

Tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma conteniendo sangre de grado. Reporte Preliminar

Nancy Rojas¹, Kety León², Eglinton Villacaqui³, Julio Santiago^{2,4,*}

¹ Facultad de Medicina de San Fernando, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Grau 755, Lima 1, Perú

² Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

³ Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Circunvalación Cdra. 28 s/n, Lima 41, Perú

⁴ Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela S/N, Lima 1, Perú

Resumen

Se han provocado quemaduras en conejos para evaluar la actividad cicatrizante de películas de quitosano-alcohol polivinílico, obtenidos por radiación gamma y embebidas en solución hidroalcohólica de sangre de grado (*Croton lechleri*). La cicatrización de las heridas fue monitoreada durante 21 días. Las heridas tratadas con películas embebidas en la solución de sangre de grado presentan una cicatrización más rápida en comparación con la película sin embeber. Se utilizó como control una quemadura tratada con furacina, la que mostró una cicatrización mucho más lenta que en los casos tratados con las películas.

Abstract

Burns in rabbits have been caused to evaluate the healing activity of chitosan-poly(vinyl alcohol) films, obtained by gamma radiation and imbibed in hydroalcoholic solution of dragon's blood (*Croton lechleri*). The healing of the wounds was monitored during 21 days. The wounds treated with films containing dragon's blood extract exhibit a faster healing in comparison with the film without this extract. A burn treated with furacine was used as control. In this case the healing was slowly than in the burns treated with the films.

1. Introducción

La curación de quemaduras es un proceso complejo. En casos con distorsión severa del tejido, el proceso curativo puede no conducir a la restauración total (morfológica y funcional) de la piel, sino a la formación de tejido conectivo desorientado con apariencia fibrosa. Esta arquitectura anormal del tejido reduce su elasticidad natural y conduce a la formación de cicatrices [1].

Los biomateriales pueden contribuir a la reconstrucción fisiológica apropiada de la piel y reducir o prevenir la formación de cicatrices. Para el tratamiento de heridas de quemaduras graves se suelen emplear películas obtenidas a partir de piel de cadáver (homoinjertos), piel porcina (xenoinjerto) y membrana amniótica humana [2-3]. Sin embargo, la tendencia actual es utilizar materiales que, además de poseer propiedades similares a la piel normal (no poseer toxinas, proporcionar un ambiente que prevenga la resequecedad de la herida, reducir la penetración de bacterias, evitar pérdidas de

calor, agua, proteínas y glóbulos rojos), promuevan una rápida cicatrización. Así, se han desarrollado diferentes materiales, en forma de esponjas o películas, que contienen medicamentos, nutrientes y biomoléculas con diferentes grados de éxito [4].

Los recubrimientos con hidrogeles (materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional) están considerados entre los más avanzados para el tratamiento de heridas de difícil cicatrización (quemaduras graves y extendidas, úlceras faciales), porque ayudan a mantener la zona afectada con una adecuada humedad, facilitan el debridamiento autolítico y actúan como una barrera eficaz para evitar que las bacterias ambientales infecten la herida. Estas películas tienen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua y cualquier sustancia disuelta en ella. De esta manera, es posible introducir en los hidrogeles aditivos con reconocida actividad biológica para acelerar la cicatrización de las heridas [5].

* Correspondencia autor: jsantiago@ipen.gob.pe

Entre los polímeros más utilizados para la preparación de hidrogeles para el tratamiento de quemaduras tenemos el quitosano y el alcohol polivinílico (PVA) debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad [6, 7]. La formación de hidrogeles a partir de quitosano y PVA puede realizarse por métodos físicos o químicos. Los agentes químicos utilizados para el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas son principalmente el glutaraldehído y la genipita (un compuesto natural). Entre los métodos físicos se puede mencionar el de enfriamiento-calentamiento, y el que utiliza la radiación gamma. De todos ellos, el que mejor se presta para la obtención de películas para aplicaciones biomédicas es el método de entrecruzamiento por radiación gamma, tanto por la estabilidad mecánica, grado de hinchamiento y por la ausencia de residuos tóxicos [8].

Para incrementar las propiedades biológicas de las películas de quitosano-PVA se ha introducido un extracto obtenido del látex de la sangre de grado (*Croton lechleri*) debido a sus reconocidas propiedades biológicas [9]. Este látex es muy utilizado en la medicina tradicional, entre otras aplicaciones, como cicatrizante de heridas internas y externas. Se considera que la taspina, un alcaloide, en sinergia con las proantocianidinas y polifenoles coadyuva al efecto cicatrizante general de la resina, provocando la precipitación de las proteínas de las células, formándose una costra que cubre la herida. Adicionalmente, el látex de sangre de grado presenta actividad antimicrobiana frente a gram-positivos (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y gram-negativos (*Pseudomonas* y *Klebsiela*). Igualmente, se ha encontrado que la sangre de grado inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori* en concentraciones elevadas, presentando además toxicidad [10].

Los experimentos realizados *in vitro* muestran que la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano-PVA embebidas en una solución hidroalcohólica de sangre grado presenta actividad frente a *S. aureus*, con una concentración mínima inhibitoria de 0,025 g/10mL.

Asimismo, las pruebas *in vivo* de la actividad cicatrizante de las películas muestran claramente que las películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas con sangre de grado promueven una rápida cicatrización de heridas producidas por cortes en ratones. En

efecto, estas películas mostraron una cicatrización más rápida que una crema comercial de reconocida acción cicatrizante. Además, la capacidad cicatrizante *in vivo* de las películas embebidas es mayor a la del látex de sangre de grado, que a su vez es mejor que la película sin sangre de grado [11]. En este artículo, se presentan los resultados preliminares obtenidos en el tratamiento de quemaduras utilizando películas de quitosano-PVA embebidas en un extracto hidroalcohólico de sangre de grado. Para determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de sangre de grado también se evaluaron las películas sin este extracto y como control se utilizó la furacina, crema comercial.

2. Experimental

Preparación del material biológico

Se trabajó con conejos hembras, especie *Orytolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758), raza New Zealand, de 4 meses de edad con un peso aproximado de 2,5 a 3 kg, las que fueron mantenidas en un bioterio bajo condiciones estándar para su adaptación. Se cortó el pelaje del lomo de los animales con un área aproximada de 15 x 10 cm, con ayuda de una tijera, para su posterior rasurado.

Se anestesiaron a los animales utilizando 0,8 mL de Ketamina (25 mg/kg) por vía intramuscular y como anestésico local 0,8 mL de Lidocaína (1 %) por vía subcutánea en puntos cercanos a las zonas donde se provocarían las quemaduras.

Se provocaron cuatro quemaduras sobre el lomo de los conejos utilizando un dispositivo eléctrico, con una superficie de aluminio que se calentó a 120 °C, éste se aplicó sobre la piel por 15 segundos, quemando un área de 1cm².

Preparación de las películas de quitosano-PVA

La preparación de los hidrogeles de quitosano-PVA se realizó según el procedimiento ya descrito [9]. Para el tratamiento de las quemaduras se acondicionaron las películas de la siguiente manera: a) películas recién irradiadas, enjuagadas y embebidas con un extracto hidroalcohólico de sangre de grado, película A; b) películas irradiadas, enjuagadas, secadas y embebidas en un extracto de sangre de grado, película B; películas recién

irradiadas y enjuagadas, película C, utilizada como control.

Tratamiento de las quemaduras

Sobre las cuatro quemaduras hechas en los conejos se colocó una película de cada tipo, A, B y C. En la cuarta quemadura se colocó furacina como control. Sobre cada una se colocó gasa y esparadrapo para evitar que se desprendan. Se controló todos los días removiendo y cambiando los geles cuando fuera necesario. Las biopsias se tomaron a los 7 y 14 días, se realizó la biopsia con Punch de 3mm de diámetro. Las biopsias fueron fijadas con una solución de formol neutro al 10 %, incluido en parafina y se cortó a 5 micrómetros. Se coloreó con hematoxilina-eosina y tricómico de Masson [12].

3. Resultados y Discusión

Inicialmente, las quemaduras tenían el aspecto de un cuadrado blanquecino que contrasta con la piel rosada del conejo. Durante los primeros días no muestra cambios aparentes en la superficie, a partir del día 6 se observa una pequeña separación en el límite entre la zona quemada y la piel sana; lo cual demuestra el inicio de la retracción de tejido necrosado. A los 7 días de iniciado el tratamiento se observó que los bordes de las heridas tratadas con las películas embebidas con sangre de grado empezaron a contraerse. Las heridas tratadas con películas sin embeber presentan un aspecto húmedo que demora en cicatrizar. En el caso de la zona tratada con furacina se encuentra húmeda y con los bordes enrojecidos, figura 1.

Las observaciones efectuadas a los 14 días muestran un gran avance en la cicatrización de las heridas tratadas con las películas A y B. La herida tratada con la película A está prácticamente cerrada, la separación de los bordes es notoria con presencia de un coágulo seco. La cicatrización de las heridas progresan en el siguiente orden, de mayor a menor: película A > película B > película C > furacina.

A los 21 días se observó una cicatrización completa de las heridas tratadas con las películas A y B, observándose crecimiento de pelaje. La herida tratada con la película C presenta una cicatrización casi completa pero ya muestra crecimiento de pelaje. En cambio, la herida tratada con furacina aún mantiene su costra.

Las películas A y C recientemente irradiadas, presentan una mayor adherencia a la piel debido a un mayor contenido de agua en las películas, la cual ayuda a aminorar la temperatura de la zona quemada y aliviar el dolor. Esto puede explicar, en parte, el mejor resultado obtenido con la película A, ya que los componentes del extracto de sangre de grado se encuentran en íntimo contacto con la piel posibilitando una mayor interacción, y por consiguiente un mayor efecto cicatrizante.

No se observaron infecciones en las zonas quemadas tratadas con las películas durante los 21 días de estudio. Esto se explica por el hecho comprobado que estas películas actúan como barrera y protección frente a microorganismo y otros agentes externos. En cambio, en un caso se observó una cierta infección en la zona tratada con furacina.



Figura 1: Fotografías de las zonas quemadas en conejos, tratadas con las películas A, B y C, y furacina. Se muestra el avance logrado a lo largo de tres semanas.

El análisis de los cortes histológicos, de las biopsias de las zonas quemadas, muestran que la zona tratada con la película A inicia el proceso de epitelización a los 7 días. Este proceso se muestra muy avanzado a los 14 días, figura 2.

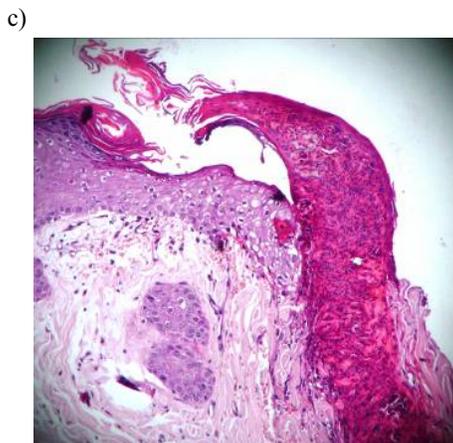
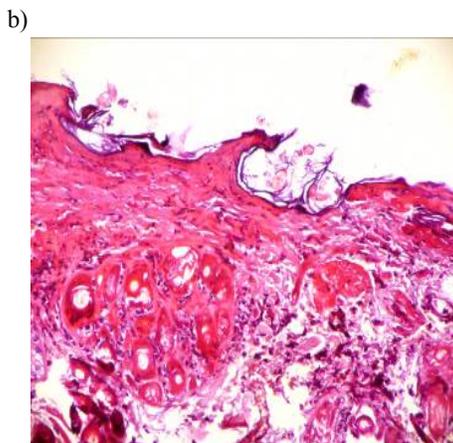
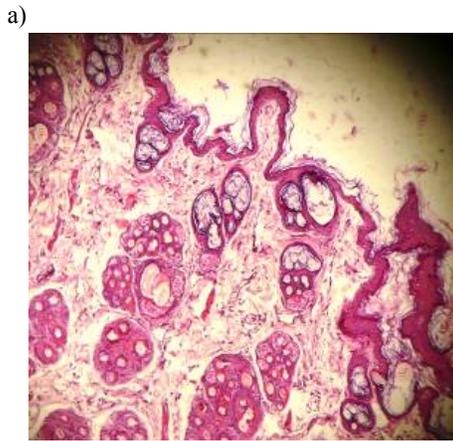


Figura 2: a) biopsia de piel normal de conejo, b) a los 7 días y c) a los 14 días de tratamiento de las quemaduras con películas A, embebidas con sangre de grado. Aumento 5x.

Por otra parte, en las biopsias de las zonas quemadas tratadas con la película B, a los 7 días se observa la coagulación e inflamación aguda de toda la zona biopsiada. Luego de 14 días, se observa la epitelización completa sin pérdida de la zona del coágulo.

En las zonas quemadas y tratadas con la película C, sin sangre de grado, es evidente la presencia del coágulo con neovascularización observada en los cortes histológicos de la biopsia al día 7. En la biopsia a los 14 días, la fase inflamatoria todavía persiste en un área mayor que en los dos casos anteriores.

Con respecto al tratamiento con furacina, en los cortes histológicos correspondiente a la biopsia realizada a los 7 días de tratamiento, observamos que la zona de necrosis celular se mantiene hasta después del día 14 pero se puede notar en la última biopsia microvascularización y tejido de granulación.

4. Conclusiones

Las películas de quitosano-alcohol polivinílico, obtenidos por radiación gamma y embebidas en solución hidroalcohólica de sangre de grado (*Croton lechleri*) son materiales promisorios para el tratamiento de quemaduras. Las heridas tratadas con películas embebidas en un extracto hidroalcohólico de sangre de grado presentan una cicatrización más rápida en comparación con la película sin embeber o quemaduras tratadas con furacina.

5. Bibliografía

- [1] Williamson D, Harding K. Wound healing. *Medicine*. 2004; 32:4-7.
- [2] Guerrero L, Ferro M. Experiencia del Banco Nacional de Piel con pacientes quemados. *Revista Colombiana de Cirugía Plástica y Reconstructiva*. 2002; 8:9-15.
- [3] Kamolz L, Kitzinger H, Anel H, Frey M. The surgical treatment of acute burns. *European Surgery*. 2006; 38:417-423.
- [4] Ran K, Chang Y. Preparation and Characterization by Radiation of Hydrogels of PVA and PVP Containing *Aloe Vera*. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004; 91:1612-1618.
- [5] Queen D, Coutts P, Fierheller M, Sibbald R. The Use of a Novel Oxygenating Hydrogel Dressing in the Treatment of Different Chronic Wounds. *Advances in Skin & Wound Care*. 2007; 20(4):200-207.
- [6] Ishihara M, Ono K, Sato M, Nakanishi K, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Fujita M, Kikuchi M, Kurita A. Acceleration of wound contraction and healing with a

- photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound-Repair-Regen.* 2001; 9(6):513-521.
- [7] Varshney L. Role of natural polysaccharides in radiation formation of PVA-hydrogel wound dressing. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research. Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 2007; 255:343-349.
- [8] Chowdhury M, Alam A, Dafader N, Haque M, Akhtar F, Ahmed M, Rashid H, Begum R. Radiation processed hydrogel of poly (vinyl alcohol) with biodegradable polysaccharides. *Bio-Medical Materials and Engineering.* 2006; 16:223-228.
- [9] León K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 2007; 73:158-165.
- [10] Tamariz J, Capcha R, Palomino E, Aguilar J. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Revista Médica Herediana.* 2003; 14:81-88.
- [11] Cortés E, Jayo S. Actividad antioxidante y cicatrizante de una solución hidroalcohólica de *Croton lechleri* (Sangre de drago) absorbido en un biopolímero (hidrogel de quitosano) [tesis]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2008.
- [12] Sezer A, Hatipoğlu F, Cevher E, Oğurtan Z, Baş A, Akbuğa J. Chitosan Film Containing Fucoidan as a Wound Dressing for Dermal Burn Healing: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8: E1-E8.