

Efectos del hidrogel polietilenglicol diacrilato quitosano sobre la evolución de herida traumática en ratones CD1 sanos y diabéticos

Angel Eduardo Bárcenas García¹, Miriam V. Flores-Merino², Rigoberto Oros Pantoja*¹

¹Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Edo. Méx.

²Centro de Investigación en Ciencias Médicas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Edo. Méx.

* rigoberto_ros@hotmail.com

Resumen— Debido a su elevada tasa de morbi-mortalidad, la Diabetes Mellitus (DM) se considera un serio problema de salud pública en México y a nivel global ¹. Dentro de sus múltiples complicaciones, el daño microvascular y neuropático crónico se considera un factor riesgo para el desarrollo de úlceras diabéticas. La pérdida en la continuidad de la epidermis y de estructuras anatómicas profundas, a su vez puede representar un mayor riesgo en los pacientes. Por tanto, las terapias que permitan acelerar el cierre de heridas, podrían mejorar la calidad de vida de los pacientes e influir considerablemente sobre el impacto económico que representa su tratamiento. En el presente estudio, se evaluó la evolución de heridas traumáticas a través de la aplicación de pellets de hidrogel polietilenglicol diacrilato quitosano (PEGDA-Q) en ratones CD1 sanos y diabéticos. Tras un periodo de 10 días de evolución, se realizó descripción y documentación de imágenes macroscópicas y microscópicas, en las cuales se analizaron los cambios sobre los procesos cicatriciales. Resultados: el tratamiento con PEGDA-Q demostró ser un material biocompatible in-vivo. En el análisis histopatológico, los ratones controles tratados con PEGDA-Q, el grado de reepitelización fue del 100%, mientras que en las lesiones sin hidrogel, la consolidación fue del 50%. En relación a los ratones diabéticos, las lesiones con PEGDA-Q, la consolidación de la herida y de la reepitelización fue del 70%, mientras que en las lesiones sin tratamiento fue del 40%. El tratamiento con hidrogel, aceleró el proceso de reparación tanto en los animales sanos como los diabéticos. Por tanto podría ser una alternativa viable para el tratamiento de lesiones traumáticas de etiología múltiple. Este estudio, podría ser un punto de partida para su posible aplicación en el área clínica. Así mismo, el hidrogel podría ser un vehículo para el tratamiento conjunto con la impregnación de células madre y la liberación prolongada de múltiples fármacos.

Palabras clave— Diabetes Mellitus, hidrogel PEGDA-Q, inflamación-cicatrización, reparación tisular, biomateriales, ingeniería tisular.

I. INTRODUCCIÓN

El cierre de heridas es proceso biológico y un sistema de defensa natural que permite reparar el daño. Las heridas en pacientes sanos como aquellos que presentan condiciones que comprometen los procesos de cicatrización demandan atención médica frecuente². De manera especial, los pacientes diabéticos, presentan múltiples afecciones que comprometen los procesos de reparación y cicatrización, así mismo se compromete la integridad de estructuras anatómicas superficiales y profundas de la piel. Esto a su vez, favorece la aparición de complicaciones que ponen en riesgo la vida del paciente³. En este contexto, el adecuado manejo terapéutico de heridas diabéticas, podría reducir los riesgos de la enfermedad y del impacto económico que representa su terapéutica. Por lo tanto utilizar un sustituto dérmico que pueda favorecer los procesos de cicatrización es indispensable. En la actualidad, el área de bioingeniería de tejidos, ofrece un gran potencial por medio del uso de biomateriales sintéticos para favorecer o acelerar los procesos de reparación tisular⁴. Uno con elevado potencial terapéutico y de gran interés, es el uso de hidrogeles biocompatibles. Este tipo de biomateriales, se integra por redes poliméricas moleculares que forman un sistema de andamiaje prefabricado. El propósito primordial de estos, el acelerar los procesos de migración y proliferación celular, así como de los mecanismos de reparación y la consolidación de lesiones. Dentro las propiedades deseables, deben tener un ensamblaje molecular apropiado o viable, deben ser estables, biodegradables, deben ser atóxicos y mostrar la mayor biocompatibilidad posible al contacto con el huésped y además tener propiedades similares a las que tienen los tejidos biológicos⁵. Tomando en cuenta que estos materiales aún se encuentran en proceso de desarrollo y la mayoría han sido empleados solo en estudios in-vitro, también presentan ciertas limitantes como son el costo elevado de su síntesis y su comercialización, así como una limitada efectividad y biocompatibilidad. Con el propósito de disminuir los costos para su fabricación en serie y potenciar las propiedades de biocompatibilidad, se ha tomado como estrategia el desarrollo de hidrogeles a partir de la combinación de dos o más redes distintas, las cuales podrían aportar nuevas propiedades y maximizar las ventajas⁶.

Por ejemplo el polietilenglicol (PEG) es biocompatible y versátil, sin embargo carece de propiedades de adhesión celular⁷. Por otra parte el quitosano (Q) a pesar de tener propiedades bacteriostáticas, tienen una solubilidad muy baja en solución acuosa, lo que dificulta su fabricación y uso⁷. En esta relación, la combinación de ambos polímeros podría potenciar las propiedades. Por otra parte, integrantes de este grupo de investigación, han reportado en estudios previos, que el hidrogel de PEGDA-Q, cuenta con propiedades hemocompatibles y citocompatibles bajo condiciones *in-vitro*, sugiriéndolo como un biomaterial con aplicaciones potenciales para ser evaluado en estudios *in-vivo* o preclínicos⁸. El objetivo de este estudio, fue evaluar los efectos del hidrogel de PEGDA-Q sobre la evolución de heridas traumáticas en ratones sanos y bajo condiciones de diabetes experimental, a fin de evaluar su viabilidad sobre los mecanismos de reparación dermo-epidérmica, los procesos de cicatrización y la consolidación de heridas.

II. METODOLOGÍA

Síntesis de hidrogel de polietilenglicol-quitosano: previo a la síntesis del hidrogel, PEG (Polióles, México, 4000 g/mol) se funcionalizó para obtener un polímero diacrilado (PEGDA) a través de una reacción por microondas (7min, 1000 watts, DAEWOO). Posteriormente, una solución de quitosano (1%, sigma-aldrich, USA) se homogeneizó con una solución de PEGDA (0.2 g/ml) y fotoiniciador (AIBA, sigma-aldrich, USA). Finalmente, el material fue esterilizado por medio de lavados con etanol al 70% bajo condiciones estériles.

Modelo experimental y evaluación del proceso de reparación: se emplearon ratones CD1 distribuidos en dos grupos de estudio: 1) ratones sanos (n=5) y 2) ratones con diabetes inducida mediante dosis única de Alloxan intraperitoneal a razón de 200 mg/kg (n=9). La diabetes fue confirmada 72 horas después y los animales con glucometría mayor a 200 mg/dL, fueron contemplados en el estudio. Bajo la influencia de anestesia con Pentobarbital sódico (0.1 mg/kg) se realizó tricotomía dorsal. Procedimiento quirúrgico: con previa sepsia y antisepsia se realizaron dos heridas traumáticas circulares de 5 mm de diámetro. Ambas incisiones fueron provocadas sobre la línea media vertebral, una de ellas se realizó entre el ángulo interno de ambos omóplatos. En este sitio, se aplicó un pellet de hidrogel PEGDA-Q con la misma circunferencia de la herida y un espesor de 3 mm. La segunda herida se realizó caudalmente a 1 cm de separación respecto de la primera, la cual se

mantuvo sin tratamiento. Posteriormente ambas lesiones fueron cubiertas con un apósito estéril rectangular de 2x3 cm (TEGADERM), cuyos bordes fueron sellados con cianoacrilato. La evolución de la herida se inspeccionó durante diez días consecutivos. Posteriormente los animales fueron sacrificados mediante cámara de CO₂, para la obtención de muestras biológicas. Inmediatamente se realizó documentación de imágenes macroscópicas mediante microscopio estereoscópico. Para evaluar el grado y límites de reparación del tejido dermoepidérmico, se realizó incisión de 4 mm diámetro sobre el diámetro de la lesión inicial. Las muestras obtenidas fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10% durante 48 horas, posteriormente fueron procesadas para su inclusión en parafina. Finalmente se obtuvieron secciones de 5 µm, en las que se realizó tinciones de PAS y Tricrómica de Mason. En las muestras histológicas se realizaron análisis histopatológicos y su descripción mediante microscopía óptica con una magnificación de 100 y 400x. En el análisis, se contemplaron límites y características histomorfológicas de la unión dermo-epidérmica, el grado de reepitelización y patrón de consolidación de la herida tanto macroscópica como microscópicamente.

III. RESULTADOS

Las heridas con y sin tratamiento (hidrogel de PEG-Q) de ambos grupos (sanos y diabéticos) presentaron cierre completo de la herida a los 10 días. Sin embargo, el comportamiento fue distinto entre las diferentes condiciones. Las heridas en los ratones sanos tratadas con hidrogel, presentaron reepitelización completa, mayor espesor de la epidermis y presencia de estructuras delimitantes entre la costra y la dermis. Además, se encontraron papilas epidérmicas proyectadas hacia la dermis, mientras que la zona de lesión se encontró completamente restaurada con un incremento en la densidad del tejido conectivo y de la matriz extracelular. El abundante infiltrado en este sitio podría estar constituido de linfocitos, así como de fibroblastos migratorios. En concordancia con estos resultados, las heridas tratadas con hidrogel de los ratones diabéticos también presentaron mejoría en comparación con las heridas del mismo ratón sin tratamiento. A nivel macroscópico, en el grupo control las heridas tratadas con hidrogel presentaron un porcentaje de cicatrización del 100% respecto a los ratones diabéticos cuya consolidación fue del 70%. Mientras que en los ratones control sin tratamiento, se observó una del consolidación del 50% respecto al 40% de los ratones diabéticos. (Ver figura 1 y 2.)

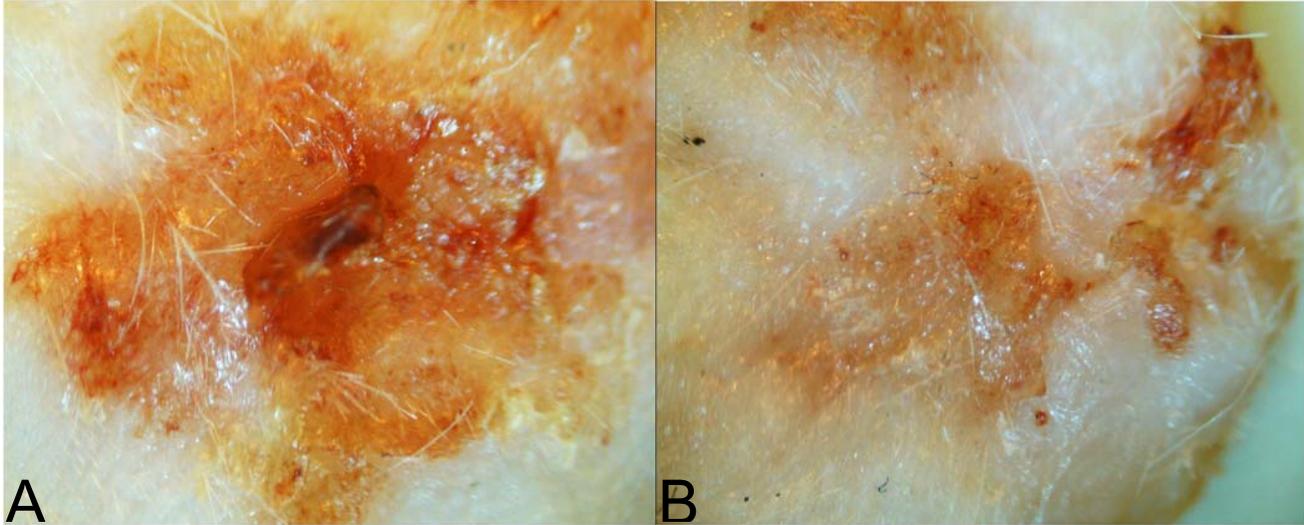


Fig. 1. Herida traumática ratón control.

La figura muestra los procesos cicatriciales a nivel macroscópico de un ratón control. La figura 1A muestra una herida sin tratamiento y la figura 1B muestra una tratada con hidrogel, la cual muestra un proceso de cicatrización más avanzado.

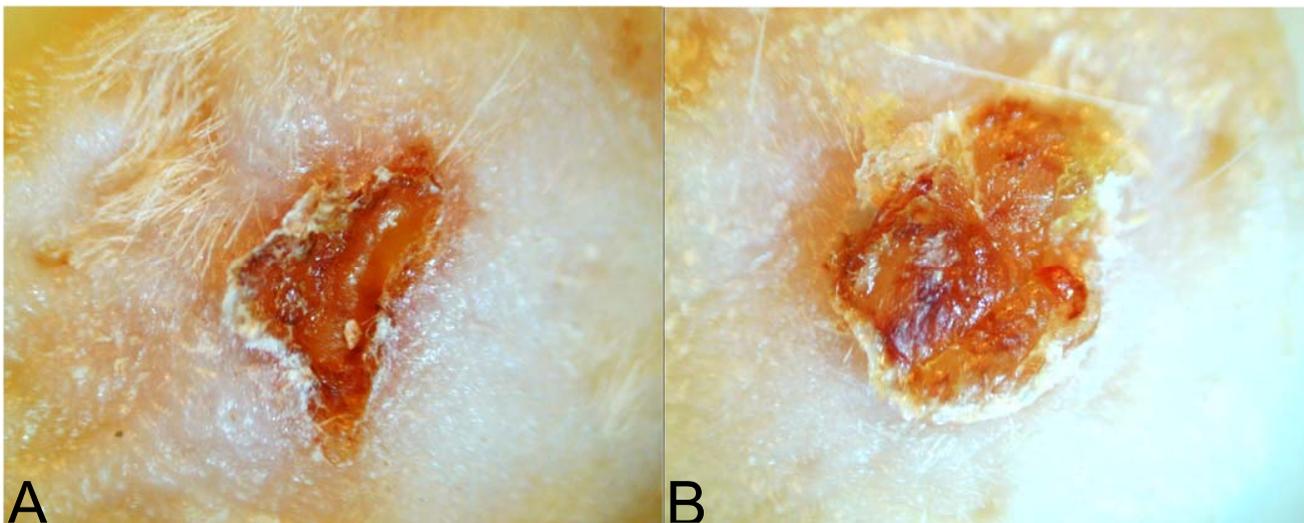


Fig. 2. Herida traumática ratón diabético

La figura 2A muestra los procesos cicatriciales de ratones diabéticos sin tratamiento y la figura 2B , son heridas las cuales han sido tratadas con hidrogel, las cuales muestran un grado mayor de consolidación. En las lesiones se observa una costra de recubrimiento y tejido fibrinoide periférico.

IV. DISCUSIÓN

En la actualidad, el uso de hidrogeles para mejorar los procesos de reparación de heridas dermo-epidérmicas, se considera una estrategia novedosa dentro del área de bioingeniería de tejidos. No obstante, muchas de estas investigaciones, aún se encuentran en desarrollo y la gran mayoría, solo han sido evaluadas en modelos in-vitro. En cuanto a sus propiedades biocompatibles, al momento existe poca evidencia de su potencial terapéutico en estudios in-vivo. En relación al análisis macroscópico de nuestro estudio, el hidrogel de PEGDA-Q favorece los mecanismos de reparación de heridas, ya que en los ratones tanto sanos como diabéticos, el hidrogel aceleró el proceso de cicatrización. A nivel histológico, la dermis fue reparada totalmente, se observó una reepitelización completa. En este caso, la presencia del estrato epidérmico disyuntivo y la completa restauración de la unión dermo-epidérmica podría ser un claro indicador de una reparación completamente funcional. Por otro lado, los procesos cicatriciales se encontraron menos desarrollados en las lesiones no tratadas. Partiendo del modelo experimental de Dunn y cols, (2013)⁹, al comparar la microarquitectura histológica de la piel, se encontraron procesos de cicatrización más rápidos en heridas tratadas con hidrogel respecto a las no tratadas. Por tanto, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por este estudio. Tanto en los ratones controles como los diabéticos, los procesos de cicatrización presentaron una consolidación de la herida más acelerada respecto a las heridas no tratadas.

V. CONCLUSIÓN

En ratones sanos y diabéticos, el tratamiento con hidrogel de PEGDA-Q generó cambios significativos a nivel macro y microscópico sobre los procesos de cicatrización respecto a las heridas no tratadas. Los resultados sugieren que el hidrogel de PEGDA-Q podría ser un material viable y potencial para ser empleado en múltiples condiciones que requieren reparación tisular.

RECONOCIMIENTOS

A la Mtra. Ibeth Mayerly Gaytán Tolosa por sintetizar y proporcionar el hidrogel usado en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Escobedo-de la Peña, Jorge, Buitrón-Granados, Luisa Virginia, Ramírez-Martínez, Jesús Cenobio, Chavira-Mejía, Raymundo, Schargrodsky, Herman, Marcet Champagne, Beatriz, Diabetes en México. Estudio CARMELA. Cirugía y Cirujanos 79, 2011 ISSN 0009-7411
- [2] Valencia Basto, Carlos, Cicatrización: proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. Rev. Investigaciones Andina 12 2010. ISSN 0124-8146
- [3] K.G.M.M. Alberti P.Z. Zimmet. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. Diabetic Medicine 15(7), 2004. 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
- [4] Akhilesh K. Gaharwar Nicholas A. Peppas Ali Khademhosseini. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. Rev. Biotechnology and Bioengineering 111(3),2013. DOI:10.1002/bit.25160
- [5] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa. Hydrogels in pharmaceutical formulations. Rev. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50(1): 27-46,2000. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4.
- [6] Fahad Naeem, Samiullah Khan, Aamir Jalil , Nazar Muhammad Ranjha ,Amina Riaz, Malik Salman Haider, Shoaib Sarwar, Fareha Saheer ,Samrin Afzal. pH responsive cross-linked polymeric matrices based on natural polymers: effect of process variables on swelling characterization and drug delivery properties . Rev. Bioimpacts. 7(3):177-192, 2017. DOI: 10.15171/bi.2017.21
- [7] Xiaodan Zhang, Dongzhi Yang, Jun Nie. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. Rev. International Journal of Biological Macromolecules. 43(5): 456-462. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.08.010
- [8] Escudero-Castellanos, A., Ocampo-García, B.E., Domínguez-García, M.V. et al. Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: biocompatibility assessment and effect of the sterilization process. Rev. Mater Sci: Mater Med 27:176, (2016). DOI: 10.1007/s10856-016-57933
- [9] Dunn, L., Prosser, H. C., Tan, J. T., Vanags, L. Z., Ng, M. K., Bursill, C. A. Murine Model of Wound Healing. Rev. Vis. Exp. (75), e50265, 2013. DOI:10.3791/50265.