo controles de dieta (alimento estándar y agua de grifo *ad libitum*), temperatura constante (24 ± 2 °C) y ciclos de luz/obscuridad (12 h/12 h). Todos los animales se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante una semana antes del experimento. Siguiendo las recomendaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA REPRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO” de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, así mismo el protocolo experimental de esta investigación también fue aprobada por el Comité de Bioseguridad y Bioética para el uso de animales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

5.2 Diseño experimental

Los animales se distribuyeron de manera aleatoria, separadas en 8 grupos de 6 ratas cada uno:

- Grupo control (CTRL): sin patología, sin herir y sin tratamiento alguno.
- Grupo diabéticas (D): inducidas a diabetes experimental, sin herir.
- Grupo heridas sin tratamiento (HST).
- Grupo diabéticas sin tratamiento (DST).
- Grupo heridas gel (HG): heridas tratadas con Gel de *Aloe vera*.
- Grupo diabéticas gel (DG): diabéticas tratadas con Gel de *Aloe vera*

- Grupo heridas tratamiento (HT): heridas tratadas con Gel de *Aloe vera* adicionado con AE de *Melaleuca alternifolia* al 4 %.
- Grupo diabéticas tratamiento (DT): diabéticas tratadas con Gel de *Aloe vera* adicionado con AE de *Melaleuca alternifolia* al 4 %.

5.3 Inducción de diabetes experimental

Las ratas se mantuvieron en ayuno durante 12 h. Posteriormente a cada rata se le administró estreptozotocina (STZ) a una dosis de 45 mg/kg preparada *in situ* en buffer de citratos (0.1 M, pH 4.5) 1.0 ml/kg por vía intraperitoneal (Tesch y Allen, 2007). Los ocho días posteriores no se manipularon los animales para evitar estrés, pasados los ocho días se determinó la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro *Accu-Check Instant®* (Roche), solo los modelos experimentales con una destroxitis ≥ 250 mg/dl fueron incluidos en los experimentos posteriores.

5.4 Determinación y monitoreo de diabetes crónica

Una vez confirmada la patología, se monitoreo a los modelos experimentales durante los tres meses posteriores hasta establecer una diabetes crónica, midiendo de manera semanal los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal.

5.5 Creación de herida

5.5.1 Procedimiento pre-quirúrgico

Las ratas a herir por grupo se mantuvieron en ayuno prequirúrgico 12 h previas. Se comenzó la preparación del modelo experimental con una sedación total por medio de una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg, una vez inmovilizado se procedió a la realización de tricotomía por medio de una rasuradora eléctrica y posterior a ello con cera fría (Veet®). Se aplicó acrilato en el área depilada para evitar irritaciones y así proceder inmediatamente a la sanitización del área a herir con solución electrolizada de ácido hipocloroso 1.0 M (Mendes *et al.*, 2012). Una vez limpia y despejada el área a herir inyectó lidocaína a dosis respuesta para asegurar el bloqueo sensorial aferente antes de cualquier lesión incisiva.

5.5.2 Procedimiento quirúrgico

Una vez confirmado el bloqueo se procedió a realizar una biopsia quirúrgica cuadrada por incisión y escisión de 7 mm por lado con tijera Adson quirúrgica y pinzas de disección, en bíceps femoral de la extremidad posterior izquierda (Masood *et al.*, 2019). Posterior a ello se realizó una biopsia por escisión con punzón quirúrgico para biopsia de 6 mm en músculo extensor digitorio largo (EDL) de extremidad posterior derecha (Mendes *et al.*, 2012).

5.5.3 Procedimiento post-quirúrgico

Una vez culminado el proceso quirúrgico los modelos experimentales se mantuvieron en observación durante las 2 h posteriores para monitorear los

valores fisiológicos normales (Pritchett-Corning *et al.*, 2011) de frecuencia respiratoria (66-114) y temperatura corporal (35.9-37.5 °C) hasta pasado el efecto del sedante.

5.6 Tratamiento

Los grupos (sanos y diabéticos) con tratamiento se dividieron en grupos tratados con *A. vera* el cual consistía en un gel comercial de *A. vera* al 70 % y grupos tratados con gel de *A. vera* adicionado con aceite esencial de *M. alternifolia*.

5.6.1 Formulación de dosis

Se formuló una película en gel cargada con aceite esencial de *M. alternifolia*, utilizando gel comercial de *A. vera*, se agregaron gota a gota a la solución viscosa, con agitación continua, para alcanzar una concentración de aceite del 4 % v/v dentro de la formulación, y se agitó durante 1 h. La selección de la dosis para el aceite esencial se realizó adaptando el método desarrollado por Wang *et al.*, (2011), donde el 4 % v/v dio mejores resultados de cicatrización de heridas en comparación con otras concentraciones más bajas y demostró efectos favorables antibacterianos.

5.6.1.1 Densidad del aceite esencial de Melaleuca alternifolia es de 0.878 g/mL

- 1 gota contiene 20 μ l
- 10 gotas = 200 μ l = 0.2 ml
- En 5 g de excipiente se agregaron 0.2 ml de AE
- Es decir en 5000 mg de excipiente /200 μ l de AE
- 1 ml AE = 0.878 g AE $\rightarrow$ 1000 μ l = 878 mg
- 0.2 ml AE = 0.1756g AE $\rightarrow$ 200 μ l = 175.6 mg

- A cada rata se le aplicaron 50 μ l de tratamiento en cada herida, 50.99 mg de los cuales 1.73 mg son AE de *Melaleuca alternifolia*
- Lo que equivale al 4 % del total de μ l que se pusieron en cada herida.

5.6.1.2 Densidad del Aloe vera es de 0.975 g/ml

- En 5 g de excipiente se agregaron 0.2 ml de AE
- Es decir en 5000 mg de excipiente /200 μ l de AE
- 1 g *Aloe vera* = 0.975 ml *Aloe vera* $\rightarrow$ 1000 mg = 975 μ l *Aloe vera*
- 5 g = 4.875 ml $\rightarrow$ 5000 mg = 4875 μ l
- A cada rata se le aplicaron 50 μ l de excipiente en cada extremidad, es decir 51.2 mg en cada herida.

5.7 Manejo de la herida

En los grupos manejados con tratamiento tópico en gel de *A. vera* y en los grupos manejados con gel de *Aloe vera* adicionado con aceite esencial de *M. alternifolia* al 4 % se comenzó la aplicación al tercer día de haber sido realizada la herida, posterior al ello se aplicó en el sexto, noveno y doceavo día a una dosis de 50 μ l por herida y difuminada con ayuda de un hisopo.

5.8 Eutanasia

Una vez culminado el tratamiento se procedió a la eutanasia por medio de guillotina con previa sedación con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg después de la sedación se tomó la fotografía final de la herida ya cicatrizada.

5.9 Análisis de cierre de la herida

Para evaluar el efecto del AE de *M. alternifolia* sobre el tiempo y la eficacia en la cicatrización de las heridas inducidas durante la diabetes experimental se realizó el análisis en el progreso del cierre mediante la recolección total de las imágenes fotográficas de las heridas. Se tomó una fotografía posoperatoria inmediata y posterior a ello se fotografió la herida al tercer, sexto, noveno y doceavo día, así como en el día de la eutanasia en el día 15, de los distintos grupos (HST, DST, HT, DT, HE, DE), se midieron y editaron en Photoshop calculando el área obtenida de la medición punto por punto de la zona expuesta de las úlceras (Kant *et al.*, 2014). Durante la medición del área de la herida, los animales se colocaron dentro de una caja de luz led fotográfica con la herida hacia arriba. Se fotografiaron las heridas a una distancia de 16 cm. El área (píxeles) dentro de los límites de cada herida se determinó planimétricamente donde se utilizó Adobe Photoshop® para convertir el área de la herida en píxeles a mm² para cada herida en particular. El porcentaje de contracción de la herida se utilizó para expresar los resultados de las mediciones de la herida y se calculó mediante la fórmula de Wilson (Sardari *et al.*, 2007) de la siguiente manera:

$$\text{PORCENTAJE (\%) DE CONTRACCIÓN DE LA HERIDA} = \frac{\text{ÁREA DE LA HERIDA EN EL DÍA 0} - \text{ÁREA DE LA HERIDA DE UN DÍA EN PARTICULAR}}{\text{ÁREA DE LA HERIDA EN EL DÍA 0}} \times 100$$

5.10 Pruebas de tensión muscular y resistencia a la fatiga

Para realizar el registro de tensión isométrica se colocó el músculo EDL diseccionado de la extremidad posterior derecha, en una caja Petri revestida con fondo de resina transparente (Sylgard®) donde se fijaron con ayuda de alfileres entomológicos inmersos en solución Krebs-Ringer (118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM MgSO₄, 24.8 mM NaHCO₃, 1.18 mM KH₂PO₄, 10 mM

Glucosa y 2.54 mM CaCl_2) (Krebs *et al.*, 1932) suministrados con gas carbógeno (95 % de O_2 y 5 % CO_2). Se procedió a limpiar el músculo eliminando el exceso de tejido graso y conectivo el cual se retiró bajo microscopio estereoscópico.

Posteriormente el músculo se montó en una cámara del registro de tensión isométrica, sujetándolo por el extremo distal al gancho de un transductor óptico, el cual se conectó a un amplificador y este a su vez a una interfase analógico-digital que permitió adquirir la tensión generada por el músculo en una computadora, mediante el software MDAC (World Precisión Instruments, USA) (Fig.11).

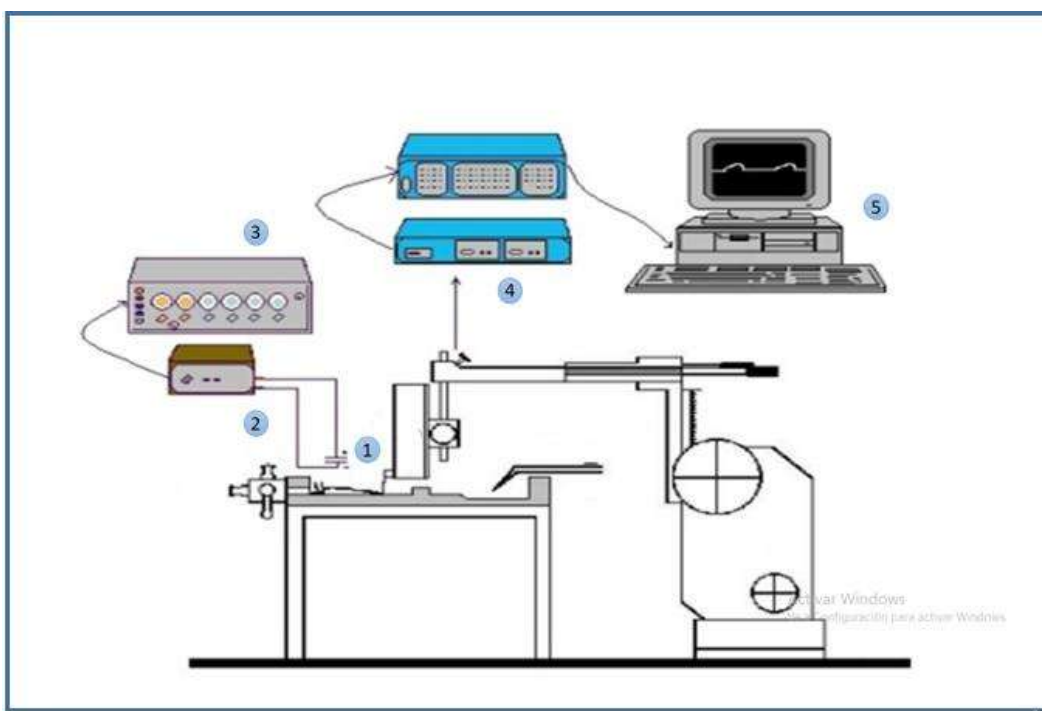


Figura 11. 1. Cámara de registro, 2. Transductor, 3. Amplificador, 4. Interfase analógica digital, 5. Computadora para análisis (Montoya-Pérez, 2010).

Dentro de la cámara de registro el músculo fue estirado 1.5 veces su longitud de reposo y se dejó montado en la cámara de registro inmerso en solución fisiológica por espacio de 10 min antes de proceder al registro de

tensión isométrica, se colocaron dos electrodos de platino, los cuales se encontraban conectados a una unidad aisladora de estímulos (Grass FT03), estos con la finalidad de aplicar el protocolo de inducción de fatiga el cual consta de pulsos de 100 V a 300 ms de duración a una frecuencia de 50 Hz (Fig.12). Se detuvo la estimulación en presencia de fatiga.

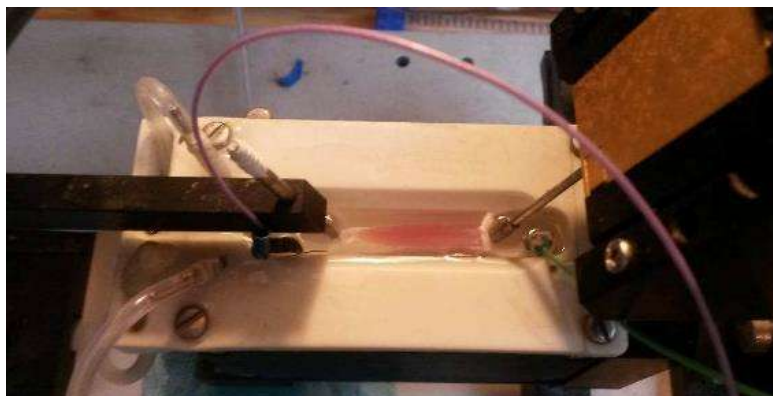


Figura 12. Cámara de registro

Una vez concluido el protocolo de fatiga se guardó el músculo en formaldehído al 10 % para sus posteriores análisis histológicos. Una vez obtenidos los registros de tensión se editaron y midieron por medio de Adobe Photoshop®.

5.11 Evaluación de estrés oxidante

5.11.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) se determinó (Ortiz-Avila *et al.*, 2015) utilizando 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoresceína (H_2DCFDA). Se agregó 0.5 mg/ml del homogenizado de proteína de tejido, resuspendido en buffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 , 3 mM $MgCl_2$). Se incubó en 20 μM de H_2DCFDA durante 15 min. Después se registró la fluorescencia basal durante 1 min a Ex/Em

491/518 nm. El incremento de la fluorescencia se monitoreo 60 min después (Ortiz-Ávila *et al.* 2013). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de 2',7'-diclorofluorocína (DCF).

5.11.2 Relación GSH/GSSG

Este parámetro se estimó (Rahman *et al.*, 2006) mediante el contenido de glutatión total (GSht). 0.1 mg/ml del homogenizado de proteína del tejido se resuspendió en 0.5 ml de ácido sulfosalícilico al 5 % 0.1 % de Triton-X100 en 0.1 M de buffer de fosfato 5 mM EDTA, pH 7.5 para ser desprotenizado, y se sonicó durante 30 s en baño de hielo, posteriormente se congeló a -80 °C y se descongeló dos veces. A continuación, se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min. El pellet fue descartado y se añadieron 100 μ l de sobrenadante en una reacción que contenía 100 mM de 5,5'-ditiobis (ácido-2-nitrobenzoico) (DTNB) y 0.125 U/ml de glutatión reductasa (GR) a un volumen final de 1 ml. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se adicionó 50.0 μ M de β -NADPH, la reducción de DTNB se siguió espectrofotométricamente a 412 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550, siendo la tasa de reducción de DTNB directamente proporcional a la concentración de GSH. Los niveles de glutatión oxidado (GSSG) fueron determinados después de la derivación del glutatión reducido (GSH) incubando la muestra al 3 % de 4-vinilpiridina durante 60 min a temperatura ambiente en la obscuridad. Finalmente, la cantidad de GSH se calculó restando la concentración de GSht menos la concentración de GSSG.

5.12 Análisis estadístico

Se analizaron los resultados de 6 experimentos independientes mediante el programa GraphPad Prism® 8.0. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p \leq 0.05$) se determinaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de

una y dos vías y la prueba post-hoc Tukey. Los datos fueron expresados como la media $\pm$ E.E.

6 RESULTADOS

6.1 Efecto del gel *Aloe vera* adicionado con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* sobre la cinética de cierre de la herida

La contracción de la herida se calculó como porcentaje de reducción en área de la herida en el 3°, 6°, 9° y 15° día del experimento. Como se ilustra en la **Fig. 13**, en los grupos normoglucémicos, la aplicación tópica de tratamiento gel de *A. vera* adicionado con aceite esencial de *M. alternifolia* al 4 % y solo gel de *A. vera*, mostró diferencias significativas en el porcentaje de contracción de la herida, con el grupo control.

PROGRESO DEL CIERRE DE HERIDA EN RATAS SANAS

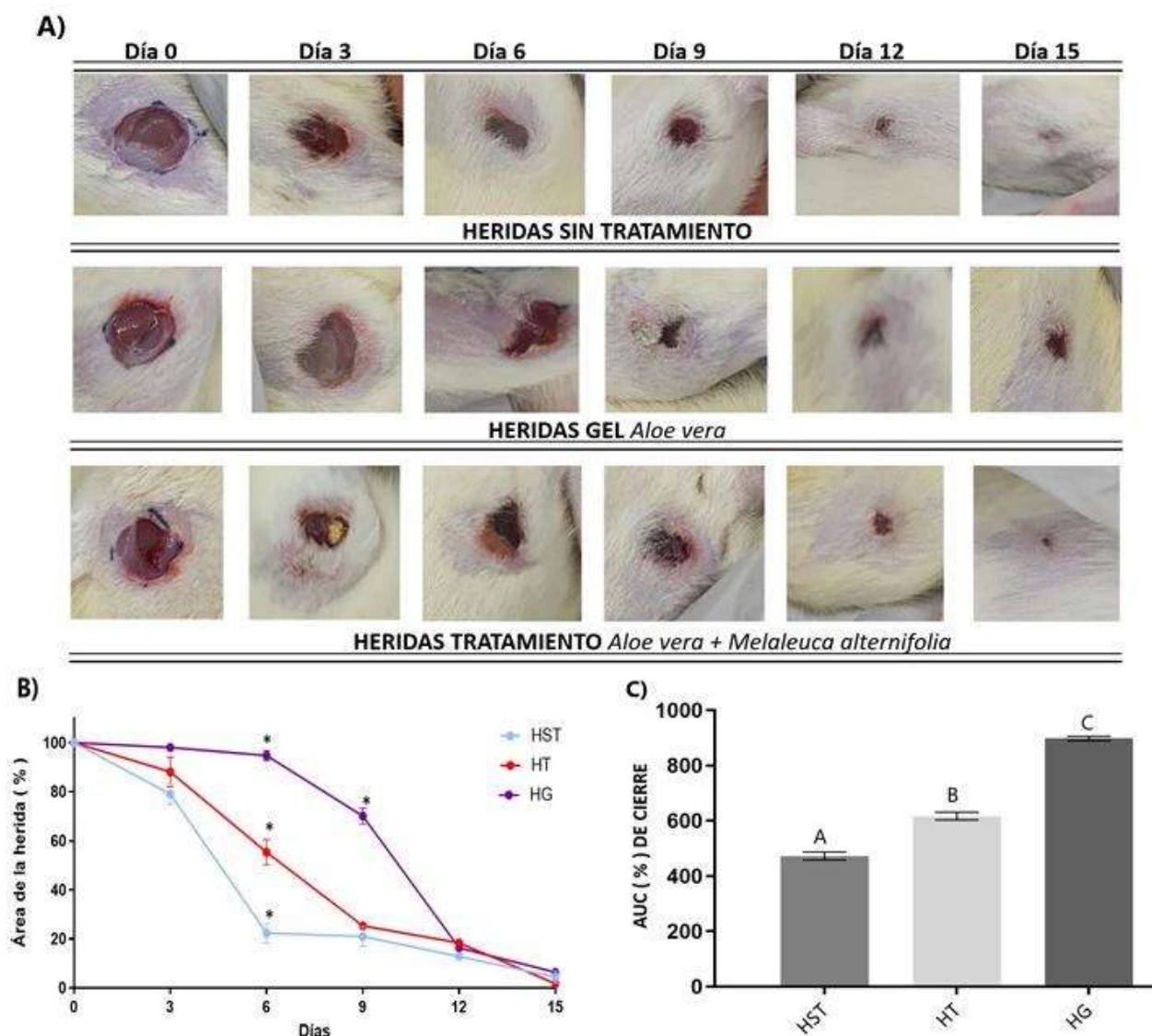


Fig. 13 (A) Fotografías representativas que muestran el cierre de heridas en ratas sanas con aplicación tópica de diferentes tratamientos el día 3, 6, 9, 12 y el día 15. (B) Efectos de diferentes tratamientos sobre el porcentaje de cierre de heridas en diferentes días en ratas (contracción de la herida (%)). Los valores se dan como media $\pm$ EE (n = 6). El * indica una $p < 0.05$, entre grupos. Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. (C) Área bajo la curva del análisis estadístico.

PROGRESO DEL CIERRE DE HERIDA EN RATAS DIABÉTICAS

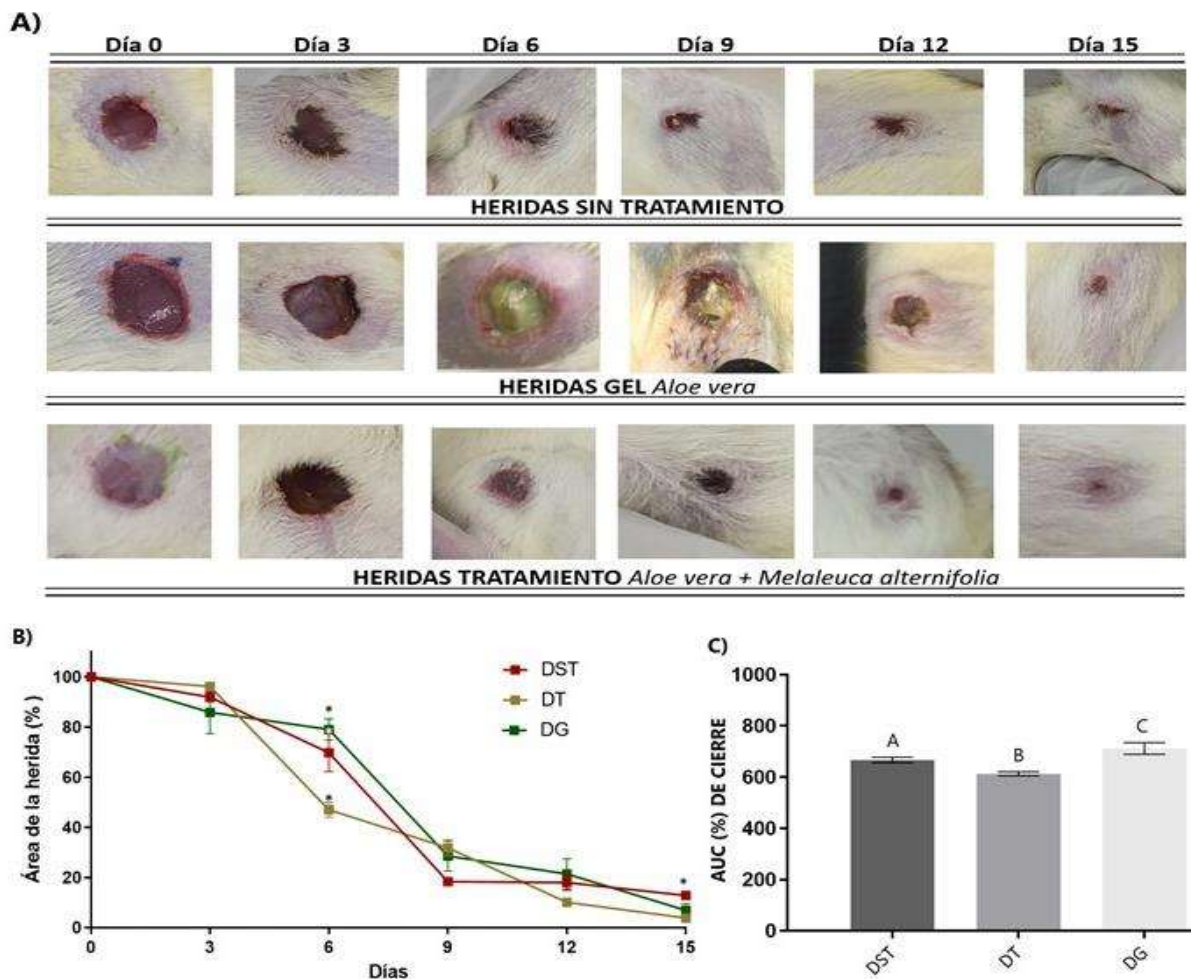


Fig. 14 (A) Fotografías representativas que muestran el cierre de heridas en ratas diabéticas con aplicación tópica de diferentes tratamientos el día 3, 6, 9, 12 y el día 15. (B) Efectos de diferentes tratamientos sobre el porcentaje de cierre de heridas en diferentes días en ratas (contracción de la herida (%)). Los valores se dan como media $\pm$ EE (n = 6). El * indica $p < 0.05$, entre grupos. Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. (C) Área bajo la curva del análisis estadístico.

6.2 Efecto del gel de *A. vera* adicionado con aceite esencial de *M. alternifolia* sobre la tensión muscular y el tiempo a la fatiga.

Para determinar el efecto del gel de *A. vera* adicionado con aceite esencial de *M. alternifolia* sobre la tensión y fatiga en músculo esquelético con heridas crónicas inducidas en ratas diabéticas, se tomó de acuerdo a concentraciones previamente reportadas en la literatura (Cameron *et al.* 1990). Se observa en la gráfica (Fig. 15) en gris la tensión máxima, en las barras se muestra la tensión del grupo C: control, D: diabéticas, HST: heridas sin tratamiento, DST: diabéticas sin tratamiento, HT: heridas tratamiento, DT: diabéticas tratamiento, HG: heridas solo gel, DG: diabéticas solo gel. En presencia tópica del gel adicionado con aceite esencial de *M. alternifolia* en los grupos diabéticos la tensión se recupera en su totalidad con respecto a la tensión de los grupos diabéticos y diabéticos sin ningún tratamiento. De igual forma, sucede con los grupos diabéticos en los que se manejó exclusivamente con gel de *A. vera*, hubo una recuperación en relación a los grupos diabéticos y diabéticos sin tratamiento.

En el caso de los grupos normoglucémicos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En negro, se muestra el efecto del gel de *A. vera* adicionado con aceite esencial de *M. alternifolia* sobre la tensión total. En este caso, la tensión se ve disminuida en el grupo normoglucémico tratado con *M. alternifolia* al 4 % en comparación al control, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa a diferencia del grupo herido sin tratamiento y herido gel *A. vera* que si muestra una disminución significativa en su tensión total con respecto al control. En el caso de los grupos diabéticos podemos observar un aumento estadísticamente significativo en la tensión total del grupo tratado con gel *Aloe* adicionado aceite esencial de *M. alternifolia* al 4 % y el grupo tratado con gel *A. vera* en comparación a los grupos diabéticos y diabéticos con tratamiento. Referente al tiempo que tardó en fatigarse el músculo EDL en los distintos grupos se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa en los grupos diabéticos

y los grupos diabéticos heridos sin tratamiento con respecto al grupo control, indicando la evidente fatiga muscular que sufre el músculo propia de la patología crónica degenerativa, sin embargo se puede observar la tendencia a una mayor resistencia en los grupos manejados con gel *A. vera* adicionado con *M. alternifolia* sugiriendo la intervención del activo en la actividad metabólica involucrada en la fatiga muscular.

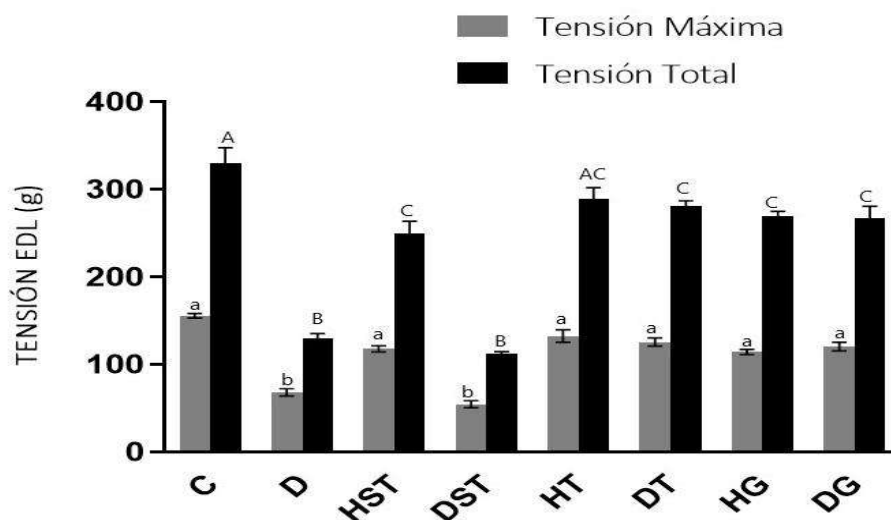


Figura 15. Efecto del aceite esencial de *M. alternifolia* adicionado al gel de *A. vera* sobre la tensión de músculo esquelético inducido a úlceras diabéticas en rata. En gris, la tensión al pico (fuerza desarrollada al punto máximo de tensión). En negro, la tensión total (Toda la fuerza desarrollada durante la contracción, incluyendo la relajación). ($p \geq 0.05$; $n=6$).

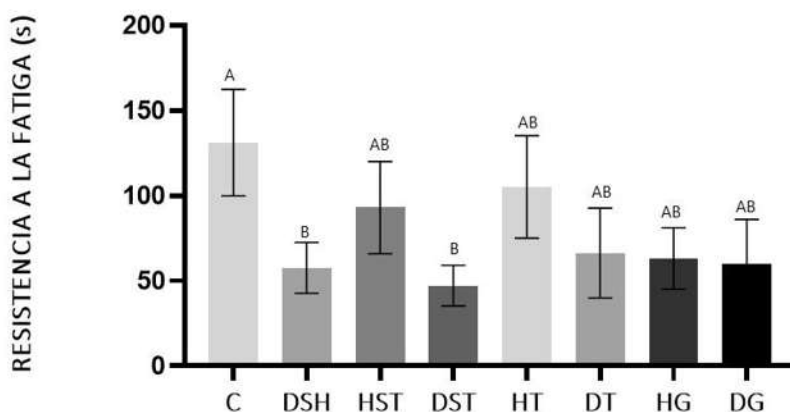


Figura 16. Efecto del aceite esencial de *M. alternifolia* en conjunto con gel de *A. vera* sobre la resistencia a la fatiga del músculo esquelético inducido a úlceras diabéticas en rata. La gráfica muestra el tiempo de fatiga en segundos (s) del músculo EDL de los modelos de cada grupo de C: control, D: diabéticas, HST: heridas sin tratamiento, DST: diabéticas sin tratamiento, HT: heridas tratamiento, DT: diabéticas tratamiento, HG: heridas gel, DG: diabéticas gel. Los datos son expresados como media $\pm$ EE (n = 6). $P \geq 0.05$.

6.3 Efecto del gel de *Aloe vera* adicionado con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* sobre los niveles de glutatión como marcador de estrés oxidante

El terpenoil-4-ol presente en el aceite esencial de *M. alternifolia*, posee fuertes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, convirtiéndolo en una molécula única para la cicatrización de heridas en diabéticos. En el presente estudio sobre ratas diabéticas, en comparación con los grupos de control y tratados con gel excipiente, en aplicación tópica, el aceite esencial de *M. alternifolia* presentó un efecto sobre la aceleración en la cicatrización de heridas con marcada síntesis de colágeno y capa epitelial completamente regenerada. Esto fue debido a la disminución de las unidades arbitrarias de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Fig. 17), con un aumento concomitante

de la expresión de enzimas antioxidantes GPx (Fig. 18), en el sitio de la herida en ratas diabéticas. Mostrando que el nivel de GSH se elevó significativamente en el tejido de granulación de la herida del grupo tratamiento *M. alternifolia* al 4 % del 27.05 % mostrando diferencias significativas en comparación con el grupo diabético. Sin embargo, no se observaron aumentos significativos en el nivel de GSH en el grupo diabético tratamiento *M. alternifolia* (8.03 % por debajo) en comparación con el grupo diabético herido sin tratamiento y ni en comparación con el grupo diabético excipiente donde mostro ser 4.05 % mayor. Cabe destacar que el nivel de GSH en el grupo diabético tratado con aceite esencial de *M. alternifolia* al 4 % tuvo un aumento significativo del 25.08 % en comparación con el grupo normoglucémico tratado con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 4 % (Fig. 18 A.)

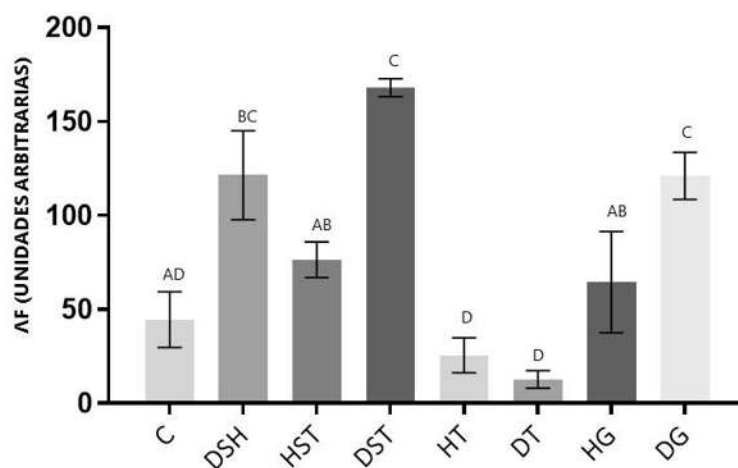


Figura 17. Especies reactivas de oxígeno en el tejido de curación de las ratas de C: control, D: diabéticas, HST: heridas sin tratamiento, DST: diabéticas sin tratamiento, HT: heridas tratamiento, DT: diabéticas tratamiento, HG: heridas gel *A. vera*, DG: diabéticas gel *A. vera*. Los datos son expresados como media $\pm$ EE (n = 6). $P \geq 0.05$.

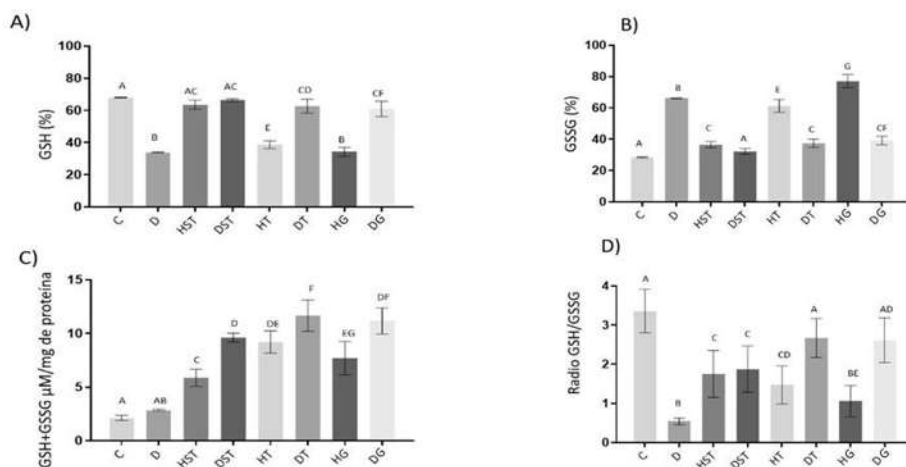


Figura 18. Niveles de enzima GPx en el tejido de cicatrización de las ratas de C: control, D: diabéticas, HST: heridas sin tratamiento, DST: diabéticas sin tratamiento, HT: heridas tratamiento, DT: diabéticas tratamiento, HG: heridas gel *A. vera*, DG: diabéticas gel *A. vera*. A) GSH: niveles de glutatión reducido B) GSSG: niveles de glutatión oxidado C) GSH+GSSG: glutatión total D) GSH/GSSG: Radio. Los datos son expresados como media $\pm$ EE (n = 6). $P \geq 0.05$.

7 DISCUSIÓN

Parte fundamental de la presente investigación es generar el conocimiento para sugerir posibles tratamientos multidisciplinarios al paciente con DM y sus complicaciones; observando que un abordaje de este tipo, bien estructurado, reduce de manera considerable el desarrollo y el progreso de complicaciones como las úlceras por pie diabético o úlceras diabéticas, mejorando la calidad de vida de los pacientes.

El pie diabético es una complicación muy frecuente en los pacientes con DM, presentándose manifestaciones clínicas como úlceras, infecciones y necrosis que pueden llegar a la amputación; lo que hace a este padecimiento un gran reto financiero para las instituciones de salud que conlleva una gran carga psicosocial para los pacientes que lo presentan, afectando su vida diaria por disminución en la movilidad, malestar general y una afectación en su productividad laboral, hasta un aislamiento en el entorno social; motivo por el cual, fue de interés realizar un pronto y atinado tratamiento con bases científicas en los pacientes, dando seguimiento a los parámetros internacionales ya establecidos para el diagnóstico de DM y las úlceras por pie diabético.

Es por ello, que en el presente estudio se investigó el potencial de curación de heridas crónicas con aceite esencial de *M. alternifolia* en conjunto con el *A. vera* para determinar su potencial de curación de heridas crónicas diabéticas. Se observaron y registraron las etapas en los procesos de cicatrización de heridas (inflamación, proliferación y remodelación) dentro de los diferentes grupos en los días 3, 6, 9, 12 y 15 del experimento. La cicatrización de heridas, el daño en la tensión y fatiga muscular, así como el estrés oxidante se evaluó utilizando marcadores antioxidantes, niveles reducidos en la relación GSH/GSSG y la generación de especies reactivas de oxígeno.

En los resultados de los análisis realizados en esta investigación con relación al estrés oxidante, se observó que los niveles de GHS en los grupos heridos, tanto sanos como diabéticos, que no llevaron ningún tratamiento, no fueron estadísticamente significativos en comparación con el grupo control. Sin embargo, se observó un aumento por arriba del 40% en los grupos heridos diabéticos sin tratamientos en comparación de los grupos diabéticos a los que no se les indujo una herida, con una disminución concomitante de los niveles de GSSG. Este comportamiento se observó a la inversa en los grupos tratados con *M. alternifolia* y los tratados exclusivamente con gel de *A. vera*, donde se observa una disminución de GHS por debajo del 20%, aumentando los niveles de GSSG en comparación con el grupo control. Contrario a lo que reporta Labib y cols. (2019), ya que ellos exponen que en los grupos tratados con *M. alternifolia*, hubo mayor producción de glutatión reducido.

En los resultados de los presentes análisis se observó que la tensión máxima en ratas inducidas con diabetes es menor de manera estadísticamente significativa en comparación con las ratas sanas y los grupos diabéticos que llevaron un tratamiento, con lo que se demostró que la patología afectó la fuerza máxima en el músculo EDL. Al igual que Cameron y cols. (1990), quienes realizaron una comparativa en músculo EDL respecto a la tensión y fuerza muscular en grupos de ratas diabéticas contra ratas sanas, donde si bien no se mostraron diferencias significativas, si se observó una tendencia a disminuir la fuerza en la contracción muscular en ratas con diabetes crónica. Avalando los resultados obtenidos en la experimentación, se sugiere que la patología afecta en la fuerza muscular, aunque al generar una herida en el músculo, se incrementa la tensión.

En los resultados de los tiempos de resistencia a la fatiga se observó una disminución significativa en los tiempos de los grupos diabéticos y diabéticos sin tratamiento, sin observarse diferencias entre el grupo control y el resto de los grupos, resultados que concuerdan con lo reportado por Bergova y cols. (2005), quienes

observaron menores tiempos de resistencia en los grupos que presentaban la patología, demostraron que ésta afecta significativamente los tiempos de fatiga.

El aceite esencial de *M. alternifolia* ha mostrado amplias aplicaciones en dermatología, tratando eficazmente múltiples enfermedades e infecciones de la piel. Actualmente se está incorporando en una gran cantidad de productos para el cuidado de la piel debido a sus propiedades antimicrobianas, principalmente debido al toterpinen-4-ol, su componente principal. Varios informes mostraron que las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas del aceite esencial de *M. alternifolia* contribuyen a su potencial de curación de heridas. Con base en estos hallazgos, se sugiere que el potencial antiinflamatorio y antioxidante del aceite esencial de *M. alternifolia* al 4 %, fue responsable de la aceleración de la cicatrización de heridas en ratas diabéticas.

En el caso de los grupos con diabetes, se observó en los grupos sin tratamiento una cinética de cierre continua al igual que en los modelos que no fueron inducidos con la patología, ni fueron tratados, sin embargo, en estos grupos no hubo un cierre total de la herida. En los grupos tratados con gel de *A. vera*, la cinética de cierre fue mas lenta y fueron mas propensos a infecciones en comparación con los grupos tratados con *M. alternifolia*, quienes tuvieron una disminución significativa en la humedad de las heridas, provocando la estimulación de la cicatrización por segunda intención, ya que la granulación ayudó a la protección de la herida hasta el cierre total de ésta. Con estos resultados, se determinó la eficacia del aceite esencial de *M. alternifolia* en la estimulación granular, inhibición bacteriana y disminución en la inflamación, que además fueron consistentes con los reportados por Labib y cols. (2019) sobre la eficacia del aceite esencial de *M. alternifolia*.

Según lo indicado por la Organización Internacional de Normalización (ISO 4730), el aceite esencial comercial de *M. alternifolia* debe tener una composición

mínima del 30 % de terpinen-4-ol, mientras que el nivel de 1,8-cineol no debe exceder el 15 % para mantener la propiedad antiséptica. La composición química del aceite esencial de *M. alternifolia* utilizado en este estudio cumplió con la norma ISO 4730, donde el terpinen-4-ol representó el 40.29 % de la composición total del aceite, mientras que el 1,8-cineol representó solo el 2.7 %.

8 CONCLUSIÓN

La incorporación del aceite esencial de *M. alternifolia* a una base gel, como el de *A. vera*, como vehículo para los tratamientos para ulceraciones diabéticas, promueve de manera eficiente las diferentes etapas de curación y cicatrización, así como una mejoría en la tensión muscular y ayuda a la resistencia a la fatiga. El efecto antioxidante sobre el tejido muscular en el área de la herida también fue importante para la curación de la herida.

En relación con los grupos a los que no se les indujo la patología se pudo observar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control, sugiriendo que los activos del gel de *A. vera* en conjunto con los activos del aceite esencial de *M. alternifolia* no influyeron sobre los modelos sanos, aún con heridas crónicas inducidas.

9 PERSPECTIVAS

- ξ A corto plazo llevar a cabo las pruebas confirmatorias crecimiento-inhibición de *Staphylococcus aureus* en las heridas inducidas y músculo de conservación criogénica. Así como el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, así como la eficacia de los mismos.
- ξ Análisis cromatográfico del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* utilizado para comprobación de parámetros de ficha técnica.
- ξ Realizar los análisis histológicos de los músculos heridos.
- ξ Realizar análisis del efecto del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* sobre ulceraciones diabéticas con un excipiente distinto teniendo como alternativa el mucílago de nopal (*Opuntia ficus-indian*).
- ξ Realizar la síntesis de ADNc analizar la inhibición de mediadores inflamatorios provocada por la producción inducida por lipopolisacáridos del factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1 β e IL-10 y la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9). Donde se ha demostrado, es a causa de la participación del terpinen-4-ol.

10 REFERENCIAS

Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008 Jan;88(1):287-332. doi: 10.1152/physrev.00015.2007. PMID: 18195089.

Alleman CJ, Westerhout KY, Hensen M, Chambers C, Stoker M, Long S, van Nooten FE. Humanistic and economic burden of painful diabetic peripheral neuropathy in Europe: A review of the literature. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015 Aug;109(2):215-25. doi: 10.1016/j.diabres.2015.04.031. Epub 2015 May 6. PMID: 26008721.

American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2020 Jan; 43 (Supplement1): S98S110. <https://doi.org/10.2337/dc20-S009>

American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations 2000. Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23 (Supl 1): 55.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):787-91. doi: 10.4049/jimmunol.0901363. Epub 2009 Jul 1. PMID: 19570822; PMCID: PMC2824855.

Brophy, J. J., N. W. Davies, I. A. Southwell, I. A. Stiff, and L. R. Williams. 1989. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *J. Agric. Food Chem.* 37:1330–1335.

Budovsky A, Yarmolinsky L, Ben-Shabat S. Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair Regen.* 2015 Mar-Apr;23(2):171-83. doi: 10.1111/wrr.12274. PMID: 25703533.

Calderón-Salinas JV, Muñoz-Reyes EG, Guerrero-Romero JF, Rodríguez-Morán M, Bracho-Riquelme RL, Carrera-Gracia MA, Quintanar-Escorza MA. Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem.* 2011 Nov; 357(1-2):171-9. doi: 10.1007/s11010-011-0887-1. Epub 2011 May 28. PMID: 21625956.

Cameron NE, Cotter MA, Robertson S. Changes in skeletal muscle contractile properties in streptozocin-induced diabetic rats and role of polyol pathway and hypoinsulinemia. *Diabetes.* 1990 Apr;39(4):460-5. doi: 10.2337/diab.39.4.460. PMID: 2108070.

Cano Pérez JF, Tomás Santos P, Grupo Gedaps. Diabetes mellitus. En: Martín Zurro, Cano Pérez JF, editor. Atención primaria (4ª ed.). Barcelona: Harcourt Brace de España, S.A., 1999; 785-841.

Centers for Disease Control. Stellefson M, Dipnarine K, Stopka C. The Chronic Care Model and Diabetes Management in US Primary Care Settings: A Systematic Review. *Prev Chronic Dis* 2013;10:120180. DOI: <http://dx.doi.org/10.5888/pcd10.120180>

Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol*. 2001 Sep;91(3):492-7. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01406.x. PMID: 11556915.

Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Ibáñez-Hernández MA, Pascoe-Lira D, Guzmán-Greenfel AM, Kumate-Rodríguez J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica [Molecular aspects of chronic hyperglycemia-induced tissue damage]. *Gac Med Mex*. 2004 Jul-Aug;140(4):437-47. Spanish. PMID: 15456154.

Dorantes Cuéllar, Alicia Yolanda, Martínez Sibaja, Cristina, and Ulloa Aguirre, Alfredo, eds. *Endocrinología clínica de Dorantes y Martínez* (5ª ed.). México, D.F., MÉXICO: Editorial El Manual Moderno, 2016.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018. Diabetes en la población de 20 años o más años. Porcentaje de la población de 20 años y más con diagnóstico médico previo de diabetes, por entidad federativa 2018.

Fritschi C, Quinn L. Fatigue in patients with diabetes: a review. *J Psychosom Res*. 2010 Jul;69(1):33-41. doi: 10.1016/j.jpsychores.2010.01.021. Epub 2010 Mar 23. PMID: 20630261; PMCID: PMC2905388.

Gibson G W. Enfermedad vascular periférica. En: Lebovitz HE, editor. *Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones*. American Diabetes Association (3ª ed.). Barcelona: Medical Trends, S.L., 1998; 360-364.

Grupo de Estudio de la Diabetes en Atención Primaria de Salud. *Guía para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en la atención primaria* (3.ª ed.). Madrid: Ediciones Harcourt, S.A., 1999.

Gutiérrez-Gutiérrez, G., & Gutiérrez-Rivas, E Neuropatía diabética. *Dolor*. 2009; 24(1), 41–50.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and

Enterococcus faecalis. Int J Antimicrob Agents. 2008 Aug;32(2):170-3. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.03.013. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18571379.

Hernández, J. C., Emiliano, M., Puig, L., García, P. H., Marcel, E. a A., & Quesada, M. Y. Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. Revista Mexicana de Patología Clínica, 2011; 58: 102–107. <http://www.epo.cdc.gov/wonder/prevgid/p0000063/entire.htm>.

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. Diabetes Care. 2006 Jun;29(6):1420-32. doi: 10.2337/dc05-2096. PMID: 16732039.

International Organisation for Standardisation. ISO 4730:2004. Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland, 2004.

José Javier Mediavilla Bravo Complicaciones de la Diabetes mellitus complicaciones y tratamiento. SEMERGEN: 2001; 27: 132-145.

Juan Carlos Romero Mestre. Recientes avances en la neuropatía autonómica cardiovascular de la diabetes mellitus. Rev. Cubana Endocrinología, 1998; 9(2)(2), 149–63.

Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. Int Immunopharmacol. 2014 Jun;20(2):322-30. doi: 10.1016/j.intimp.2014.03.009. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24675438.

Kasuya A, Tokura Y. Attempts to accelerate wound healing. J Dermatol Sci. 2014 Dec;76(3):169-72. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.11.001. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25468357.

Kathleen R. Pritchett-Corning, Aurélie Girod, Gloria Avellaneda, Patricia E. Fritz, Sonja Chou y Marilyn J. Brown. 2011. Manual de signos clínicos en roedores y conejos. Charles River Laboratories 1a Edición.

Krebs, H. A. and Henseleit, K. (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper in Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie, 210, 33-66.

Labib RM, Ayoub IM, Michel HE, Mehanny M, Kamil V, Hany M, Magdy M, Moataz A, Maged B, Mohamed A. Appraisal on the wound healing potential of Melaleuca alternifolia and Rosmarinus officinalis L. essential oil-loaded chitosan topical preparations. PLoS One. 2019 Sep 16;14(9):e0219561. doi: 10.1371/journal.pone.0219561. PMID: 31525200; PMCID: PMC6746351.

Likidlilid A, Patchanans N, Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thai*. 2010 Jun;93(6):682-93. PMID: 20572373.

Martin BN, Wang C, Willette-Brown J, Herjan T, Gulen MF, Zhou H, Bulek K, Franchi L, Sato T, Alnemri ES, Narla G, Zhong XP, Thomas J, Klinman D, Fitzgerald KA, Karin M, Nuñez G, Dubyak G, Hu Y, Li X. IKK α negatively regulates ASC-dependent inflammasome activation. *Nat Commun*. 2014 Sep 30;5:4977. doi: 10.1038/ncomms5977. PMID: 25266676; PMCID: PMC4298287.

Masood N, Ahmed R, Tariq M, Ahmed Z, Masoud MS, Ali I, Asghar R, Andleeb A, Hasan A. Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. *Int J Pharm*. 2019 Mar 25;559:23-36. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.019. Epub 2019 Jan 19. PMID: 30668991.

Meltzer S, Leiter L, Daneman D, Gerstein HC, Lau D, Ludwig S, Yale JF, Zinman B, Lillie D. 1998 clinical practice guidelines for the management of diabetes in Canada. Canadian Diabetes Association. *CMAJ*. 1998;159 Suppl 8(6):S1-29. PMID: 9834731; PMCID: PMC1255890.

Mendes JJ, Leandro CI, Bonaparte DP, Pinto AL. A rat model of diabetic wound infection for the evaluation of topical antimicrobial therapies. *Comp Med*. 2012 Feb;62(1):37-48. PMID: 22330650; PMCID: PMC3276391.

Montoya-Pérez R, Saavedra-Molina A, Trujillo X, Huerta M, Andrade F, Sánchez-Pastor E, Ortiz M. Inhibition of oxygen consumption in skeletal muscle-derived mitochondria by pinacidil, diazoxide, and glibenclamide, but not by 5-hydroxydecanoate. *J Bioenerg Biomembr*. 2010 Feb;42(1):21-7. doi: 10.1007/s10863-009-9265-z. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20066482.

Morales MA, Morales JP. Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos: hacia una medicina (fitoterapia moderna y racional), basada en la evidencia científica. 2ª ed. Chile: Universidad de Chile; 2009.

Olmos PR, Niklitschek S, Olmos RI, Faúndez JI, Quezada TA, Bozinovic MA, Niklitschek IA, Acosta J, Valencia CN, Bravo FA. Bases fisiopatológicas para una clasificación de la neuropatía diabética [A new physiopathological classification of diabetic neuropathy]. *Rev Med Chil*. 2012 Dec;140(12):1593-605. Spanish. doi: 10.4067/S0034-98872012001200012. PMID: 23677234.

Ortiz-Avila O, Sámano-García CA, Calderón-Cortés E, Pérez-Hernández IH, Mejía-Zepeda R, Rodríguez-Orozco AR, Saavedra-Molina A, Cortés-Rojo C. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport

chain in rat kidney mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2013 Jun;45(3):271-87. doi: 10.1007/s10863-013-9502-3. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23443911.

Otto-Buczkowska, E., & Dryżałowski, M. Neuropathy in young diabetic patients. *Pediatrica Polska* 2016; 91: 142-148

Powlson AS, Coll AP. The treatment of diabetic foot infections. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Nov;65 Suppl 3:iii3-9. doi: 10.1093/jac/dkq299. PMID: 20876626.

Quintanar-Escorza, MA y Calderón-Salinas, JV (2009) La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB* 28(3):89-101.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159-65. doi: 10.1038/nprot.2006.378. PMID: 17406579.

Ream E, Richardson A. Fatigue: a concept analysis. *Int J Nurs Stud.* 1996 Oct;33(5):519-29. doi: 10.1016/0020-7489(96)00004-1. PMID: 8886902.

Sardari K, Kakhki EG, Mohri M. Evaluation of wound contraction and epithelialization after subcutaneous administration of TheraNekron in cows. *Comp Clin Pathol.* 2007; 16: 197–200.

Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular. Consenso de la SEACV sobre pie diabético. Valencia, 1997. Online <http://www.seacv.org/revista/ConsensoDiabets.htm>.

Srivatsan R, Das S, Gadde R, Manoj-Kumar K, Taduri S, Rao N, Ramesh B, Baharani A, Shah K, Kamireddy SC, Priyatham G, Balakumaran TA, Balakumaran SS, Kamath A, Rao A. Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications. *Arch Iran Med.* 2009 Mar;12(2):121-7. PMID: 19249880.

Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000 Aug 12;321(7258):405-12. doi: 10.1136/bmj.321.7258.405. PMID: 10938048; PMCID: PMC27454.

Stutz A, Kolbe CC, Stahl R, Horvath GL, Franklin BS, van Ray O, Brinkschulte R, Geyer M, Meissner F, Latz E. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med.* 2017 Jun 5;214(6):1725-1736. doi: 10.1084/jem.20160933. Epub 2017 May 2. PMID: 28465465; PMCID: PMC5460996.

Takayanagi R, Inoguchi T, Ohnaka K. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr.* 2011

Jan;48(1):72-7. doi: 10.3164/jcbrn.11-014FR. Epub 2010 Dec 28. PMID: 21297916; PMCID: PMC3022068.

Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2007 Jun;12(3):261-6. doi: 10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x. PMID: 17498121.

Wang L, Liu F, Jiang Y, Chai Z, Li P, Cheng Y, Jing H, Leng X. Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. *J Agric Food Chem*. 2011 Dec 14;59(23):12411-9. doi: 10.1021/jf203165k. Epub 2011 Nov 9. PMID: 22034912.

Wessely S. The epidemiology of chronic fatigue syndrome. *Epidemiol Psychiatr Soc*. 1998 Jan-Apr;7(1):10-24. doi: 10.1017/s1121189x00007089. PMID: 9658678.

Woollard AC, Tatham KC, Barker S. The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. *J Wound Care*. 2007 Jun;16(6):255-7. doi: 10.12968/jowc.2007.16.6.27064. PMID: 17722522.

World Health Organisation. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol 2. Genève. Switzerland. 2004

Yang J, Liu Z, Xiao TS. Post-translational regulation of inflammasomes. *Cell Mol Immunol*. 2017 Jan;14(1):65-79. doi: 10.1038/cmi.2016.29. Epub 2016 Jun 27. PMID: 27345727; PMCID: PMC5214939.

Yorek MA, Dunlap JA, Leeney EM. Effect of galactose and glucose levels and sorbinil treatment on myo-inositol metabolism and Na⁺-K⁺ pump activity in cultured neuroblastoma cells. *Diabetes*. 1989 Aug;38(8):996-1004. doi: 10.2337/diab.38.8.996. PMID: 2546844.

Zimmet P, M M Alberti KG, Serrano Ríos M. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados [A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results]. *Rev Esp Cardiol*. 2005 Dec;58(12):1371-6. Spanish. Erratum in: *Rev Esp Cardiol*. 2006 Feb;59(2):185. PMID: 16371194.