

EXTRACTO DE LÁTEX DE *Croton lechleri* (SANGRE DE GRADO) EN LA REGENERACIÓN DE EXTREMIDADES AMPUTADAS DE SALAMANDRAS (*Ambystoma mexicanum*)

LATEX EXTRACT OF *Croton lechleri* (GRADE BLOOD) IN THE REGENERATION OF AMPUTATED LIMBS OF SALAMANDERS (*Ambystoma mexicanum*)

Eduardo Villalobos-Pacheco ^{1,a,b}, Daisy Flores-Cortez ^{2,c}, Gretty Pizarro-Ccollcca ^{3,b}, Edwin Retamozo-Mariano ^{3,b}, Sabrina Rivera-Quispe ^{3,b}, Jonathan Rondon-Gonzales ^{3,b}, Celeste Sánchez-Pereda ^{3,b}

1. Licenciado en Obstetricia, Magister en Fisiología.
2. Médico cirujano, Magister en Farmacología.
3. Estudiantes de Farmacología
 - a. Universidad Científica del Sur
 - b. Facultad de Medicina, Universidad Privada Telesup
 - c. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos



RESUMEN

Objetivo: Demostrar el efecto del latex *Croton lechleri* (sangre de grado) en la regeneración de las extremidades amputadas de salamandras. **Material y métodos:** Estudio experimental con grupo control. Se realizó la distribución aleatoria de 8 salamandras en 2 grupos. Después de un periodo de adaptación unas de las extremidades posteriores fueron amputadas a una distancia de 0.5cm desde la base. Los animales recibieron de manera tópica tratamiento: Grupo control (n=3) 2 gotas de suero fisiológico; Grupo Croton: 2 gotas de latex de *Croton lechleri*. Los tratamientos fueron realizados cada 12 horas durante 38 días. Se realizaron mediciones de la longitud (cm) de los muñones los días 0 (basal), día 8, 13, 18, 23, 28, 33 y 38. Los grupos fueron mantenidos en acuarios bajo condiciones de alimentación estándar. **Resultados:** La longitud de las extremidades amputadas tratadas con *Croton lechleri* resultan ser estadísticamente superiores al grupo control a partir de las mediciones realizadas el día 28 en adelante (p=0.025). Al finalizar los tratamientos, el delta de la longitud de crecimiento de los miembros amputados de las salamandras controles fue 0.6 ± 0.1 mm, mientras que las tratadas con *Croton lechleri* fue 1.35 ± 0.25 cm encontrándose diferencia significativa en ambos grupos (p= 0.003). Además, se observa el crecimiento del implante distal en su 70 % de la totalidad del tamaño original. **Conclusión:** El latex de *Croton lechleri* (sangre de grado) favorece la regeneración de extremidades amputadas de salamandras.

Palabras clave: Croton lechleri, sangre de grado, regeneración

Financiamiento

Autofinanciado

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés

Proceso editorial

Recibido: 10 de Enero del 2020
Aprobado: 31 de Marzo del 2020

Correspondencia

Eduardo Villalobos
evillalobosp@hotmail.com

Cita bibliográfica

Villalobos-Pacheco E *et al.* Efecto de latex de *Croton lechleri* (sangre de grado) en la regeneración de extremidades amputadas de salamandras (*Ambystoma mexicanum*). Revista Internacional de Salud Materno Fetal. 2020; 5(1): 31 - 35.

ABSTRACT

Objective: To demonstrate the effect of *Croton lechleri* latex (sangre de grado) on the regeneration of amputated limbs of salamanders. **Material and methods:** Experimental study with group control. The random distribution of 8 salamanders in 2 groups was performed. After a period of adaptation of the hind limbs were amputated at 0.5cm from the base. The animals received topical treatment: Control group (n = 3) 2 drops of saline; Croton Group: 2 drops of *Croton lechleri* latex. The treatments were performed every 12 hours for 38 days. Measurements of the length (cm) of the stumps were days 0 (baseline), day 8, 13, 18, 23, 28, 33 and 38. The groups were kept in aquariums under standard feeding conditions. **Results:** The length of the amputated limbs treated with *Croton lechleri* detected statistically higher than the control group from the measurements made on day 28 onwards (p = 0.025). At the end of the treatments, the delta of the growth length of the amputated limbs of the controls was 0.6 ± 0.1 mm, while those treated with *Croton lechleri* was 1.35 ± 0.25 cm finding the significant difference in both groups (p = 0.003). Also, observe the growth of the distal implant at 70% of the entire original size **Conclusion:** Croton lechleri latex (blood grade) improvement the regeneration of amputated limbs of salamanders.

Keywords: Croton lechleri, sangre de grado, salamanders, regeneración

INTRODUCCIÓN

La regeneración celular es un fenómeno biológico de reemplazo homeostático de los tejidos que consiste en la restauración o reemplazo de estructuras completas u órganos cuando éstos han sido dañados o amputados, como la extremidad de algunos animales como por ejemplo los anfibios. Estas especies poseen una extraordinaria capacidad de regenerar sus extremidades, su cola y parte de su corazón después de una amputación, lo cual ha permitido emplear a este animal como modelo de experimentación y sentar las bases de la medicina regenerativa para su aplicación en tratamientos de enfermedades crónico-degenerativas o bien en amputaciones de extremidades y heridas por avulsión ¹.

El ser humano expresa solo algunos procesos regenerativos fisiológicos o ante algunas lesiones, que se manifiesten fundamentalmente en células epidérmicas, de la mucosa oral y del tracto respiratorio, las células sanguíneas, el pelo, las uñas, el tejido muscular, la piel y el tejido óseo. Si bien es cierto, la cicatrización en un proceso fisiológico normal en muchos casos se presenta algún tipo de alteración que entorpece su desarrollo en el tiempo preestablecido como normal, y se genera entonces una lesión crónica, la que representa un detenimiento o retraso en la fase de inflamación o en la fase proliferativa, incrementando la morbimortalidad de los pacientes ².

En vista que el proceso de cicatrización depende de múltiples factores tanto intrínsecos como extrínsecos, los cuales son fácilmente alterables, ha conllevado en influir terapéuticamente en la regeneración de órganos y tejidos. Entre las alternativas terapéuticas tradicionales empleadas en nuestro medio se encuentran los productos de origen vegetal. Se estima que hay hasta 1400 especies de plantas actualmente utilizadas en la medicina tradicional peruana; sin embargo, solo unos pocos han sido sometidos a una investigación científica ³.

El *Croton lechleri* (Sangre de grado) es una especie que se encuentra en la selva alta y baja en el Perú y Ecuador, debajo de 1000 msnm. En el Perú se encuentra en los departamentos de Amazonas, Cuzco, Huánuco, Loreto, Madre de Dios y San Martín. Según los estudios en etnomedicina, esta especie se usa principalmente debido a sus propiedades curativas en el tratamiento de úlceras gástricas, puerperio, amigdalitis, faringitis, tumores, anticonceptivos y otros. El uso de sangre de grado se originó en el siglo XVII, por lo que está ampliamente distribuido y se continúa empleando ³.

En un modelo de curación de heridas de primera intención en piel de ratones, Vaisberg *et al.* demostraron que *Croton lechleri* tiene efecto cicatrizante dosis-respuesta y postularon como su mecanismo de acción la migración de fibroblastos(4).

Si bien hay evidencias de su acción cicatrizante, no se ha evaluado el efecto de *Croton lechleri* en lesiones de mayor complejidad como la acción regenerativa de los tejidos amputados; por esa razón planteamos esta investigación con el propósito de demostrar el efecto de sangre de grado en la regeneración celular de las extremidades amputadas de salamandras.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio experimental, con grupo control, el cual no recibió la sustancia a evaluar. Para la asignación de las salamandras a los grupos de tratamiento se empleó un muestreo aleatorio simple.

ANIMALES

Se realizó la adquisición de 8 salamandras (especie: *Ambystoma mexicanum*, nombre común: ajolote), en un acuario certificado. Durante todo el periodo de experimentación los animales fueron mantenidos en peceras con agua de río bajo cumplimiento de ciertos parámetros fisicoquímicos adecuados. Para la ambientación de los albergues se utilizaron sustratos como grava y piedra. La dieta se realizó diariamente con Novolotl M. considerado alimento estándar para anfibios.

CROTON LECHLERI

La técnica de extracción de látex fue directamente del árbol realizando cortes circulares en el tronco, se recogió el látex en una lámina de plástico y fue guardado en un frasco estéril y rotulado hasta su empleo.

PROCEDIMIENTO

Las salamandras fueron distribuidas aleatoriamente en 2 acuarios. Después de un periodo de adaptación de una semana, los animales fueron retirados del agua y se realizó la sección transversal de una de las extremidades posteriores, empleando una tijera recta y una pinza previamente esterilizada. Los animales fueron colocados nuevamente en sus respectivos acuarios y observados por un periodo de 24 horas. Posteriormente se iniciaron los tratamientos vía tópica de la siguiente manera: Grupo control (n=3): 2 gotas de solución salina y Grupo experimental (n=5): 2 gotas de Croton lechleri 1%.

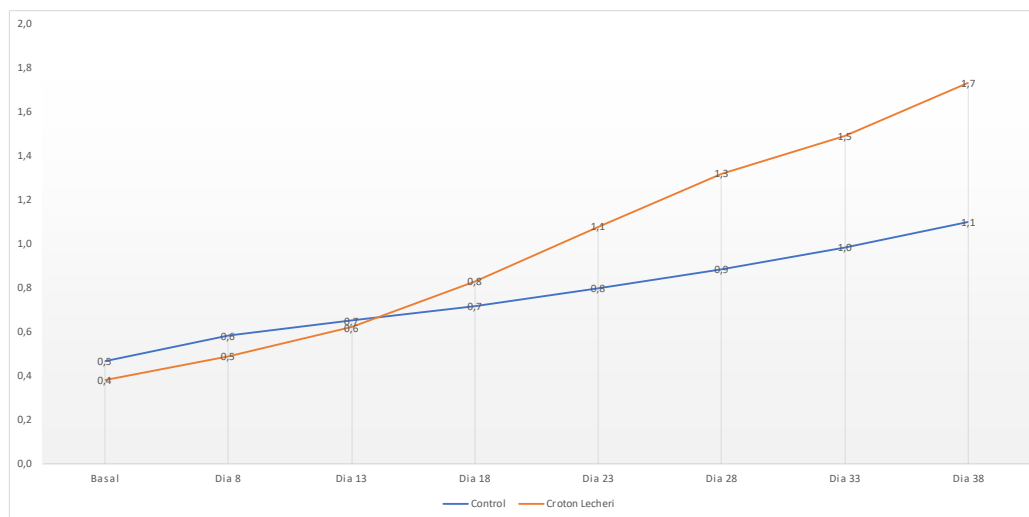


Figura 1. Evolución del crecimiento de las extremidades amputadas tratadas con *Croton lechleri*

Los tratamientos fueron continuados cada 12 horas durante 5 semanas. Con una regla milimetrada se tomaron las mediciones de las patas posteriores antes de la disección y después de la misma a los muñones desde la base hasta el extremo distal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las mediciones de las extremidades amputadas se expresaron como la media \pm la desviación estándar, se realizó la prueba t-student para comparaciones entre ambos grupos. El nivel de confianza establecido fue menor del 95%.

RESULTADOS

De acuerdo a lo observado en la Figura 1, la regeneración de las extremidades amputadas se mantuvo sin diferencias hasta el día 23. El día 28 el tamaño del muñón en el grupo control fue 0.9 cm, mientras que en el grupo tratado con *Croton lechleri* fue 1.3 cm ($p=0.024$). Para el día 33 los muñones del grupo control presentaron una medida de 1.0 cm y los del grupo Croton 1.5 cm ($p=0.025$). Finalmente, en el día 38 el tamaño de los muñones fue 1.1 cm para el grupo control y 1.7cm para el grupo Croton ($p=0.03$).

El delta de crecimiento al final del tratamiento fue 0.63 cm (IC95% 0.37-0.89) para el grupo control; sin embargo, los muñones tratados con *Croton lechleri* alcanzaron un tamaño de 1.35 cm (IC95% 1.05-1.66). (Tabla 1)

A partir del día 28 de tratamiento con *Croton lechleri*, se observa la formación del miembro nuevo con formación del sistema nervioso, cartílago, musculo, piel; sin

embargo, en la salamandra control se observa proliferación del blastema en crecimiento, aunque su crecimiento es lento, tal como se puede observar en la Figura 2.

Tabla 1. Delta de crecimiento de muñón amputado al final del tratamiento

Grupo	Delta de crecimiento (cm)*	IC95%	p valor
Control	0.63 \pm 0.10	0.37 – 0.89	0.003
<i>Croton lechleri</i>	1.35 \pm 0.25	1.05 – 1.66	

* Delta tamaño del muñón (basal – día 38) cm

En el día 35 las salamandras tratadas con *Croton lechleri* presentan el crecimiento del nuevo miembro con presencia de extremidades de implante distal con formación de huesos digitales incompleto de menor tamaño, aunque no han completado el tamaño original. Al finalizar el tratamiento (día 38) se observa el crecimiento del implante distal en un 70 % de la totalidad de su tamaño original.

DISCUSIÓN

El proceso de curación de la herida involucra varias etapas principales, que incluyen coagulación, inflamación, formación de tejido de granulación y formación de matriz, y remodelación con la consecuente regeneración del tejido lesionado. Cada uno de ellos implica procesos biológicos muy complejos. Durante la formación de nuevos tejidos, las células endoteliales proliferan y forman nuevos vasos sanguíneos lo que permite la regeneración tisular.

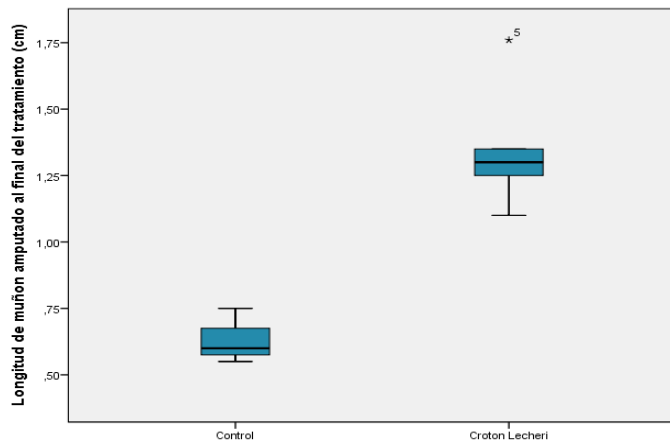


Figura 2. Longitud del muñón amputado al final del tratamiento

Al final del proceso la cicatriz adquiere una resistencia máxima del 70% comparada con el tejido sano, esto se debe a que los colágenos fibrilares forman haces fibrosos que aumentan mucho la fuerza tensil del nuevo tejido. En el ser humano la regeneración es limitada y muchas veces incompleta lo que obliga a utilizar distintas modalidades terapéuticas como membranas, el autoinjerto, el heteroinjerto con piel porcina, cadavérica, sustitutos de piel o plasma rico en plaquetas (PRP), ingeniería de tejidos; aun así, hay muchos tejidos que se regeneran muy lentamente o no se logran regenerar⁵⁻⁷. En el modelo de regeneración celular de extremidades amputadas en salamandra hemos podido observar que el *Croton lechleri*, acorta significativamente el periodo de regeneración en relación al control. A partir del día 28 de tratamiento es posible demostrar la aceleración en la formación del implante distal con formación de sistema nervioso, cartílago, músculo y piel.

Teóricamente, en las salamandras, el crecimiento de las estructuras de las extremidades es en 60 días¹; sin embargo, nosotros observamos que para el día 38 los animales tratados con *Croton lechleri* ya presentan la estructura completa, los huesos digitales, aunque de menor tamaño ya son visibles. Consideramos recomendable ampliar el tiempo de corte en la evaluación para permitir observar la curva de crecimiento hasta la regeneración total de las extremidades de salamandras.

De acuerdo a algunos estudios, el *Croton lechleri* presenta compuestos fenólicos, como el alcaloide de la taspina; que favorece la curación, fibroblastos, quimiotaxia y actividad antiinflamatoria⁴. En un ensayo clínico, se demostró que hubo una diferencia significativa en la duración media de la cicatrización de heridas entre los pacientes controles vs los que recibieron una crema a base de sangre de grado

($p=0,0001$). Los compuestos fenólicos y el alcaloide taspina, que existen en la resina de sangre de grado, fueron probablemente las principales razones de la propiedad de curación de heridas de esta especie vegetal⁸.

Otras investigaciones han demostrado que el *Croton* conserva la viabilidad celular in vitro de algunos tejidos de lenta regeneración como el tejido óseo⁹. Wang *et al.*¹⁰, evaluaron el efecto de la sangre de drago, utilizado en la medicina tradicional, para la prevención de la osteoporosis, así como en la promoción de la curación de fracturas óseas. De acuerdo a los autores, la sangre de drago o grado puede aumentar el efecto osteogénico al estimular la actividad de fosfatasa alcalina celular y afectar las cascadas de la ruta de señalización de una proteína morfogenética ósea en las células osteoblásticas, lo cual promueve la diferenciación, mineralización y formación ósea de osteoblastos.

Todo ello indica que *Croton lechleri* no solo estimula la regeneración epitelial sino también mejora la diferenciación celular, mineralización y proliferación celular de los osteoblastos, lo que explicaría la rápida regeneración observada en los muñones tratados con sangre de grado en relación al control. Es probable que la aceleración en el crecimiento tisular solo ocurra en células sanas, ya que algunos estudios in vitro señalan que en células tumorales HeLa, *Croton lechleri* ejerce efectos citotóxicos; así también se ha refrendado su efecto antitumoral en ratones con tumor HeLa y otros.¹¹⁻¹³

Así también, los componentes fenólicos de *C. lechleri* poseen propiedades antioxidantes. Los componentes fenólicos de esta especie tienen una acción de eliminación de radicales como el 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) en mayor magnitud que el ácido ascórbico. Además, permite la eliminación de radical hidroxilo y peroxilo, dos agentes notorios para la peroxidación lipídica y el daño a la membrana celular, lo que sugiere un posible beneficio en la curación y regeneración de lesiones; puesto que el estrés oxidativo es un componente clave en la cicatrización tardía de una lesión. La conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas a través de especies reactivas de oxígeno se suprime mediante la eliminación o prevención de la formación de radicales libres. En ese contexto, consideramos que las propiedades antioxidantes de *C. lechleri* pueden ayudar a promover la cicatrización de heridas y la regeneración celular^{14,15}.

El Croton lechleri es un producto natural, accesible, seguro y asequible y podría ser una buena opción alternativa para la curación de heridas y regeneración tisular; sin embargo, se requieren estudios adicionales, incrementar la muestra de estudio y evaluar el efecto de sangre de grado en tejidos humanos como vasos, cartílago, hueso, tendones para para obtener una mayor

comprensión de su posible implicación clínica y garantizar la efectividad y seguridad de su empleo.

Como conclusión, de lo observado en nuestra investigación el latex de Croton lechleri aumenta la proliferación celular y favorece la regeneración de extremidades amputadas de salamandras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pelayo R, Santa J, Velasco I. *Células troncales y medicina regenerativa* [Internet]. 1era ed. Madrid; 2010. 357.
- Guarín-Corredor C, Quiroga-Santamaría P, Landínez-Parra S. Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. *Rev Fac Med*. 2013;61(4):441-8.
- Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *Nat Prod Commun*. 2016 Mar;11(3):315-37.
- Vaisberg A, Milla M, del Carmen Planas M, Cordova J, de Agusti E, Ferreyra R, et al. Taspine is the Cicatrizant Principle in Sangre de Grado Extracted from Croton lechleri. *Planta Med*. 1989 Apr 24;55(02):140-3.
- Corrales L, Castillo A, Melo A. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de Croton lechleri frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Nova*. 2003;11(19):51-63.
- Sociedad Argentina de Dermatología. *Consenso sobre cicatrización de heridas* [Internet]. Buenos Aires; 2008.
- European Wound Management Association (EWMA). *Heridas de difícil cicatrización: hacia un abordaje integral* [Internet]. Londres: MEP; 2008.
- Namjoyan F, Kiashi F, Moosavi ZB, Saffari F, Makhmalzadeh BS. Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Tradit Complement Med*. 2016 Jan;6(1):37-40.
- Martins CM, Hamanaka EF, Hoshida TY, Sell AM, Hidalgo MM, Silveira CS, et al. Dragon's Blood Sap (Croton Lechleri) As Storage Medium For Avulsed Teeth: In Vitro Study Of Cell Viability. *Braz Dent J*. 2016 Dec;27(6):751-6.
- Wang W, Olson D, Cheng B, Guo X, Wang K. Sanguis Draconis resin stimulates osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cells. *J Ethnopharmacol*. 2012 Jun 26;142(1):168-74.
- Alonso-Castro AJ, Ortiz-Sánchez E, Domínguez F, López-Toledo G, Chávez M, Ortiz-Tello A de J, et al. Antitumor effect of Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2012 Mar 27;140(2):438-42.
- Rossi D, Guerrini A, Paganetto G, Bernacchia G, Conforti F, Statti G, et al. Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food. *Food Chem*. 2013 Aug 15;139(1-4):439-47.
- Montopoli M, Bertin R, Chen Z, Bolcato J, Caparrotta L, Frolidi G. Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2012 Dec 18;144(3):747-53.
- Pona A, Cline A, Kolli SS, Taylor SL, Feldman SR. Review of future insights of Dragon's Blood in dermatology. *Dermatol Ther*. 2019 Mar 16;32(2):e12786.
- Escobar JD, Prieto C, Pardo-Figuereza M, Lagaron JM. Dragon's Blood Sap: Storage Stability and Antioxidant Activity. *Molecules*. 2018 Oct 15;23(10):2641.