



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**DESARROLLO DE UNA PELÍCULA CON LIBERACIÓN MODIFICADA DE  
ANTIBACTERIANOS QUE FAVOREZCA UNA ADECUADA REPARACIÓN DE  
HERIDAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
*DOCTOR EN CIENCIAS***

**P R E S E N T A**

**JORGE LUNA DEL VILLAR VELASCO**

**TUTOR: DRA. LILIA GUTIÉRREZ OLVERA**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNAM

COMITÉ TUTORAL:  
**PhD HÉCTOR SUMANO LÓPEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNAM  
**DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD**  
FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# DEDICATORIAS

## **A MIS PADRES**

*Jorge Luna del Villar Rosas y Sonia Velasco Castillo, gracias por enseñarme el valor de la perseverancia y esfuerzo, por el apoyo en cada paso que he dado en mi vida, gracias a Ustedes he podido realizar éste logro en mi vida, que se los ofrezco con todo mi corazón. Me siento orgulloso de ser su hijo.*

## **A MI FAMILIA.**

*A mi hermana Sonia Luna del Villar Velasco que ha sido un ejemplo a seguir, a mi abuela María Felicitas Castillo Guzmán por el mejor legado obtenido y por su amor por la vida y a los suyos, a mis tíos y primos, por su cariño, su interés y apoyo, gracias por ser parte de mi vida.*

*A mis abuelos Oscar Velasco Jiménez, José Luna del Villar Rueda, Mercedes Rosas Hoffman, que se han adelantado en el camino de la vida.*

*A Candy, Koshka, Macumba, Kamptzia, Lorenza, Camila Y Matilda por estar siempre conmigo y darme los mejores ratos con su compañía, alegría y amor.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y Alma Mater, que me ha permitido formar en el campo del conocimiento y llegar a este nivel de estudios.*

*A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el apoyo recibido para realizar mis estudios de doctorado.*

*Al Hospital de Especialidades Veterinarias y a la sección de Cirugía de la FMVZ por darme los mejores espacios de aprendizaje.*

*Al Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ por permitirme llevar a cabo las investigaciones de este Doctorado en sus instalaciones.*

*A mi Tutora Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, Por todas las horas dedicadas a mi formación y por su participación en cada paso de esta experiencia profesional.*

*A la Dra. Josefa Bernad Bernad, por el tiempo dedicado para compartir conmigo sus conocimientos. Agradezco su comprensión, paciencia y su permiso para realizar gran parte del trabajo de investigación en las instalaciones que dignamente dirige dentro de la Facultad de Química, así como su valiosa intervención en la realización de esta tesis, además de su valiosa amistad.*

*Al Dr. Héctor Sumano López, por las aportaciones críticas en la investigación de este trabajo y su trascendental participación en mi formación profesional.*

*Al Dr. Jesús Gracia, por sus valiosas intervenciones y sugerencias que como un gran profesional e investigador y sin pretender nada menos que la honestidad y el compromiso del análisis objetivo, me permitieron organizar y aplicar mis conocimientos en la investigación objeto de mi estudio en esta tesis.*

*A la Dra. Adriana Ganem Rondero, por los comentarios atinados en cada sesión que abrieron mi mente en el contexto filosófico de la química, del trabajo disciplinado y responsable de lo que uno anhela como académico y profesional, y por su valiosísima intervención dentro del examen de candidatura.*

*A ti Dra. Norma Pérez Gallardo, a quien admiro profundamente y que siempre he tenido tu apoyo incondicional que nos ha unido en el ámbito profesional y como personas en la misma sensibilidad por la vida y por nuestra pasión en Medicina Veterinaria la "Cirugía" dándonos solidez través del tiempo y experiencias vividas que han consolidado nuestra amistad eterna.*

*A la Dra. Lorena Villafuerte García que me ha dado un apoyo personal, profesional y admiración mutua para compartir este trabajo digno y apasionante de la Cirugía.*

*A la Dra. Alicia Olivera Ayub, con quien he compartido muchos momentos y experiencias gratificantes para nuestras vidas desde el punto de vista profesional y por el honor de su amistad.*

*A la Dra. Patricia Izquierdo Uribe, por compartir ese andar en la vida profesional desde la maravillosa época del Departamento de Cirugía con inmensos recuerdos bellos.*

*Al Dr. Isidro Castro Mendoza, a quien le he aprendido mucho y admiro plenamente sobre todo por su gran calidez humana y por compartir sus conocimientos profesionales y experiencias de la vida.*

*Al Dr. Alejandro Rey Rodríguez, quien junto con la Dra. Norma Pérez Gallardo me sembraron la semilla de superación no importando las dificultades que eso conlleve, mirando siempre adelante hacia nuestras metas y escuchando la voz interior con el valor de seguir el corazón.*

*Al Dr. Ricardo Ramírez Pérez, Dr. Jesús Paredes Pérez, Dr. Luis Fernando de Juan, Dr. Arturo Olguín y Bernal, Dra. Dinorah Vargas Estrada, Dr. Fernando Viniegra Rodríguez, Dra. Alma Carrascosa y a los doctores antes mencionados. Por todos las alegrías, tristezas, preocupaciones, discusiones, platicas enriquecedoras, todas ellas importantes en nuestras vidas y en nuestra maravillosa carrera. Les agradezco haberme permitido ser su alumno, su amigo y su compañero en este camino maravilloso de la vida que nos ha permitido compartir con unos seres sensibles, que nos comunican de una manera profunda y diferente sus dolores, alegrías y necesidades, "Los Animales".*

*A todas las personas que me ayudaron desinteresadamente durante tantos muestreos y procedimientos de laboratorio, porque sin duda estos trabajos no se hubiesen logrado sin su participación. Especialmente a la Sra. Felicia Carlota González González, laboratorista del Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ.*

## **Índice**

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Introducción.....	1
Reparación de las heridas cutáneas.....	2
Tipos de reparación de las heridas.....	2
Mecanismo de la reparación de las heridas.....	3
Reparación de las heridas quirúrgicas.....	5
Contaminación en la reparación de las heridas.....	6
Películas terapéuticas.....	7
Alginatos.....	7
Propiedades físicas y químicas.....	8
Alginatos y fármacos en la reparación de las heridas.....	9
Enrofloxacina.....	10
Justificación.....	12
Hipótesis.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
Método.....	13
Elaboración de películas de alginato de sodio.....	13
Ensayos de la reparación de las heridas.....	14
Análisis de los resultados.....	15
Resultados.....	17

Discusión.....	27
Conclusión.....	28
Bibliografía.....	29
Anexo A .....	34

## *Resumen*

En este proyecto se determinó el potencial efecto cicatrizal de películas de alginato de sodio (AS) en heridas cavitadas infectadas con *Escherichia coli* o *Staphylococcus epidermidis* en ratas Wistar hembras. Para determinar el efecto del AS, se evaluó histopatológica y macroscópicamente la diseminación del proceso infeccioso, la formación de granuloma e irritación de los tejidos adyacentes. Las ratas se intervinieron bajo condiciones estándares de esterilidad y asepsia a los procedimientos quirúrgicos para la implantación de las películas y la contaminación con inóculo bacteriano. Se les realizó un seguimiento macroscópico e histopatológico de la zona afectada y se encontró que la presencia de películas evita o disminuye drásticamente, tanto la diseminación de la infección a tejidos adyacentes como la irritación, y esto ocurre aún en presencia de *Escherichia coli* o de *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados encontrados indican que la película de AS es capaz de proporcionar condiciones adecuadas para la formación de tejido de granulación sin irritación en los tejidos adyacentes. También se encontró que el AS disminuye la diseminación de la infección en heridas cavitadas y contaminadas por *E. coli*, como de *S.epidermidis* en dichas ratas.

## Summary

The potential wound healing ability of sodium alginate (SA) films was determined in cavitated rat wounds infected either with *Escherichia coli* or *Staphylococcus epidermidis*. Wound progress was evaluated macroscopically and histopathologically to assess dissemination of the induced infection through evaluation of granuloma formation and surrounding tissue irritation in female Wistar rats. All animals were surgically treated under ketamine-xylazine anesthesia under standard antiseptic standards and SA films and bacteria inoculi implanted. Both macroscopic and histopathological follow up were carried out and results indicated that the presence of SA films avoids or greatly diminishes bacteria dissemination and adjacent tissue irritation. This reaction occurs even in the presence of *Escherichia coli* or *Staphylococcus epidermidis*. Overall these results indicate that SA films are capable of providing adequate conditions to allow granulation of cavitated wounds, while avoiding adjacent tissue dissemination of the infection by *E. coli* and *S. epidermidis* in rats.

# DESARROLLO DE UNA PELÍCULA CON LIBERACIÓN MODIFICADA DE ANTIBACTERIANOS QUE FAVOREZCA UNA ADECUADA REPARACIÓN DE HERIDAS

## ***Introducción***

Una herida es una afectación en la integridad epitelial de la piel y puede ser acompañada por una disrupción de la estructura y función del tejido normal. Puede ser ocasionada por el corte preciso de un bisturí o por un daño masivo al tejido que puede ser generado por acción mecánica o química que desnaturalice las estructuras. Una herida también puede ser provocada por una contusión, hematoma, laceración o abrasión en el tejido<sup>1</sup>.

La reparación de las heridas agudas involucra distintos eventos dinámicos, complejos y sincronizados. Los procesos biológicos de cicatrización (reparación de la herida) incluyen regeneración y proliferación celular, así como producción de colágeno. En general, los mamíferos poseen capacidad regenerativa limitada, dado lo cual, la proliferación epitelial, endotelial y fibroblástica con producción de colágeno sustituye a la regeneración<sup>2</sup>. Una herida sana es aquella en la que los tejidos conectivos han sido reparados y los epitelios de la zona de la herida han sido completamente regenerados. El lugar en donde se generó la herida ha regresado a su estructura y función anatómica normal. Algunas heridas que no curan se vuelven crónicas y necesitan de tratamiento continuo. Hay evidencia en la cual se sugiere que la contaminación por bacterias (que forman *biofilms*) contribuyen a que una herida tarde en sanar o simplemente no reparar<sup>3</sup>.

## **Reparación de las heridas cutáneas**

El proceso de reparación de las heridas se clasifica en tres etapas: inflamación, proliferación y maduración. La inflamación es provocada por la adherencia inicial de las plaquetas con agregación y formación de un coágulo sobre la superficie de la herida. En la etapa de proliferación se forma tejido de granulación, hay un aumento de las células del tejido conjuntivo y se establece la regeneración de la superficie de la herida. La maduración implica el depósito de Matriz Extra Celular (MEC), el remodelado tisular y la contracción de la herida<sup>4</sup> (figura 1).

## **Tipos de reparación de las heridas**

Reparación primaria. Ocurre cuando la herida se cierra en las primeras 12-24 horas de haberse generado.

Retraso de la reparación primaria. Sucede en una herida contaminada o poco delimitada que cierra después de algunos días. Después de 3 o 4 días el reclutamiento de células fagocíticas e inflamatorias a la herida se realiza y son destruidas las bacterias contaminantes y los límites de la herida se estabilizan después de varios días. El metabolismo del colágeno no se afecta y la herida suele cerrar rápidamente.

Reparación secundaria (cicatrización por segunda intención). Esta cicatrización ocurre en una herida con gran pérdida de tejido blando, provocada por traumatismo, quemaduras graves y después de algunas intervenciones quirúrgicas. La regeneración de las células epiteliales no

puede restablecer la arquitectura original, así que hay un crecimiento de tejido de granulación en los límites de la herida, seguido de una acumulación de la matriz extracelular con una capa basal de colágeno. Estas heridas abiertas de gran grosor cierran por la contracción de la herida y la subsecuente regeneración epitelial. La cicatrización de este tipo es lenta, puede generar contracturas (principalmente en articulaciones) y disfunción de la zona afectada<sup>5</sup>.

### **Mecanismo de la reparación de las heridas**

Formación de coágulo de sangre. Además de eritrocitos atrapados, el coágulo contiene fibrina y fibronectina. La fibronectina plasmática es soluble y circula a través del torrente sanguíneo e incrementa la coagulación, la cicatrización y la fagocitosis. El coágulo sirve, entre otras cosas, como andamiaje para las células que migran y que son atraídas por los factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas liberadas en la zona<sup>6</sup>.

Formación de tejido de granulación. Los fibroblastos y las células endoteliales vasculares proliferan durante las primeras 24 a 72 horas del proceso de reparación para crear este tipo especializado de tejido. La característica histológica es la presencia de neovasos pequeños (angiogenia) y la proliferación de fibroblastos.

Los neovasos permiten la salida de proteínas plasmáticas y líquido al espacio extravascular lo que provoca edema local. A los 5-7 días, el tejido de granulación rellena la zona lesionada y la neovascularización es máxima<sup>7</sup>.

Proliferación celular y depósito de colágeno. Los neutrófilos que aparecen en las primeras 24 horas se sustituyen en gran parte por macrófagos en 48-96 horas, quienes son claves en la reparación tisular eliminando restos celulares, fibrina y otros cuerpos extraños, además de inducir la angiogenia y el depósito de MEC. La migración de los fibroblastos hacia la lesión se regula por diferentes quimiocinas. La proliferación se activa por múltiples factores de crecimiento, tales como: PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante) y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral)<sup>6</sup>.

A las 24-48 horas, brotes de células epiteliales se desplazan desde el margen de la herida (inicialmente con escasa proliferación celular), siguiendo los márgenes cortados de la dermis, y depositan componentes de la membrana basal conforme avanzan. Se fusionan en la línea media por debajo de la costra superficial, produciendo una capa epitelial continua delgada que cierra la herida. La epitelización de la herida es más lenta en cicatrices por segunda intención. La consiguiente proliferación epitelial engrosa la epidermis. Los macrófagos estimulan la producción de FGF-7 e IL-6 en los fibroblastos, que se encargan de estimular la migración y proliferación de los queratinocitos. Otros mediadores de la re-epitelización son HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y HB-EGF [factor de crecimiento tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) de unión a heparina]. La transducción de señales a través del receptor de las quimiocinas CXCR3 también estimula la re-epitelización de la piel. Al tiempo que se produce la epitelización, aumenta la cantidad de fibrillas de colágeno, que empieza a puentear la incisión<sup>5</sup>.

Formación del tejido de reparación (cicatriz). El infiltrado leucocitario, el edema y el aumento de la vascularización disminuyen durante la segunda semana. Inicia palidez por aumento de colágeno y regresión de canales vasculares.

Al final el tejido de granulación original se convierte en una cicatriz pálida avascular constituida por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tejido elástico y otros elementos de la MEC. La cicatriz al mes está constituida por tejido conjuntivo sin inflamación y recubierto de epidermis intacta.

### **Reparación de las heridas quirúrgicas**

El entendimiento del proceso de reparación de las heridas resulta esencial para el cirujano, ya que puede contribuir en estos procesos para beneficio del paciente. Se sabe que las heridas infectadas son propensas a fistulizarse y la formación de colágena es deficiente<sup>1</sup>.

Una técnica quirúrgica meticulosa resulta esencial en la prevención de infecciones posoperatorias. Una vez que se ha producido una herida, la principal función de los tejidos y sus defensas, además de restaurarla, consiste en prevenir que las bacterias se establezcan. Sin embargo, el número de bacterias que penetran en una herida, tanto en un traumatismo como en un proceso quirúrgico, pueden constituir un importante factor en el desarrollo de la *sepsis*. En las heridas cavitadas/contaminadas (mordeduras profundas, heridas por objeto punzocortante, avulsión de piel por traumatismos, tumores etc.) puede iniciar un proceso infeccioso con un mínimo de  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC) de un solo género

bacteriano por gramo de tejido. De esta manera, la reparación se ve alterada y es necesario buscar medios que favorezcan los procesos de cicatrización y limiten o eviten la infección<sup>8</sup>.

### **Contaminación en la reparación de las heridas**

Los signos de infección de una herida son los mismos que los de un proceso inflamatorio, sin embargo, puede resultar difícil distinguir entre una respuesta inflamatoria normal y otra con infección primaria. Los signos de la infección primaria son: fiebre, edema de los bordes de la herida, tirantez en las suturas, eritema y ocasionalmente, una o dos gotas de líquido seroso saliendo por la línea de sutura. La palpación de un cúmulo de líquido debajo de la piel o la induración de grandes masas musculares puede sugerir la presencia de infección que no drena hacia el exterior. Generalmente el diagnóstico de infección de una herida se hace después de un examen físico, no debe esperarse que los cultivos de laboratorio proporcionen el diagnóstico de infección<sup>1</sup>.

La clasificación de las heridas en las categorías de contaminada y sucia, con base en el riesgo de infección postraumática o posoperatoria, proporciona un panorama del riesgo de infección y la clave de pacientes que requieren de terapia antibacteriana antes de que se complique el caso. Las categorías limpia y limpia-contaminada no requieren antibióticos, a menos que exista otra condición que probablemente reduzca los mecanismos de defensa del huésped hasta un grado tal, que la infección sea posible<sup>1</sup>.

## ***Películas terapéuticas***

Los polímeros de origen natural tales como el alginato, colágeno, DNA o RNA son ampliamente utilizados en la biomedicina. Estos materiales, de origen natural, son biocompatibles, biodegradables y presentan gran similitud con los tejidos. De acuerdo con su estructura química, los polímeros de origen natural pueden ser clasificados en tres tipos, 1) polisacáridos, 2) proteínas y 3) poliésteres, siendo los polisacáridos los más utilizados en las aplicaciones biomédicas<sup>9</sup>.

Los hidrogeles son materiales hidrofílicos con la habilidad de absorber y retener grandes cantidades de agua sin disolverse. Estos pueden ser diseñados para ser químicamente estables, o para que se degraden por hidrólisis o por acción enzimática cuando entran en contacto con fluidos biológicos<sup>10</sup>. Los hidrogeles compuestos por polímeros naturales pueden ser utilizados como vehículo de fármacos, en la reparación de heridas debido a su gran contenido de agua, biocompatibilidad, flexibilidad, porosidad, suavidad y habilidad para incorporar y dosificar agentes terapéuticos<sup>11</sup>.

## **Alginatos**

El alginato es un polisacárido aniónico que puede formar hidrogel a temperatura ambiente en ausencia de solventes tóxicos. Los hidrogeles son redes de polímeros que tienen la habilidad intrínseca de aumentar, en solventes, del 10 al 20%, hasta miles de veces su peso seco en agua sin disolverse<sup>12</sup>. Dicho polisacárido es ampliamente usado y estudiado debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo costo y baja toxicidad, así como por sus propiedades para gelificar. Los alginatos son extraídos del “alga café”

(*Phaeophyceae*), de las especies *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, y *Macrocystis pyrifera*<sup>13</sup>.

#### Propiedades físicas y químicas

Su estructura química contiene bloques de residuos (1,4)- $\beta$ -D-manuronato (M) y  $\alpha$ -1-guluronato (G) (figura 2), que pueden presentar arreglos homopoliméricos (MMM o GGG) o presentar secuencias alternas (MGMG) en la cadena polimérica. El contenido de bloques M y G, su distribución en la cadena polimérica y la longitud de cada bloque determinan las propiedades fisicoquímicas<sup>13</sup>. Solo los bloques G en el alginato participan en el entrecruzamiento intermolecular con cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^{++}$ , etc.) para formar los hidrogeles. Entonces la composición, secuencia, longitud de los bloques G y el peso molecular son factores críticos que afectan las propiedades físicas del alginato y sus hidrogeles<sup>14</sup>.

El peso molecular de los alginatos de sodio comerciales va de 32000 a 400000g/mol. Los parámetros de la relación Mark-Houwink ( $[\eta]=KMv^a$ ) para el alginato de sodio, en una solución 0.1 M de NaCl a 25°C es  $K=2 \times 10^{-3}$  y  $a=0.97$ , en donde  $[\eta]$  es la viscosidad intrínseca (ml/g) y  $Mv$  es la viscosidad promedio del peso molecular (g/mol)<sup>15</sup>. La viscosidad de las soluciones de alginato se incrementa conforme disminuye el pH, y alcanza su máxima viscosidad cuando en  $\text{pH}=3-3.5$ , ya que los grupos carboxilo en el esqueleto del alginato son protonados y forman puentes de hidrógeno.

El incremento en el peso molecular de los alginatos puede mejorar las propiedades físicas cuando estos gelifican, ya que a mayor número de cadenas MG el gel presenta más elasticidad y resistencia, así como su

capacidad para absorber agua. Sin embargo una solución de alginato formada por polímeros de alto peso molecular es muy viscosa y puede dificultar su manipulación<sup>16</sup>. La modificación en el peso molecular, así como su distribución pueden controlar la viscosidad y dureza del gel formado. La elasticidad del gel formado puede ser incrementada, mientras la viscosidad se modifica ligeramente, usando una combinación de alginatos de alto y bajo peso molecular<sup>17</sup>.

#### Alginatos y fármacos en la reparación de las heridas

Las características físicas y químicas del alginato, en farmacia, lo hacen un vehículo adecuado para desempeñar un papel significativo en los productos farmacéuticos de liberación controlada. Uno de los usos más frecuentes del alginato en aplicaciones farmacéuticas es la vía oral, pero el uso de hidrogeles de alginato como depósitos para la administración de fármacos en tejido se ha incrementado. Los geles de alginato han sido investigados como suministros de una variedad de fármacos de bajo peso molecular, y son probablemente más útiles cuando un enlace primario o secundario entre el fármaco y el alginato puede ser explotado para regular la cinética de la liberación del fármaco. Las películas de alginato son típicamente de un tamaño de poro de aproximadamente 5nm<sup>18</sup>, lo que lleva a una rápida difusión de pequeñas moléculas a través del gel. Diferentes drogas pueden ser administradas con una película de alginato. El metotrexato (no interactivo con alginato) se libera rápidamente por difusión, mientras que la doxorubicina, que se une covalentemente al alginato, es liberada a través de

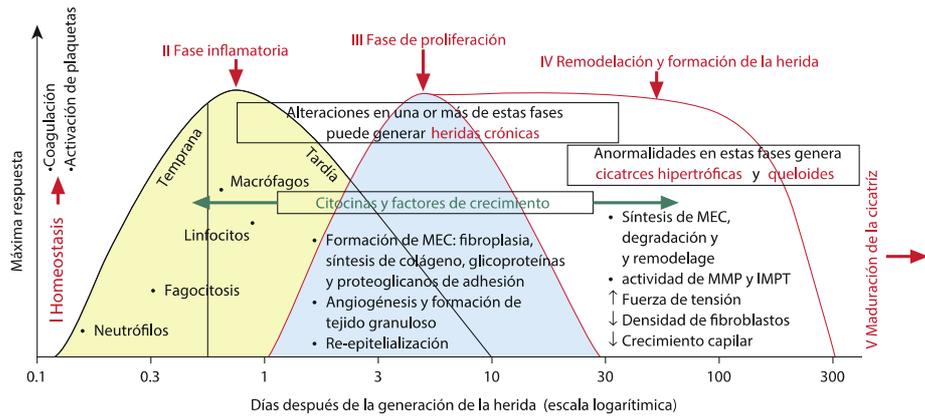
hidrólisis química. La mitoxantrona, unida con enlace iónico al alginato, sólo fue liberada después de la disociación del gel<sup>19</sup>.

### ***Enrofloxacin***

La enrofloxacin es una quinolona de tercera generación, entre sus características más importantes destacan el hecho de que actúa de manera dependiente de la concentración, ejerciendo un rápido efecto bactericida contra Gram negativas aerobias y micoplasmas, incluyendo algunas resistentes a otros antibacterianos y a quinolonas y fluoroquinolonas de primera y segunda generación<sup>20,21</sup>. Se ha encontrado que logra altas concentraciones en piel, por tanto es una de las principales opciones antibacterianas en dermatitis bacterianas principalmente por *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona* sp., además de tener buena actividad contra enterobacterias que podrían contaminar la herida v.g. *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, etc. Las fluoroquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas<sup>22</sup>.

Al igual que las demás fluoroquinolonas, la enrofloxacin actúa directamente sobre enzimas implicadas en la replicación del ADN (Topoisomerasa IV y ADN girasa). Se forma un complejo que provoca la ruptura irreparable en el ADN de lo cual se deriva su gran poder bactericida, a diferencia de las quinolonas no fluoradas actúa, tanto en la subunidad A como en la B, de la topoisomerasa II. Esta característica le confiere una actividad a la cual las bacterias tienen menos mecanismos de resistencia<sup>23</sup>.

## Fases de la cicatrización



MEC: Matriz extracelular; MMP: Metaloproteinasas; IMPT: Inhibidores de metaloproteinasas de tejido.

Adaptado de: Clark RA. In: Goldsmith LA, ed. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, 2nd edn, Vol. I. New York: Oxford University press, 1991, p 577.

Figura 1. Reparación de una herida (cicatrización)

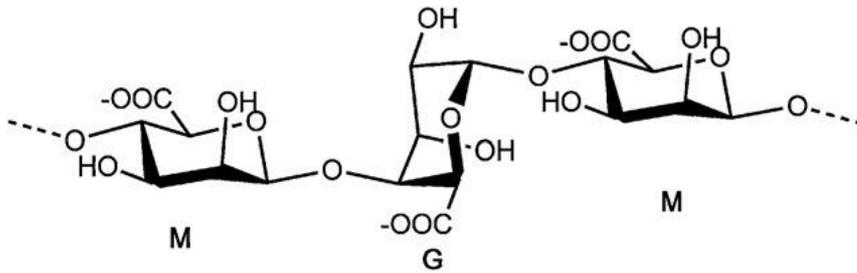


Figura 2. Representación gráfica de la estructura G y M de la molécula de alginato<sup>24</sup>.

## ***Justificación***

La generación de heridas en las intervenciones quirúrgicas es una situación necesaria para corregir o curar ciertas afecciones. Sin el cuidado adecuado de la reparación de dichas lesiones, se puede complicar aún más la afección de inicio. Por eso es necesario buscar y encontrar un tratamiento que acelere y proteja el proceso de reparación de las heridas generadas, sin que se alteren negativamente los procesos biológicos de la reparación de la herida. La utilización de películas de alginato de sodio con enrofloxacin en la reparación de heridas es una alternativa que puede ayudar en el proceso de cicatrización de dichas heridas.

## ***Hipótesis***

La película del polímero de alginato de sodio con enrofloxacin favorece la cicatrización de heridas y disminuye la infección por *E. coli* y *S. epidermidis* en ratas.

## ***Objetivo general***

Desarrollar una película de un polímero biocompatible de alginato de sodio con enrofloxacin que mejore la reparación de heridas y disminuya la diseminación de infección bacteriana.

## ***Objetivos específicos***

1. Preparar una película de biopolímero con una mezcla de alginato de sodio y enrofloxacin.
2. Crear en ratas heridas infectadas con *E. coli* y *S. epidermidis*.
3. Aplicar el biopolímero y evaluar la formación del granuloma, la irritación, así como la diseminación de la infección en las heridas.

## ***Método***

### **Elaboración de películas de alginato de sodio**

La solución de alginato de sodio (1% p/v) fue preparada solubilizando el polvo en agua destilada y etanol agitando hasta su completa disolución (Figura 3).

Para la preparación de la solución de alginato de sodio, el glicerol se utilizó en la solución al 15% (p/p) relativo al peso del polvo del alginato de sodio. La solución fue sonicada durante 15min y se desgasificó durante 12 horas. A dicha solución se le agregó (según la condición) la enrofloxacin (figura 3).

Las películas de alginato de sodio se prepararon en recipientes de silicona agregando la solución de alginato de sodio, con o sin enrofloxacin, dejando secar durante 2 días para su posterior uso.

La elección del alginato de sodio fue con base en sus características tales como: biodegradabilidad, solubilidad y origen. Las características físicas perceptibles evaluadas, definidas con base en la manipulación de la película y con enfoque al uso en medicina veterinaria, fueron:

- Uniformidad. Característica evaluada mediante descripción visual, considerado para la presentación de la película.
- Resistencia a la ruptura. Determinada con base en la facilidad de manipulación manual de la película. Esta prueba, cualitativa, es de las más importantes, tomando en cuenta el uso del sistema polimérico evaluado para el área de cirugía veterinaria. Por lo tanto, las películas deben ser resistentes a la ruptura en condiciones quirúrgicas, es decir, para que la película soporte la tensión al momento de la colocación en heridas cavadas.

- Tiempo de secado. Evaluada con el tiempo que tarda la película en secarse, durante la preparación de la misma. El criterio de elección para esta evaluación está sujeto a la mejora de la eficacia del método de elaboración, de este modo las membranas con menor tiempo requerido de sacado serán las más aptas.

El polímero elegido fue el alginato de sodio. La adición del fármaco prototipo se realizó agregándolo directamente al polímero elegido o bien, a la mezcla de polímeros disueltos. Quedando finalmente el método para la fabricación de la película seleccionada, de la forma mostrada en la figura 3.

### **Ensayos de la reparación de las heridas**

La dosis de enrofloxacin para cada rata es de 10mg/kg y el peso de cada rata fue entre 200 y 400g  $\pm$  20g. La película se dividió en 10 secciones con un peso de 60mg y una concentración de enrofloxacin de 2.7mg o bien, 67 mg y una concentración de enrofloxacin de 10mg. Cada sección de película de 2cm<sup>2</sup> se colocó en una herida quirúrgica que se realizó a cada rata en abdomen lateral. La herida quirúrgica fue de 2cm de longitud aproximadamente permitiendo colocar la película fácilmente en el tejido subcutáneo. Finalmente se suturó la herida. Las condiciones utilizadas para estudiar la efectividad del alginato de sodio con la enrofloxacin en la infección con *E. coli* y *S. epidermidis* son:

Herida infectada con la bacteria *E. coli* o *S. epidermidis*

Película de alginato de sodio con enrofloxacin en herida infectada con *E. coli* o *S. epidermidis*

Película de alginato de sodio en herida infectada con *E. coli* o *S. epidermidis*

Herida infectada con *E. coli* o *S. epidermidis*, con enrofloxacin administrada por vía intramuscular

En cada condición se analizaron tres variables cada una con dos categorías.

A) Diseminación de la bacteria (diseminado o no diseminado), en la cual se observó la herida en relación con los tejidos adyacentes y se analizó la presencia de exudado purulento, así como su infiltración a nivel subcutáneo.

B) Irritación de la herida (irritada o no irritada), se observaron los cambios a nivel inflamatorio de los tejidos *in situ* y adyacentes a la herida.

C) Formación del granuloma en la herida (granuloma o sin granuloma), la presencia del granuloma está relacionado a la efectividad para encapsular a las bacterias.

### **Análisis de los resultados**

Para el análisis de los datos obtenidos de 32 ratas por grupo, se realizó la prueba de  $X^2$ , las asociaciones que se tomaron como significativas son las que presentaron una  $p < 0.05$ , también se calculó el riesgo relativo (RR) con intervalos de confianza al 95%. Todos los resultados estadísticos se obtuvieron con el programa Graph Pad Prism Versión 6.00 para Mac, Graph Pad Software, La Joya California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Las gráficas de

mosaico se generaron en el programa R versión 3.0.2, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R core team, Viena, Austria, [www.R-project.org](http://www.R-project.org).

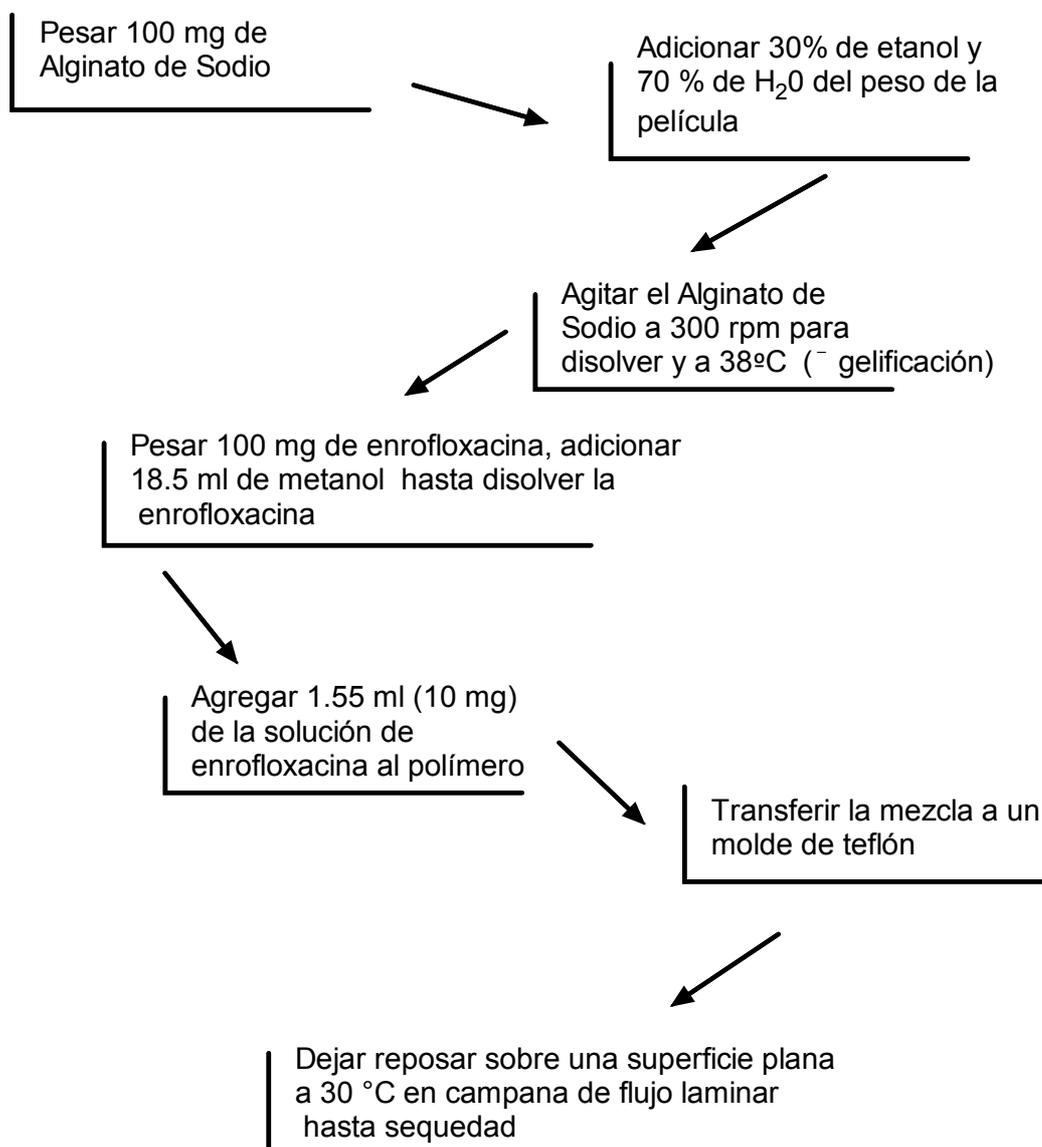


Figura 3. Preparación del alginato de sodio con enrofloxacin

## **Resultados**

La mezcla de biopolímeros de alginato de sodio fue utilizada debido a su resistencia, consistencia y solubilidad, así como por su mínima interacción con la enrofloxacin. También se aplicó este polímero por la poca reacción que puede generar en los tejidos en los seres vivos.

Para identificar la actividad cicatrizante del biopolímero y la función bactericida de la enrofloxacin. En la herida generada se aplicaron por separado dos bacterias, *E. coli* y *S. epidermidis*. Las condiciones que se utilizaron para estos ensayos fueron, ratas con la herida y el inóculo de la bacteria, ratas con la herida, el inóculo de la bacteria y el biopolímero con o sin la enrofloxacin, también se utilizó la condición de la herida con la enrofloxacin sin el biopolímero.

Las intervenciones quirúrgicas en las ratas a las cuales se les aplicaron los diferentes tratamientos se muestran en la figura 4 en donde se presenta el biopolímero de alginato de sodio con o sin enrofloxacin (A) y las ratas con la aplicación de dicho biopolímero en la herida infectada (B) o no con *E.coli* o *S. epidermidis*.



Figura 4. Aplicación del biopolímero de alginato de sodio con o sin enrofloxacin en heridas infectadas con *E. coli* o *S. epidermidis*. En A se muestran el biopolímero de alginato de sodio y B muestra la herida en la rata en la cual se le agregó el biopolímero.

Las condiciones de la herida infectada con *E. coli* y la presencia del biopolímero con y sin enrofloxacin para las variables de diseminación, presencia del granuloma e irritación de la herida, mostraron que no hay asociación entre tener la enrofloxacin y la diseminación de las bacterias, la irritación de la herida y la presencia del granuloma, es decir, la presencia de enrofloxacin no modifica ninguna de las tres variables.

Cuando el tratamiento de la herida infectada con *E. coli*, con la película y la enrofloxacin es comparada con la herida, donde solo se inoculó dicha bacteria, se observa que la película con el antibiótico tiene un efecto protector ya que disminuye la presencia de la diseminación ( $p < 0.05$ ,  $RR = 0.88$ ), aumenta la generación del granuloma ( $p < 0.05$ ,  $RR = 2$ ) y modifica la irritación ( $p < 0.05$ ). Si la condición infectada tratada con la película y el antibiótico es

comparada con la herida infectada y el antibiótico, se observa protección cuando está presente la película ( $p < 0.05$ ,  $RR = 0.64$ ), es decir, la condición que no presenta la película está asociada a presentar más individuos diseminados. La presencia de la película en la herida infectada, cuando es comparada con la herida infectada y el antibiótico, registra una asociación, en donde la protección se da cuando está presente la película ( $p < 0.05$ ,  $RR = 0.67$ ) (cuadro 1 y figuras 5, 6, 7). Cuando las heridas son infectadas con la bacteria *S. epidermidis* se observa que la presencia de la película con la enrofloxacin y el *S. epidermidis* está asociada a protección, es decir, la presencia de la bacteria sin algún tratamiento presenta una mayor diseminación e irritación ( $p < 0.05$ ,  $RR = 1.65$ ). Cuando se comparó la condición de la herida infectada, sin película, tratada con enrofloxacin soluble y la condición, en donde se tiene la presencia de la película con la enrofloxacin y la bacteria, se observa que hay un efecto protector cuando no hay presencia de la película en la formación del granuloma ( $p < 0.05$ ,  $RR = 0.5$ ). Por último cuando se carece de enrofloxacin en la diseminación de la bacteria se observa que la presencia de la película en la herida infectada esta asociada a menor diseminación de la bacteria en la herida, esto es, la sola presencia del *S. epidermidis* muestra más ratas infectadas ( $p < 0.05$ ,  $RR = 1.65$ ) (cuadro 2 y figuras 8, 9, 10).

Efecto de los diferentes tratamientos en ratas en la diseminación, la formación de granuloma y la irritación por *E. coli* en heridas

1

	Diseminación		Granuloma		Irritación	
	p	RR I. C. 95%	p	RR I. C. 95%	p	RR I. C. 95%
Película +Enrofloxacina vs + <i>E. coli</i> vs Película + <i>E. coli</i>	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-
Película +Enrofloxacina vs + <i>E. coli</i> vs <i>E. coli</i>	p<0.05	0.88 0.79-0.97	p<0.05	2 1.64-2.40	p<0.05	-
Película +Enrofloxacina vs + <i>E. coli</i> vs Enrofloxacina + <i>E. coli</i>	p<0.05	0.64 0.52-0.78	p<0.05	2 1.64-2.40	n.s.	-
Película + <i>E. coli</i> vs <i>E. coli</i>	n.s.	-	n.s.	-	p<0.05	-
Película + <i>E. coli</i> vs Enrofloxacina + <i>E. coli</i>	p<0.05	0.67 0.54-0.83	n.s.	-	n.s.	-

Efecto de los diferentes tratamientos en ratas en la diseminación, la formación de granuloma y la irritación por *S. epidermidis* en heridas

2

	Diseminación		Granuloma		Irritación	
	p	RR I. C. 95%	p	RR I. C. 95%	p	RR I. C. 95%
Película +Enrofloxacina vs + <i>S. epidermidis</i> vs Película + <i>S. epidermidis</i>	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-
Película +Enrofloxacina vs + <i>S. epidermidis</i> vs <i>S. epidermidis</i>	p<0.05	1.65 1.36-2.02	n.s.	-	p<0.05	-
Película +Enrofloxacina vs + <i>S. epidermidis</i> vs Enrofloxacina + <i>S. epidermidis</i>	n.s.	-	p<0.05	0.5 0.41-0.61	n.s.	-
Película + <i>S. epidermidis</i> vs <i>S. epidermidis</i>	p<0.05	1.65 1.36-2.02	n.s.	-	n.s.	-
Película + <i>S. epidermidis</i> vs Enrofloxacina + <i>S. epidermidis</i>	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-

Cuadro 1 y 2. Asociaciones de los diferentes tratamientos en heridas infectadas con *E. coli* (cuadro 1) y *S. epidermidis* (cuadro 2). Para cada búsqueda de asociación se utilizó la prueba de  $X^2$  y se calculó el riesgo relativo (RR) con intervalos de confianza al 95% (I.C. 95%), n.s. no significativo para dicha asociación.

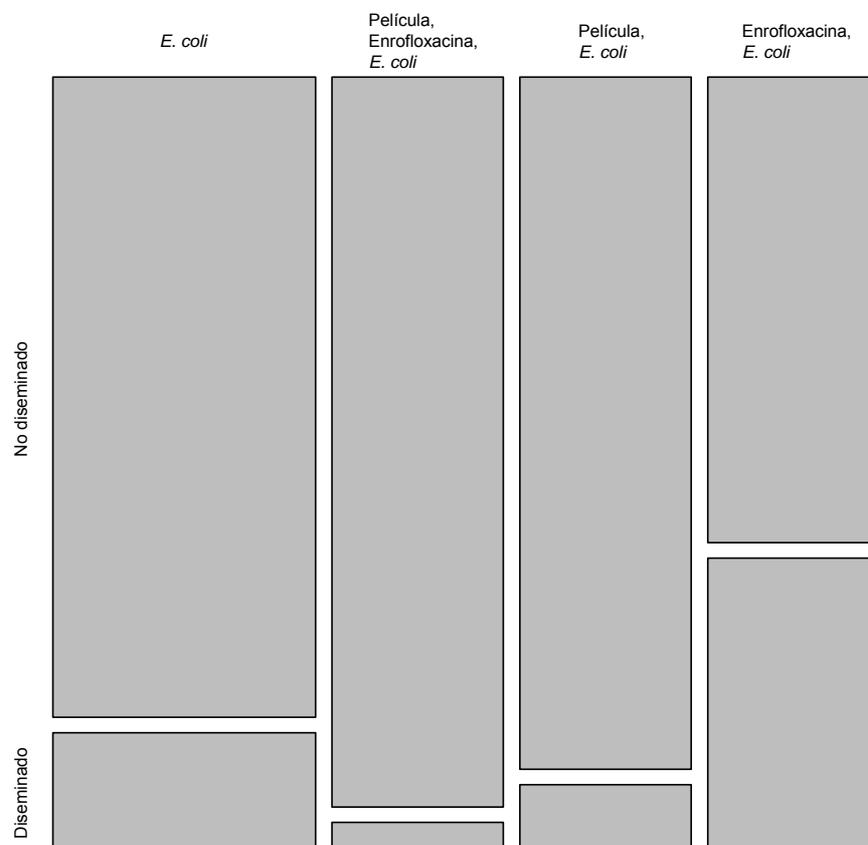


Figura 5. Diseminación de *E. coli* en heridas. Gráfica de mosaico en donde cada barra es proporcional a la frecuencia de ratas que presentan o no, diseminación de la bacteria en la herida por cada condición probada en el experimento.

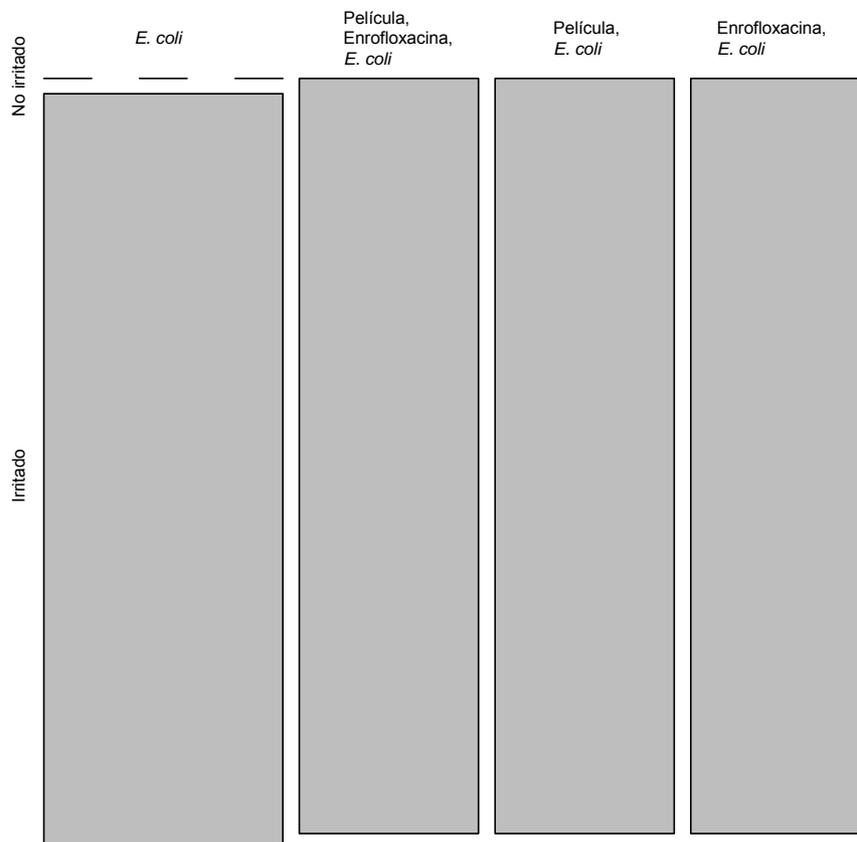


Figura 6. Niveles de irritación en heridas infectadas por *E. coli*. Gráfica de mosaico en donde cada barra es proporcional a la frecuencia de ratas para cada nivel de irritación en la herida por cada condición probada en el experimento. Los guiones indican frecuencia nula para esa condición.

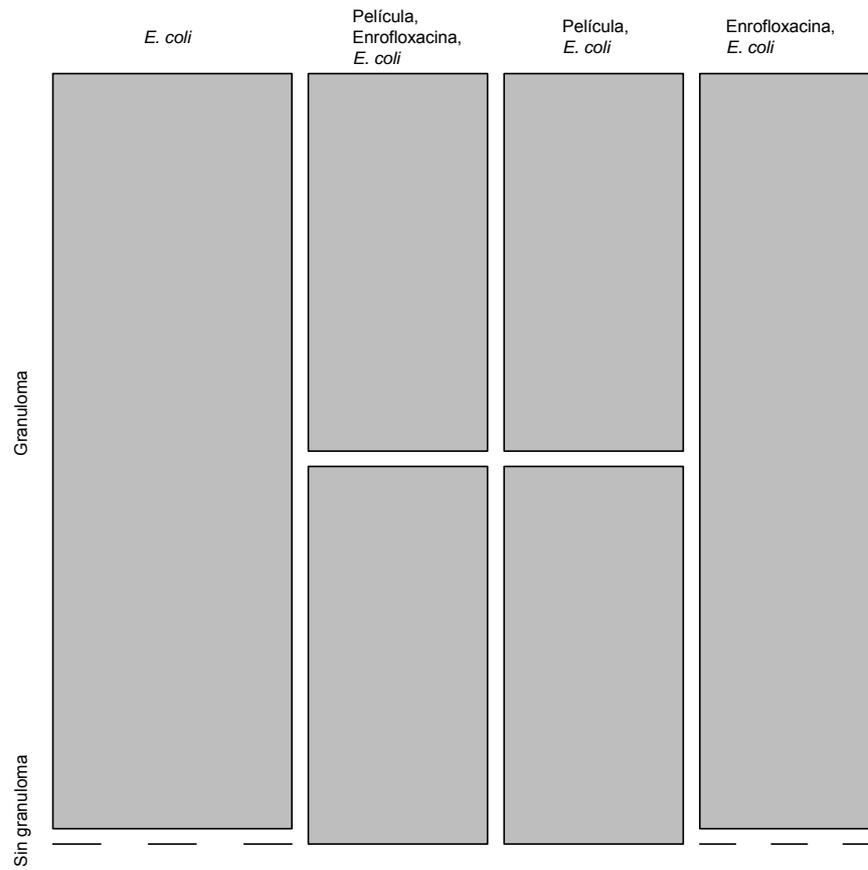


Figura 7. Presencia de granulomas en heridas infectadas por *E. coli*. Gráfica de mosaico en donde cada barra es proporcional a la frecuencia de ratas que presentan o no granulomas en la herida por cada condición probada en el experimento. Los guiones indican una frecuencia nula para esa condición.

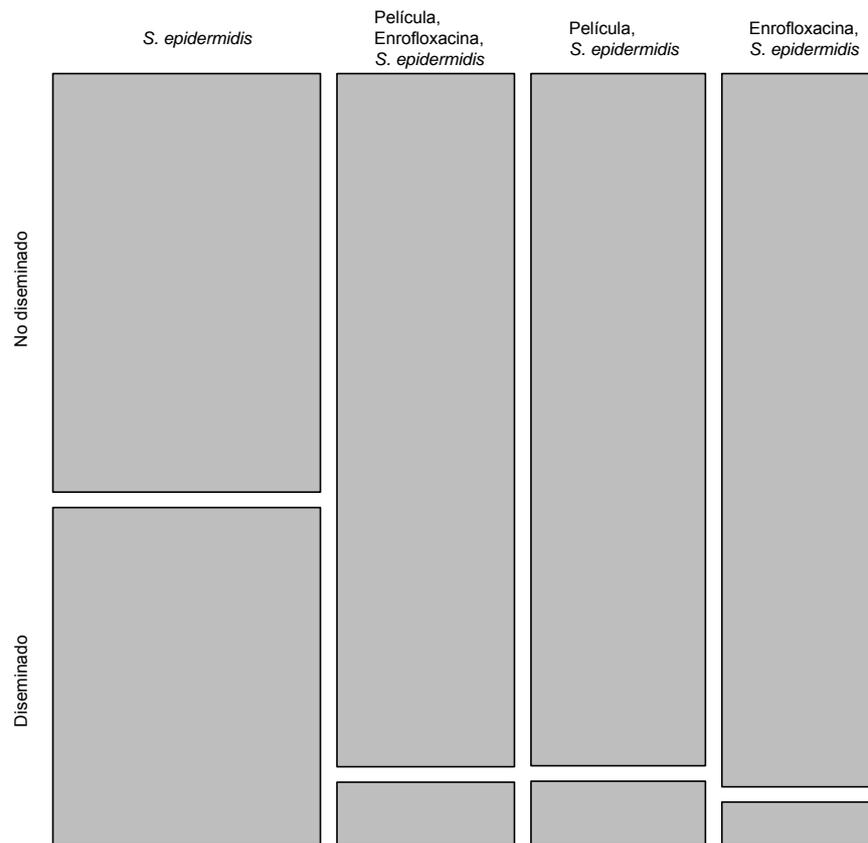


Figura 8. Diseminación de *S.epidermidis* en heridas infectadas. Gráfica de mosaico en donde cada barra es proporcional a la frecuencia de ratas que presentan o no diseminación de la bacteria en la herida por cada condición probada en el experimento.

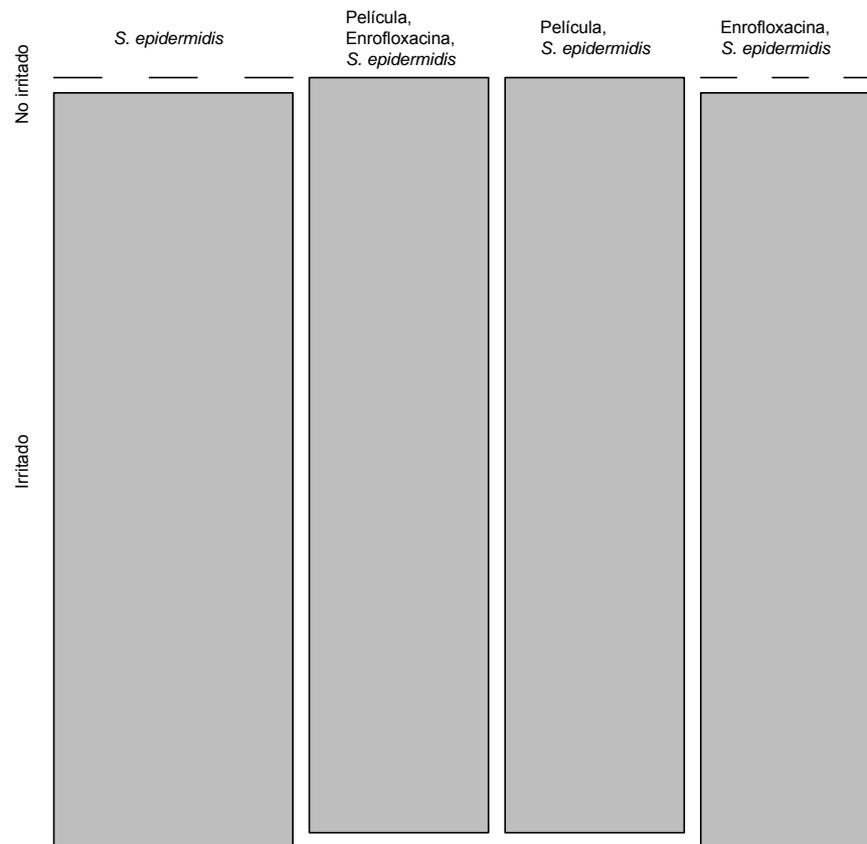


Figura 9. Grado de irritación en heridas infectadas por *S.epidermidis*. Gráfica de mosaico en donde cada barra es proporcional a la frecuencia de ratas para cada nivel de irritación en la herida por cada condición probada en el experimento. Los guiones indican una frecuencia nula para esa condición.

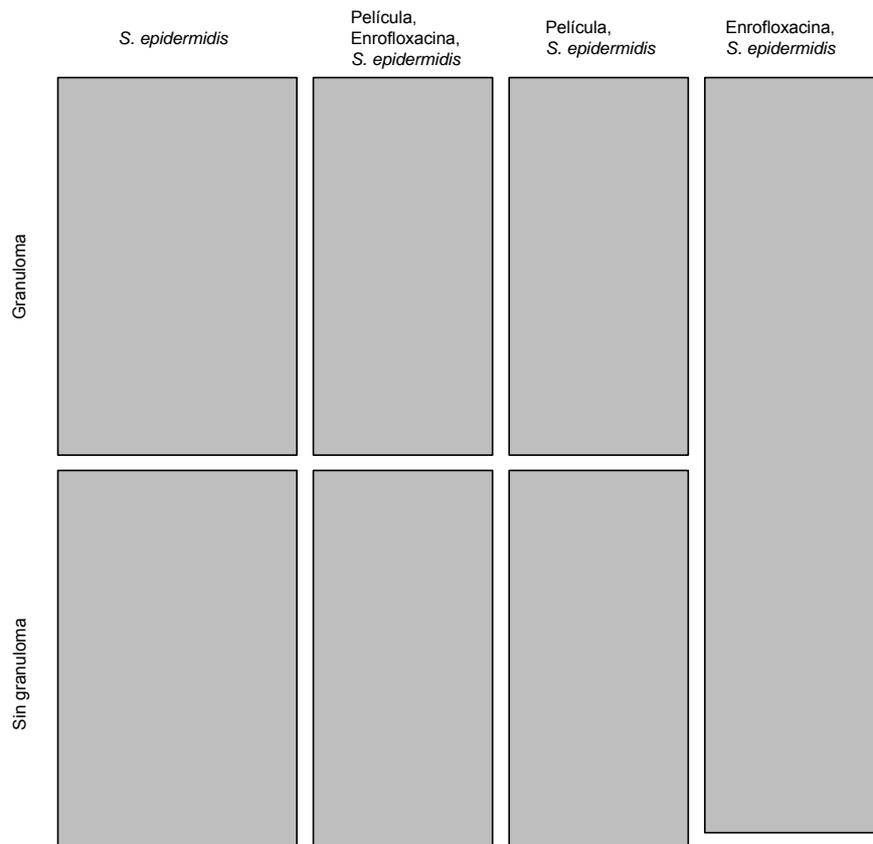


Figura 10. Formación del granuloma en heridas infectadas por *S.epidermidis*. Gráfica de mosaico en donde cada barra es proporcional a la frecuencia de ratas que presentan o no granulomas en la herida por cada condición probada en el experimento. Los guiones indican una frecuencia nula para esa condición.

## ***Discusión***

La reparación de las heridas generadas por una intervención quirúrgica es un campo en el cual está aumentando el interés y se han generado algunos avances para mejorar esta reparación, es decir, aumentar la velocidad de cicatrización, disminuir la inflamación y entre otras cosas evitar la colonización de microorganismos patogénicos como algunas bacterias<sup>25</sup>.

Muchos tipos de vendajes para la reparación y/o protección de heridas se han mostrado que son adecuados en la reducción del tiempo de reparación. La película de alginato, provee a la herida de un ambiente aislado, húmedo y óptimo para la cicatrización<sup>26</sup>.

A parte de los beneficios que proporciona la presencia de las películas de alginato en las heridas se buscó si la enrofloxacin favorece menor diseminación o infección bacteriana. Se ha demostrado que el alginato es un buen vehículo para la administración de fármacos en tejidos. Por ejemplo, se ha observado que el flurbiprofeno puede ser difundido a tejidos después de poner una película de alginato<sup>27</sup>.

En este estudio se encontró que cuando una herida infectada con *E. coli* es tratada con la película de alginato disminuye la infección y mejora el cierre de la herida, esto concuerda con otros grupos que han estudiado el papel del alginato en la reparación de heridas<sup>28,31</sup>. De manera interesante cuando la herida es tratada con la película y el antibiótico enrofloxacin hay resultados que muestran mayor mejoría, con respecto a cuándo carece de enrofloxacin; sin embargo, esta asociación no es significativa, esto no

expresa que el resultado no sea de interés, es de tomar en cuenta para seguir ampliando los resultados de este proyecto. Cuando las heridas son infectadas con la bacteria *S. epidermidis*, se observa mayor infección en las ratas sin el tratamiento a diferencia de las infectadas con *E. coli*, esto puede estar dado por la falta de eficacia del sistema inmune de la rata contra bacterias Gram positivas. En las otras condiciones se encontró que el hecho de que la película de alginato esté en la herida, es suficiente para que la herida sea reparada de forma adecuada y la diseminación de la bacteria (*S. epidermidis*) no esté presente o esté disminuida. Cuando la película funciona como vehículo para la enrofloxacin, no se observó una asociación con la disminución de la diseminación del *S. epidermidis*. Por último se pudo observar que sí la enrofloxacin es administrada sin la película cuando la infección está dada por *E. coli* (y en menor grado *S. epidermidis*), no se observa disminución de la diseminación, esto pone de manifiesto que es necesaria la administración paulatina de dicho fármaco para que pueda generar su efecto.

### **Conclusión**

La presencia de una película de alginato de sodio favorece la reparación de heridas, así como la disminución de la diseminación de bacterias como *E. coli* y *S. epidermidis*. La presencia de la enrofloxacin solo favorece la disminución de la *E. coli* en dichas heridas.

## ***Bibliografía***

1. Neuhaus K, Meuli M, Koenigs I, Schiestl C. Management of "difficult" wounds. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie*. 2013 Oct;23(5):365-74. PubMed PMID: 24008551.
2. Enoch S, Grey JE, Harding KG. ABC of wound healing. Non-surgical and drug treatments. *Bmj*. 2006 Apr 15;332(7546):900-3. PubMed PMID: 16613966. Pubmed Central PMCID: 1440619.
3. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2012 Sep-Oct;20(5):647-57. PubMed PMID: 22985037.
4. Friedman A. Wound healing: from basic science to clinical practice and beyond. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2011 Apr;10(4):427-33. PubMed PMID: 21455556.
5. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006 Jun;117(7 Suppl):12S-34S. PubMed PMID: 16799372.
6. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*. 2003 Jul;83(3):835-70. PubMed PMID: 12843410.

7. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International review of cytology*. 2007;257:143-79. PubMed PMID: 17280897.
8. Kaiser AB, Kernodle DS, Parker RA. Low-inoculum model of surgical wound infection. *The Journal of infectious diseases*. 1992 Aug;166(2):393-9. PubMed PMID: 1634811.
9. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 2008 Dec 14;60(15):1650-62. PubMed PMID: 18848591.
10. Puppi D, Mota C, Gazzarri M, Dinucci D, Gloria A, Myrzabekova M, et al. Additive manufacturing of wet-spun polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Biomedical microdevices*. 2012 Dec;14(6):1115-27. PubMed PMID: 22767245.
11. Sikareepaisan P, Suksamrarn A, Supaphol P. Electrospun gelatin fiber mats containing a herbal-Centella asiatica-extract and release characteristic of asiaticoside. *Nanotechnology*. 2008 Jan 9;19(1):015102. PubMed PMID: 21730522.
12. Thakur VK, Thakur MK. Recent Advances in Green Hydrogels from Lignin: A Review. *International journal of biological macromolecules*. 2014 Oct 7. PubMed PMID: 25304747.
13. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*. 2012 Jan;37(1):106-26. PubMed PMID: 22125349. Pubmed Central PMCID: 3223967.
14. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *Journal of controlled release*

: official journal of the Controlled Release Society. 2006 Aug 10;114(1):1-14.  
PubMed PMID: 16828914.

15. Caridade SG, Monge C, Gilde F, Boudou T, Mano JF, Picart C. Free-standing polyelectrolyte membranes made of chitosan and alginate. *Biomacromolecules*. 2013 May 13;14(5):1653-60. PubMed PMID: 23590116.

16. Kong HJ, Smith MK, Mooney DJ. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials*. 2003 Oct;24(22):4023-9. PubMed PMID: 12834597.

17. LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of biomedical materials research*. 1999 Oct;47(1):46-53. PubMed PMID: 10400879.

18. Boonthekul T, Kong HJ, Mooney DJ. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2455-65. PubMed PMID: 15585248.

19. Bouhadir KH, Alsberg E, Mooney DJ. Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. *Biomaterials*. 2001 Oct;22(19):2625-33. PubMed PMID: 11519782.

20. Martínez M, McDermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Veterinary journal*. 2006 Jul;172(1):10-28. PubMed PMID: 16154368.

21. Bregante MA, Saez P, Aramayona JJ, Fraile L, García MA, Solans C. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in mice, rats, rabbits, sheep, and cows. *American journal of veterinary research*. 1999 Sep;60(9):1111-6. PubMed PMID: 10490081.

22. McKellar Q, Gibson I, Monteiro A, Bregante M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999 Aug;43(8):1988-92. PubMed PMID: 10428924. Pubmed Central PMCID: 89402.
23. Wispelwey B. Clinical implications of pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005 Jul 15;41 Suppl 2:S127-35. PubMed PMID: 15942879.
24. Pereira R, Carvalho A, Vaz DC, Gil MH, Mendes A, Bartolo P. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *International journal of biological macromolecules*. 2013 Jan;52:221-30. PubMed PMID: 23059189.
25. Murakami K, Ishihara M, Aoki H, Nakamura S, Nakamura S, Yanagibayashi S, et al. Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wounds in rats with hydrosheets composed of chitin/chitosan, fucoidan, and alginate as wound dressings. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2010 Sep-Oct;18(5):478-85. PubMed PMID: 20731799.
26. Suzuki Y, Tanihara M, Nishimura Y, Suzuki K, Yamawaki Y, Kudo H, et al. In vivo evaluation of a novel alginate dressing. *Journal of biomedical materials research*. 1999;48(4):522-7. PubMed PMID: 10421696.
27. Maiti S, Singha K, Ray S, Dey P, Sa B. Adipic acid dihydrazide treated partially oxidized alginate beads for sustained oral delivery of flurbiprofen.

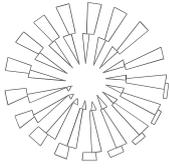
Pharmaceutical development and technology. 2009;14(5):461-70. PubMed PMID: 19235554.

28. Agren MS. Four alginate dressings in the treatment of partial thickness wounds: a comparative experimental study. *British journal of plastic surgery*. 1996 Mar;49(2):129-34. PubMed PMID: 8733355.

29. Cho WJ, Oh SH, Lee JH. Alginate film as a novel post-surgical tissue adhesion barrier. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2010;21(6):701-13. PubMed PMID: 20482979.

30. Liakos I, Rizzello L, Bayer IS, Pompa PP, Cingolani R, Athanassiou A. Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. *Carbohydrate polymers*. 2013 Jan 30;92(1):176-83. PubMed PMID: 23218280.

31. Liakos I, Rizzello L, Scurr DJ, Pompa PP, Bayer IS, Athanassiou A. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International journal of pharmaceutics*. 2014 Mar 25;463(2):137-45. PubMed PMID: 24211443.



# Efectividad clínica de mallas de alginato de sodio para el control de la diseminación de infección con *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis* en heridas cavitadas con cierre primario en ratas

## Clinical efficacy of sodium alginate meshes for the control of infectious dissemination by *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* in cavitated wounds with primary healing

Jorge Luna del Villar Velasco\*    María José Bernard Bernard\*\*  
Graciela Tapia Pérez\*\*\*    Lilia Gutiérrez Olvera†  
Héctor Sumano López†

### Abstract

The potential wound healing ability of sodium alginate (SA) meshes was determined in cavitated rat wounds infected either with *Escherichia coli* or *Staphylococcus epidermidis*. Wound progress was evaluated macroscopically and histopathologically to assess dissemination of the induced infection through evaluation of granuloma formation and adjacent tissue irritation. Five groups of 24 female Wistar rats weighing  $280 \pm 34$  g were formed as follows: control group with SA mesh without inoculum, control group with *Escherichia coli* inoculum without SA mesh, control group with *Staphylococcus epidermidis* inoculum without mesh, group with SA mesh + *Escherichia coli* inoculum and group with SA mesh + *Staphylococcus epidermidis* inoculum. Abdominal flank incisions were performed under anaesthesia and groups were formed. Both macroscopic and histopathological follow up were carried out and results indicated that the presence of SA meshes avoids or greatly diminishes bacteria dissemination and adjacent tissue irritation. This reaction occurs even in the presence of *Escherichia coli* or *Staphylococcus epidermidis*. In the control groups with SA mesh without inoculum and in the groups with *Escherichia coli* inoculum without SA mesh, and control group with *Staphylococcus epidermidis* inoculum without mesh and group with SA mesh + *Escherichia coli* inoculum re-epithelialization and wound healing aspect were better than in groups inoculated with *Staphylococcus epidermidis*, the general odd ratios showed that the dissemination risk was 58 times greater in treatment with SA mesh and *E. coli* as infectious agent (IC 95% 6.2-210). These results indicate that SA mesh is capable of providing adequate conditions to allow granulation of cavitated wounds, without irritation to adjacent tissues and avoiding dissemination of the infection by *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis* in rats. However, presence of granuloma can be a healing or esthetic disadvantage, as observed in control group with SA mesh without inoculum.

**Key words:** ALGINATE, CAVITATED WOUNDS, HIDROGEL, SURGICAL MESH.

Anexo

### Resumen

A

Se determinó el efecto potencial de cicatrización de mallas de alginato de sodio (AS) en heridas cavitadas infectadas con *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*, y se evaluó histopatológica y macroscópicamente la diseminación del proceso infeccioso, formación de granuloma e irritación de los tejidos adyacentes. Se formaron 5 grupos de 24 ratas Wistar hembras de  $280 \pm 34$  g de la siguiente manera: grupo testigo con malla de AS sin inóculo; testigo con inóculo de *Escherichia coli* sin malla; otro grupo testigo con inóculo de *Staphylococcus epidermidis*, sin malla; grupo con malla de AS + inóculo de *Escherichia coli*; grupo con malla de AS + inóculo de *Staphylococcus epidermidis*. Bajo anestesia se realizaron las incisiones en los flancos abdominales y se formaron los grupos. Se realizó un seguimiento macroscópico e histopatológico de la zona afectada y se encontró que la presencia de mallas de AS evita o disminuye drásticamen-

Recibido el 27 de abril de 2012 y aceptado el 20 de agosto de 2012.

\*Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

\*\*Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

\*\*\*Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

†Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

Responsable de correspondencia: Lilia Gutiérrez Olvera, teléfono: 56225908 ext. 108, correo electrónico: liliago@unam.mx

te, tanto la diseminación de la infección a tejidos adyacentes como su irritación. Ello ocurre aun en presencia de *Escherichia coli* o de *Staphylococcus epidermidis*. En los grupos testigo con malla de AS sin inóculo, testigo con inóculo de *Escherichia coli* sin malla, otro grupo testigo con inóculo de *Staphylococcus epidermidis* sin malla y el grupo con malla de AS + inóculo de *Escherichia coli*, la reepitelización y la reducción en la herida fueron superiores a los grupos que fueron inoculados con *Staphylococcus epidermidis*. Los *odd ratios* generales mostraron que el riesgo de diseminación fue 58 veces menor con el uso de malla de AS y *E. coli* como organismo infectante (IC 95% 6.2-210). Los resultados encontrados indican que la malla de AS es capaz de proporcionar condiciones adecuadas para la formación de tejido de granulación, sin irritación en los tejidos adyacentes y evitando la diseminación de la infección en heridas cavitadas y contaminadas por *E. coli* y por *Staphylococcus epidermidis* en ratas. Sin embargo, la presencia de granuloma puede significar una desventaja cicatrizal o estética, como se observó en el grupo testigo con malla de AS sin inóculo.

**Palabras clave:** ALGINATO, HERIDAS CAVITADAS, HIDROGELES, MALLA QUIRÚRGICA.

## Introduction

In veterinary practice, more than 80% of cases seen in outpatient services require a healing process after the accident, surgery, abscesses, tumors or any other cause that damages the tissues.<sup>1</sup> Restoration of the tissue continuity in mammals is comparatively limited with regard to amphibians, and further from tissue regeneration there is reparation with healing collagen production through fibroblastic growth and later epithelial and endothelial proliferation.<sup>1</sup> The number of bacteria that penetrate to a wound may constitute an important factor in local sepsis development and interfere with healing. Thus lesions can be classified as clean, clean-contaminated, contaminated or unclean, based on the bacterial charge that is the one that gives the therapeutic clue to follow.<sup>1</sup>

In particular, the called cavitated lesions are classified as contaminated; such is the case of deep bites, wounds made by sharp pointed instruments, skin avulsion injury and some cases of ontological surgery where there is great quantity of necrotic tissue. In this type of injuries an infectious process is initiated with a minimum of  $10^5$  colony forming units (CFU) of only one bacterium genus per gram of tissue.<sup>2,3</sup> As general rule, these wounds should not be closed because it would allow the growth and spread of the bacteria and, unless an aggressive antibacterial therapy and a wound drainage system are administered, to prevent the aggravation of the infectious process, which could even cause septicemia.<sup>3</sup>

The use of sodium alginate hidrogel meshes (SA) have been used as part of the strategy for repair of this type of lesions. They have also been used as scaffold for the culture of hepatocytes and dental or surgical impression materials and even for repair of bone, cartilaginous and cardiac muscle tissues.<sup>4,9</sup> The SA is obtained from the brown algae *Macrocystis pyrifera* from which a line of anionic polysaccharides are derived, composed of two sugar residues  $\beta$ -D-mannuronic acid and  $\alpha$ -L-guluronic acid.<sup>9</sup> Its biological activity is based on degradation of exudates promoting a moist wound bed that prevents dessication without irritation. It

## Introducción

En la clínica veterinaria, más de 80% de los casos que se atienden en consulta externa requieren de un proceso de cicatrización posterior al accidente, cirugía, abscesos, tumores o cualquier otra causa que lesione los tejidos.<sup>1</sup> La restauración de la continuidad de los tejidos en los mamíferos es comparativamente limitada con respecto a los anfibios, y más que regeneración tisular se presenta reparación con producción de colágeno de tipo cicatrizal a través de crecimiento fibroblástico y posteriormente proliferación epitelial y endotelial.<sup>1</sup> El número de bacterias que penetran en una herida pueden constituir un importante factor en el desarrollo de septicemia local e interferir con la cicatrización. Así, las heridas se pueden clasificar en limpias, limpias-contaminadas, contaminadas y sucias, basándose en la carga bacteriana, y es esta carga la que proporciona la clave terapéutica a seguir.<sup>1</sup>

En particular, a las denominadas heridas cavitadas se les clasifica como contaminadas; tal es el caso de las mordeduras profundas, las heridas por objeto punzocortante, la avulsión de piel por traumatismos y algunos casos de cirugía oncológica, en los que existe gran cantidad de tejido necrótico. En este tipo de heridas se inicia un proceso infeccioso con un mínimo de  $10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC) de un solo género bacteriano por gramo de tejido.<sup>2,3</sup> Como regla general, estas heridas no deben cerrarse, ya que ello facilitaría el crecimiento de bacterias y su diseminación, a menos que se instituya una terapia antibacteriana sistémica agresiva y un sistema de drenaje, para evitar que el proceso infeccioso pueda agravarse y causar septicemia.<sup>3</sup>

Se han utilizado las mallas o hidrogeles de alginato de sodio (AS) como parte de la estrategia para la reparación de este tipo de heridas. También se han usado como andamios para el cultivo de hepatocitos y materiales de impresión dental o quirúrgicos, e incluso en reparación de tejido óseo, tejido cartilaginoso y tejido muscular cardíaco.<sup>4,9</sup> El AS se obtiene a partir de un alga café *Macrocystis pyrifera*, de la cual se deriva una línea de polisacáridos aniónicos compuestos por residuos del ácido

stimulates monocytes increasing local concentrations of cytokines such as interleukin-6 and tumor necrosis factor.<sup>9-12</sup> It is postulated that these pro-inflammatory mediators promote adequate healing.<sup>11,13</sup> The SA is biodegradable and the by-products of degradation in the site are glucose molecules easy to absorb.<sup>9</sup> In spite of the aforementioned, there has been no information on the use of SA on cavitated-infected lesions where challenge for controlling sepsis and healing process in wounds are greater than the correspondent to superficial lesions, where SA meshes are normally used as dressings.<sup>9,10,12-16</sup>

Because of the aforementioned, it was considered as hypothesis that SA can limit the spread of infections in cavitated wounds, for which the objective of this work was to evaluate possible effects of meshes elaborated with SA on the bacterial spread in cavitated infected wounds, adjacent tissue irritation and healing response.

## Material and methods

This assay was authorized by the Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autónoma de México, and carried out under the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.<sup>17</sup>

### Mesh preparation

Under sterile conditions and in a laminar flow cabinet,  $100 \pm 1$  mg of sodium alginate and  $150 \pm 1$  mg of glycerol were added to 250 ml deionized water.<sup>18</sup> It was left to dry in silicon recipients in an incubator at 20°C with controlled ventilation for 24 hours. Then, they were cut to obtain 1 cm<sup>2</sup> meshes and they were stored in vacuum sealed containers for sterile maintenance.

### Mesh implantation

A total of 120 Wistar rats (24 rats per group) of  $280 \pm 34$  g were used, randomly divided into 5 groups: Group CM: control with sodium alginate mesh; Group CEc: control with *Escherichia coli* inoculum; Group CSt: control with *Staphylococcus epidermidis* inoculum; Group MEc: alginate mesh + *Escherichia coli* inoculum; Group MSt: alginate mesh + *Staphylococcus epidermidis* inoculum.

### Housing

Animals were housed at the Bioterio del Departamento de Fisiología y Farmacología of the Facultad de Medi-

beta-D-mannurónico y el ácido alfa-L-gulurónico.<sup>9</sup> Su actividad biológica se basa en la degradación del exudado y promoción de una cama húmeda que evita la desecación de la herida sin irritar. Además, estimula a los monocitos para elevar la concentración local de citocinas, como la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral.<sup>9-12</sup> Se postula que estos mediadores pro-inflamatorios promueven la adecuada reparación de las heridas.<sup>11,13</sup> El AS es biodegradable y los subproductos de degradación en el sitio son moléculas de glucosa fácilmente absorbidas.<sup>9</sup> A pesar de lo anterior, no se ha encontrado información sobre el uso de AS en heridas cavitadas-infectadas, en las que el desafío para controlar la septicemia y el proceso cicatrizal es mucho mayor que el correspondiente en heridas superficiales, en las que habitualmente se usan mallas de AS como apósitos.<sup>9,10,12-16</sup>

En función de lo anterior, se consideró como hipótesis que el AS puede limitar la diseminación de infecciones en heridas cavitadas, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles efectos de las mallas elaboradas con AS, sobre la diseminación bacteriana en heridas cavitadas infectadas, la irritación a los tejidos adyacentes y en la respuesta cicatrizal.

## Material y métodos

Este trabajo fue autorizado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y realizado bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.<sup>17</sup>

### Preparación de las mallas

Bajo condiciones de esterilidad y en una campana de flujo laminar, en 250 ml de agua desionizada, se añadieron  $100 \pm 1$  mg de alginato de sodio y  $150 \pm 1$  mg de glicerol.<sup>18</sup> Se dejó secar en recipientes de silicona dentro de una incubadora a 20°C con ventilación controlada por 24 horas. Posteriormente, se cortaron para obtener mallas de 1 cm<sup>2</sup> y se colocaron en contenedores sellados al vacío para mantener la esterilidad.

### Colocación de las mallas

Se utilizaron 120 ratas Wistar (24 ratas por grupo) de  $280 \pm 34$  g, divididas aleatoriamente en 5 grupos: Grupo TM: testigo con malla de alginato; Grupo TEc: testigo con inóculo de *Escherichia coli*; Grupo TSt: testigo con inóculo de *Staphylococcus epidermidis*; Grupo MEc: malla de alginato de sodio + inóculo de *Escherichia coli*; Grupo MSt: malla de alginato de sodio + inóculo de *Staphylococcus epidermidis*.

cina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autónoma de México. A clinical examination was carried out to discard infectious processes. They were kept in individual isolation cages during all the research.<sup>19</sup> They received food pellets\* *ad libitum* without antibiotics, freshwater and hygiene care and welfare according to guidelines and specifications for care and use of laboratory animals of the norm already described. They were given a 10-day period of adaptation.

### **Induction of the wound**

Each rat was individually weighed and was sedated with an intramuscular injection of acepromacin at a dose of 3 mg/kg. Then, they were anesthetized with ketamine at a dose of 44 mg/kg by intramuscular route.<sup>20</sup> Once anesthetized, the abdominal lateral quadrant was shaved and povidone iodine was administered. Afterwards, a 1 cm long incision was made in the skin, followed by a blunt dissection in subcutaneous cellular tissue to allow the introduction of the mesh. The wound was closed with separate stitches of polypropylene (caliber = 4-0) and reverse cutting needle. Before closing the wound, a bacterial inoculum of 100  $\mu$ l at 0.5 Mac Farland of a 24-hour incubation strain of *Escherichia coli* ATCC 259388 (approximately  $1 \times 10^{14}$ , CFU/ml) was deposited into groups CM and CSt; and for groups CEc and MEc, the same inoculum but of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (approximately  $1 \times 10^8$ , CFU/ml) was deposited.

### **Evaluations**

Follow-ups were made at days 1, 3, 7 and 9 after the inclusion of mesh, and the inflammatory response was evaluated, of which the following scale was considered: spread of infection (D); irritation of adjacent tissues (I); granuloma presence (G); quantified in a scale from 0 to 3, which correspond to null = 0, mild = 1, moderate = 2 and severe = 3. Later, they were euthanized with acepromacin and ketamine and then, an incision was made in the wound in order to obtain the biopsies for their histopathologic analysis.

### **Statistical analysis**

The variables were first analyzed by likelihood chi-square test ratio, and then the odd ratios were obtained by a generalized estimating model for ordinary response variable with C = 4 categories (0, 1, 2, 3), following the same approach of Heagerty and Zeger<sup>21</sup> and 4 time periods (day 1, 3, 7 and 9), treatments CEc *vs* MEc *vs* CM and CSt *vs* MSt *vs* CM were compared using the logit link function. The IBM SPSS 19® kit\* was used.

### **Alojamiento**

Se alojó a los animales en el bioterio del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se les practicó un examen clínico para descartar procesos infecciosos y permanecieron en jaulas individuales de aislamiento durante toda la investigación.<sup>19</sup> Se les proporcionó alimento compactado\* *ad libitum*, sin antimicrobianos, agua potable y los cuidados en su higiene y bienestar de acuerdo con los lineamientos y especificaciones para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la norma ya descrita. Se les dio un periodo de adaptación de 10 días.

### **Inducción de la herida**

Se pesó individualmente cada rata y se le tranquilizó con acepromacina a dosis de 3 mg/kg vía intramuscular. Posteriormente, se le anestesió con ketamina a dosis de 44 mg/kg vía intramuscular.<sup>20</sup> Una vez anestesiadas se rasuró el cuadrante lateral del abdomen y se aplicó povidona iodada. Se realizó una incisión en piel de 1 cm de longitud, seguida de una disección roma en tejido celular subcutáneo para permitir la introducción de la malla. Se cerró la herida con puntos separados de polipropileno de un calibre de 4 ceros y aguja de reverso cortante. Antes de cerrar la incisión, a los grupos MSt y TSt se les depositó un inóculo bacteriano de 100  $\mu$ l al 0.5 de Mac Farland de una cepa de 24h de incubación de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (aproximadamente  $1 \times 10^8$ , UFC/ml) y para los grupos TEC y MEc, el mismo inóculo pero de *Escherichia coli* ATCC 259388 (aproximadamente  $1 \times 10^{14}$ , UFC/ml).

### **Evaluaciones**

Se realizaron seguimientos los días 1, 3, 7 y 9 posteriores a la inclusión de la malla, y se evaluó la respuesta inflamatoria, en la cual se tomó en cuenta la siguiente escala: diseminación de la infección (D), irritación a tejidos adyacentes (I) y presencia de granuloma (G), cuantificadas en una escala de 0 a 3: nulo = 0, leve = 1, moderado = 2 y severo = 3. Posteriormente, se les sacrificó con acepromacina y ketamina; se hizo una incisión en la herida para tomar la biopsia y realizar el análisis histopatológico.

### **Análisis estadístico**

Las variables se analizaron primero mediante una prueba de Ji<sup>2</sup> de razón de verosimilitud, después se ob-

\*Rodent Lab Chow\* 5001. PURINA México

## Results

General odd ratios showed that the risk of spread was 58 times greater in treatment with CEc only against MEc (IC 95% 6.2-210) (Table 1). Table 2 depicts the percentage of the spread in each treatment during the 4-day observation period. Mesh treatments prevented the spread of infection of *Escherichia coli* as well as *Staphylococcus* sp. Likewise, treatment with *Staphylococcus* sp only showed that the risk of the spread was 60.3 times higher than in MSt (IC 95% 7-200) (Table 1). On the contrary, the risk of the presence of granuloma was 32 times lower in treatment with *Staphylococcus* sp group CSt compared to group MSt. Moreover, treatment of CEc showed 11.8 times lower risk of granuloma than in MEc, irritation on adjacent tissues was 71 times more in CEc group than in Mec group, and 87 times higher risk of irritation in *Staphylococcus* sp group than MSt group (Figure 1). Table 3 shows the findings of the histopathologic results of the samples taken at 10 days from five rats per group. Figure 1A shows images of the inflammatory process in rat caused by the inoculum of *Staphylococcus epidermidis* + sodium alginate. Figure 1B shows the inflammatory response of the inoculum of *Escherichia coli* + sodium alginate in rat.

## Discussion

The alginate meshes are formed by polymer physically intermingle chains, polymers not intermingled and water forming gels that are not toxic, cancerigenous or irritant, for which they are considered as biocompatible.<sup>9,15,22</sup> It has been found that SA applied as dressing in open wounds forms a physical barrier to infection, proportioning humidity and a effect of growth limitation on bacteria and fungi.<sup>9,11</sup> Peluso *et al.*<sup>23</sup> describes the capacity of SA to induce mesenchymal and capillary cell proliferation and also macrophage chemotaxis, provides substrates for mediators and favours re-epithelialization. However, there is no evidence of its use in closed wounds, with exception of minor information on bone and cartilaginous tissue, in which alginate meshes promote repairment.<sup>6,7</sup> It has also been used as intracoronary biomaterial, site in which it is gradually substituted by myofibroblasts and connective tissue.<sup>6,8</sup>

In this study it was found that SA meshes prevent the spread of infection to adjacent tissues in presence of *Escherichia coli* or *Staphylococcus epidermidis*, as well as irritation. This effect may be due to the fact that alginate favours bacterial cytoadherence and macrophage chemotaxis, forming multinucleate foreign-body giant cells that prevent the spread of infection. However, in group inoculated with *Escherichia coli*, re-epithelializa-

tuvieron las *odd ratios* o razón de momios por medio de un modelo de estimación generalizado para variable de respuesta ordinal con C = 4 categorías (0, 1, 2, 3), siguiendo el enfoque de Heagerty y Zeger<sup>21</sup> y 4 tiempos (día 1, 3, 7 y 9), con enlace logit se compararon los tratamientos TEc contra MEc contra TM y TSt contra MSt contra TM. Con el paquete IBM SPSS 19®.\*

## Resultados

Los *odd ratios* generales mostraron que el riesgo de diseminación fue 58 veces mayor en el tratamiento con TEc sólo contra MEc (IC 95% 6.2-210) (Cuadro 1). En el Cuadro 2 se muestra el porcentaje de la diseminación en cada tratamiento en los 4 días de observación. Los tratamientos con malla impidieron la diseminación de la infección, tanto de *Escherichia coli* como de *Staphylococcus* sp. De la misma manera, el tratamiento con *Staphylococcus* sp sólo mostró que el riesgo de diseminación fue 60.3 veces mayor que en MSt (IC 95% 7-200) (Cuadro 1). Por el contrario, el riesgo de presencia de granuloma fue 32 veces menor en el tratamiento con *Staphylococcus* sp grupo TSt con respecto al grupo MSt. De la misma forma, el tratamiento de TEc tuvo una presencia de granuloma 11.8 veces menor que en MEc; la irritación en tejidos adyacentes fue 71 veces mayor en el grupo TEc con respecto al grupo MEc, y de 87 veces más riesgo de irritación en el grupo *Staphylococcus* sp al compararlo con el grupo MSt (Figura 1). En el Cuadro 3 se muestran los hallazgos de los resultados histopatológicos de la toma de muestra a los 10 días, de 5 ratas por grupo. En la Figura 1 A) se muestran imágenes del proceso inflamatorio en rata, originado por el inóculo de *Staphylococcus epidermidis* + alginato de sodio; en la Figura 1 B se observa la respuesta inflamatoria del inóculo de *Escherichia coli* + alginato de sodio en rata.

## Discusión

Las mallas de alginato se forman mediante un entrecruzado físico de polímeros en cadenas no entrecruzadas y agua que forman geles, los cuales no son tóxicos, carcinogénicos o irritantes, por lo que son considerados como biocompatibles.<sup>9,15,22</sup> Se ha encontrado que el AS aplicado en forma de apósitos en heridas abiertas forma una barrera física a la infección que proporciona humedad y que limita crecimiento bacteriano y micótico.<sup>9,11</sup> Peluso *et al.*<sup>23</sup> describen la capacidad del AS para inducir proliferación de células mesenquimatosas y capilares además de quimiotaxis para macrófagos, lo cual favorece la reepitelización.<sup>23</sup> Sin embargo,

\*PASW® Statistics S19WRP-0610.

**CUADRO 1**

Evaluación de *odd ratios* en los cuatro grupos que recibieron un inóculo bacteriano: testigo con inóculo de *Escherichia coli* (TEc) 24 ratas; testigo con inóculo de *Staphylococcus epidermidis* (TSt) 24 ratas; malla de alginato + inóculo de *Escherichia coli* (MEc) 24 ratas; malla de alginato + inóculo de *Staphylococcus epidermidis* (MSt) 24 ratas

Evaluation of *odd ratios* in the four groups that received a bacterial inoculum: control group with *Escherichia coli* inoculum (CEc) 24 rats; control with *Staphylococcus epidermis* inoculum (CSt) 24 rats; alginate mesh + *Escherichia coli* inoculum (MEc) 24 rats; alginate mesh + *Staphylococcus epidermis* (MSt) 24 rats

Variable	Generalized odd ratios (IC 95%)	
	CEc vs MEc	CSt vs MSt
Spread of infection	58 (6.2,210) (P = 0.049)	60 (7,200) (P = 0.049)
Irritation on adjacent tissues	71 (40-82) (P = 0.03)	87.3 (9,110) (P = 0.036)
Presence of granuloma	-10.8 (-23, -2) (P = 0.02)	-32 (-43.2, -8) (P = 0.04)

**CUADRO 2**

Porcentaje de irritación en tejidos adyacentes, granuloma y diseminación de la infección en los cinco grupos evaluados, testigo con malla de alginato (TM) 24 ratas; testigo con inóculo de *Escherichia coli* (TEc) 24 ratas; testigo con inóculo de *Staphylococcus epidermidis* (TSt) 24 ratas; malla de alginato + inóculo de *Escherichia coli* (MEc) 24 ratas; malla de alginato + inóculo de *Staphylococcus epidermidis* (MSt) 24 ratas

Percentage of irritation on adjacent tissues, granuloma and spread of infection in the five groups evaluated: control with alginate mesh (CM) 24 rats; control with *Escherichia coli* inoculum (CEc) 24 rats; control with *Staphylococcus epidermidis* inoculum (CSt) 24 rats; alginate mesh + *Escherichia coli* inoculum (MEc) 24 rats; alginate mesh + *Staphylococcus epidermidis* inoculum (MSt) 24 rats

Day/group	CM	CEc	CSt	MEc	MSt	
1	Irritation	0	33.3	33.3	0	0
	Granuloma	0	0	0	0	0
	Spread	0	0	0	0	0
3	Irritation	0	33.3	66.7	0	0
	Granuloma	33.3	0	0	0	0
	Spread	0	33.3	33.3	0	0
7	Irritation	0	66.7	66.7	0	0
	Granuloma	33.3	0	0	33.3	66.7
	Spread	0	33.3	66.7	0	0
9	Irritation	0	66.7	100	0	0
	Granuloma	0	0	0	33.3	100
	Spread	0	66.7	100	0	0

tion and wound reduction was superior to the group inoculated with *Staphylococcus epidermidis*. This difference may be due to different bacterial abilities to adhere to the SA mesh, being superior the cytoadherence of Gram-negative bacteria because of fimbriae and flagella presence. Also, *Staphylococcus* sp motile strains of low cytoadherence capacity have been found,<sup>24</sup> and Stuart *et al.*<sup>25</sup> found that chemotaxis and phagocytosis in *Escherichia coli* is superior to the induced by *Staphylococcus aureus*.

no existe evidencia de su uso en heridas cerradas, a excepción de escasa información en tejido óseo y cartilaginoso, en los cuales las mallas de alginato promueven una reparación.<sup>6,7</sup> También se ha utilizado como biomaterial intracoronario, sitio en el que es sustituido gradualmente por miofibroblastos y tejido conectivo.<sup>6,8</sup>

En este estudio se encontró que la presencia de mallas de AS evitan tanto la diseminación de la infección a tejidos adyacentes, en presencia de *Escherichia coli* o de *Staphylococcus epidermidis*, como la irritación,



**FIGURA 1.** A) Rata a los 9 días con malla de alginato de sodio + inóculo de *Staphylococcus epidermidis*, en la cual se observa la cicatriz y la formación de un granuloma a nivel dorsal del flanco lateral izquierdo. B) Rata a los 9 días con malla de alginato de sodio + inóculo de *Escherichia coli*, en la cual se observa la cicatriz de la piel y la formación de un granuloma casi imperceptible.

**FIGURE 1.** A) Rat at 9 days with sodium alginate mesh + inoculum of *Staphylococcus epidermidis*, in which the scar and granuloma formation can be observed at the left lateral flank to the dorsal level. B) Rat at 9 days with sodium alginate mesh + inoculum of *Escherichia coli*, in which the skin scar and granuloma formation is almost imperceptible.

### CUADRO 3

Histopatología de piel, músculo y subcutáneo en los cinco grupos evaluados al día 10 de muestreo  
 Histopathology of skin, muscle and subcutaneous tissue in the five groups evaluated  
 at the 10<sup>th</sup> day of sampling

Group	Epidermis	Dermis	Subcutaneous	Muscle
CSt	Ulcer with scab Hyperkeratosis++	Inflammation Lymphocytes ++ Piogranulomatous reaction++	Granulation tissue+++	Myositis+++ Degeneration++ Necrosis+
			Myxoid matrix+++ Panniculitis+++ Haemorrhage++ Steatitis+++	
CEc	Hyperkeratosis+	Inflammation Lymphocytes + Piogranuomatous reaction+	Granulation tissue+	Myositis+ Degeneration+
			Myxoid matrix+	
CM	Fibrosis +	Granulation tissue (mature)+++	Granulation tissue (ma- ture)+++	With no evident changes
			Fibrosis++ Myxoid matrix+	
MSt	Ulcer with scab	Macrophages+++	Granulation tissue +++	Degeneration++
			Myxoid matrix+++	
MEc	Fibrosis ++	Macrophages ++	Granulation tissue ++	Degeneration+
			Myxoid matrix++	

These results indicate that SA mesh is capable to proportionate adequate conditions for granulation tissue formation, without irritation of adjacent tissues, preventing the spread of infection. Similar conclusions were drawn by Doria-Serrano *et al.*<sup>26</sup> with regard to the spread process where a model of immobilization of bacteria in sediments using alginate gels was used. Despite the positive results obtained in this study, it is possible to suppose that healing quality provided *in situ* by the SA gel can be improved with the incorporation of drugs that provide better infectious process control. Additionally, it is important to define the SA optimum density as base substrate of meshes or gels for cavitated lesions and evaluate their behaviour in tissues with decreased blood irrigation as ulcers by diabetes, cavities concerned with solid tumours, etc.

In conclusion, sodium alginate meshes prevent the spread of infection by *E. coli* or *Staphylococcus* sp in cavitated lesions, favour granuloma formation and control irritation of adjacent tissues. However, presence of granuloma may be a scar tissue or esthetic disadvantage, as observed in the control group with SA mesh without inoculum.

## Referencias

1. SLATTER DH. Textbook of small animal surgery. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, USA: Saunders WB, 2003.
2. KAISER AB, KERNODLE DS, PARKER RA. Low-Inoculum Model of Surgical Wound Infection. *J Infect Dis* 1992; 166: 393-399.
3. ORSINI J. Wound infections and antimicrobial therapy. In: GOURLEY IM, VASSEUR PB, editors. *General Small Animal Surgery*. Philadelphia: JB Lippincott, 1985:121.
4. PEPPAS NA, SCOTT JE. Controlled release from poly (vinyl alcohol) gels prepared by freezing-thawing processes. *J Control Release* 1992; 18: 95-100.
5. KILI S, TUMURKAAN N, NSALDI S, GUNAY C, USTEKZ, YILMAZ B. Comparison of the effects of some wound healing materials on full thickness skin wounds in rabbits. *Turk J Vet Anim Sci* 2002; 26: 263-272.
6. UYAMA A Y, ISHIKAWA B K, MANOC T, KOYAMA C T, NAGATSUKA D H, SUZUKI B K *et al.* Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials* 2002; 23: 2027-2033.
7. COHEN SB, MEIRISCH CM, WILSON HA, DIDUCH DR. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials* 2003; 24: 2653-2660.
8. LEORJ, TUVIA S, GUETTA V, MANCZUR F, CASTEL D, WILLENZ U *et al.* Intracoronary injection of *in situ* forming alginate hydrogel reverses left ventricular remodeling after myocardial infarction in swine. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1014-1023.
9. CHOI YS, HONG SR, LEE YM, SONG KW, PARK MH, NAM YS. Study on gelatin-containing artificial skin:

en parte, debido a la formación de granuloma. Este efecto puede deberse a que el alginato favorece tanto la citoadherencia de bacterias como la quimiotaxis de macrófagos, formando así células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño, que evitan la diseminación de la infección. Sin embargo, en el grupo inoculado con *Escherichia coli* y malla de AS, la reepitelización y la reducción en la herida fue superior a la del grupo inoculado con *Staphylococcus epidermidis*. Esta diferencia pudo darse por las distintas habilidades de las bacterias para adherirse a las mallas de AS, ya que es superior la citoadherencia de bacterias Gram negativas debido a la presencia de fimbria y flagelos. Además, se han encontrado cepas de *Staphylococcus* sp móviles con baja capacidad citoadherente,<sup>24</sup> y Stuart *et al.*<sup>25</sup> encontraron que la quimiotaxis y fagocitosis para *Escherichia coli* es superior a la inducida por el *Staphylococcus aureus*.

Estos resultados son indicadores de que la malla de AS es capaz de proporcionar condiciones adecuadas para la formación de tejido de granulación, sin irritación en los tejidos adyacentes y evitando la diseminación de la infección. Doria *et al.*<sup>26</sup> llegaron a conclusiones similares en cuanto al proceso de diseminación, en el que se empleó un modelo de inmovilización de bacterias en sedimentos utilizando geles de alginato. A pesar de los resultados positivos obtenidos en este estudio, es factible suponer que la calidad de cicatrización proporcionada *in situ* por el gel de AS puede ser mejorada con la incorporación de fármacos que proporcionen un mejor control del proceso infeccioso. Adicionalmente, es importante definir la densidad óptima del AS como sustrato base de mallas o geles para heridas cavitadas y evaluar su comportamiento en tejidos con irrigación sanguínea disminuida, como en úlceras por diabetes, cavidades propias de tumores sólidos, etcétera.

En conclusión, las mallas de alginato de sodio impiden la diseminación de infecciones por *E. coli* o *Staphylococcus* sp en heridas cavitadas, favorecen la formación de granulomas y controlan la irritación en tejidos adyacentes. Sin embargo, la presencia de granuloma puede significar una desventaja cicatrizal o estética, como se observó en el grupo testigo con malla de AS sin inóculo.

- I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials* 1999; 20: 409-417.
10. THOMAS AKG, MOORE HK. Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Biomaterials* 2000; 21: 1797-1802.
11. MURAKAMI K, AOKI H, NAKAMURA S, NAKAMURAS-I, TAKIKAWA M, HANZAWA M *et al.* Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials* 2010; 31: 83-90.

12. BALAKRISHNANA B, MOHANTYB M, UMASHAN-KARC PR, JAYAKRISHNANA A. Evaluation of an *in situ* forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 2005; 26: 6335-6342.
13. HONG H-J, JIN S-E, PARK J-S, AHN WS, KIM C-K. Accelerated wound healing by smad3 antisense oligonucleotides-impregnated chitosan/alginate poly-electrolyte complex. *Biomaterials* 2008; 29: 4831-4837.
14. GROVES AR, LAWRENCE JC. Alginate dressing as a donor site haemostat. *Ann R Coll Surg Engl* 1986; 68: 1-2.
15. KIM JO, PARK JK, KIM JH, JIN SG, YONG CS, LI DX *et al.* Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *Int J Pharm* 2008; 359: 79-86.
16. HASHIMOTO T, SUZUKI Y, TANIHARA M, KAKIMARU Y, SUZUKI K. Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials* 2004; 25: 1407-1414.
17. ALINE SA. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica Mexicana* 2002; 138: 295-298.
18. RAYMOND CR, PAUL JS, SIÂN CO. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5<sup>th</sup> ed. London UK: Pharmaceutical Press, 2006.
19. HERDT TH. *Fisiología y metabolismo gastrointestinal*. En: CUNNINGHAMJG, KLEINBG, editores. *Fisiología Veterinaria*. 4<sup>a</sup> ed. Barcelona, España: Elsevier España, 2009: 300-310.
20. CARPENTER WC. *Formulario de animales exóticos*. 3<sup>a</sup> ed. México DF: Intermédica, 2006.
21. HEAGERTY PJ, ZEGER SL. Marginal Regression Models for clustered Ordinal Measurements. *J Am Stat Assoc* 1996; 91: 1024-1036.
22. MATTHEW IR, BROWNE RM, FRAME JW, MILLAR BM. Subperiosteal behaviour of alginate and cellulose wound dressing materials. *Biomaterials* 1995; 16: 265-74.
23. PELUSO G, PETILLO O, RANIERI M, SANTIN M, AMBROSIO L, GALABRO D *et al.* Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 1994; 15: 1215-20.
24. UBEDAC, TORMOMA, CUCARELLAC, TROTONDA P, FOSTER TJ, LASA I *et al.* Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 2003; 49: 193-210.
25. STUART LM, DENG J, SILVER JM, TAKAHASHI K, TSENG AA, HENNESSY EJ *et al.* Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 2005; 170: 477-485.
26. DORIA-SERRANO MC, RUIZ-TREVIÑO FA, RIOS-ARCIGA C, HERNÁNDEZ-ESPARZA M, SANTIAGO P. Physical characteristics of poly (vinyl alcohol) and calcium alginate hydrogels for the immobilization of activated sludge. *Biomacromolecules* 2001; 2: 568-574.