

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 ± 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.

Resumen

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 ± 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 drásticamente

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.¹ 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.¹ 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.¹

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.^{2,3} 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.³

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.^{4,9} The SA is obtained from the brown algae *Macrocystis pyrifera* from which a line of anionic polysaccharides are derived, composed of two sugar residues β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid.⁹ 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.¹ 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.¹ 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.¹

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.^{2,3} 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.³

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.^{4,9} 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.⁹⁻¹² It is postulated that these pro-inflammatory mediators promote adequate healing.^{11,13} The SA is biodegradable and the by-products of degradation in the site are glucose molecules easy to absorb.⁹ 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.^{9,10,12-16}

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-1999.¹⁷

Mesh preparation

Under sterile conditions and in a laminar flow cabinet, 100 ± 1 mg of sodium alginate and 150 ± 1 mg of glycerol were added to 250 ml deionized water.¹⁸ 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 cm² 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 ± 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.⁹ 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.⁹⁻¹² Se postula que estos mediadores pro-inflamatorios promueven la adecuada reparación de las heridas.^{11,13} El AS es biodegradable y los subproductos de degradación en el sitio son moléculas de glucosa fácilmente absorbidas.⁹ 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.^{9,10,12-16}

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-1999.¹⁷

Preparación de las mallas

Bajo condiciones de esterilidad y en una campana de flujo laminar, en 250 ml de agua desionizada, se añadieron 100 ± 1 mg de alginato de sodio y 150 ± 1 mg de glicerol.¹⁸ 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 cm² 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 ± 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.¹⁹ 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.²⁰ 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 µl at 0.5 Mac Farland of a 24-hour incubation strain of *Escherichia coli* ATCC 259388 (approximately 1×10^{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 1×10^8 , 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 Zeger²¹ 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.¹⁹ 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.²⁰ Una vez anestesiadas se rasuró el cuadrante lateral del abdomen y se aplicó povidona yodada. 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 µl al 0.5 de Mac Farland de una cepa de 24h de incubación de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (aproximadamente 1×10^8 , UFC/ml) y para los grupos TEC y MEc, el mismo inóculo pero de *Escherichia coli* ATCC 259388 (aproximadamente 1×10^{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 Ji² 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.^{9,15,22} 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.^{9,11} Peluso *et al.*²³ 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 reparation.^{6,7} It has also been used as intracoronary biomaterial, site in which it is gradually substituted by myofibroblasts and connective tissue.⁶⁻⁸

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 Zeger²¹ 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.^{9,15,22} 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.^{9,11} Peluso *et al.*²³ describen la capacidad del AS para inducir proliferación de células mesenquimatosas y capilares además de quimiotaxis para macrófagos, lo cual favorece la reepitelización.²³ 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 <i>odd ratios</i> (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,²⁴ and Stuart *et al.*²⁵ 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.^{6,7} También se ha utilizado como biomaterial intracoronario, sitio en el que es sustituido gradualmente por miofibroblastos y tejido conectivo.⁶⁻⁸

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,

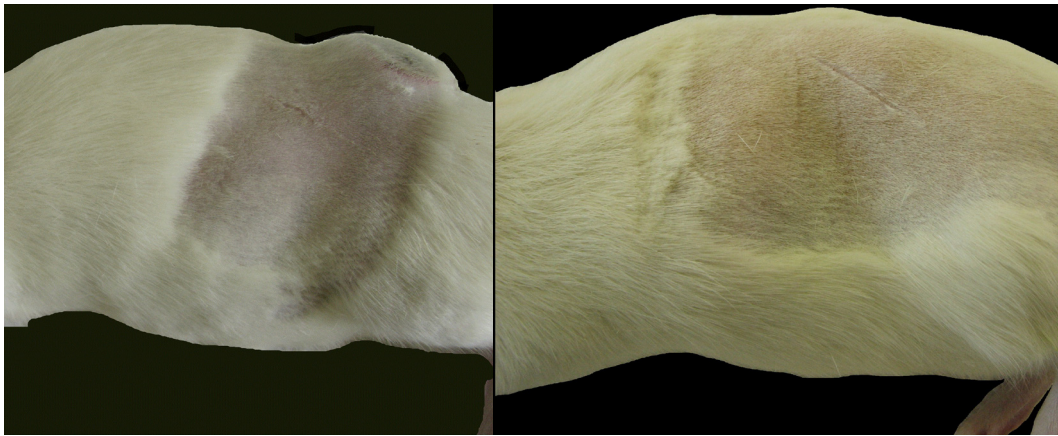


FIGURA 1. A) Rata a los 9 días con malla de alginato de sodio + inóculo de *Staphylococcus epidermidis*, en la cual se observa la cicatriz y la formación de un granuloma a nivel dorsal del flanco lateral izquierdo. B) Rata a los 9 días con malla de alginato de sodio + inóculo de *Escherichia coli*, en 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 10th 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 + Piogranulomatous reaction+	Granulation tissue+ Myxoid matrix+	Myositis+ Degeneration+
CM	Fibrosis +	Granulation tissue (mature)+++	Granulation tissue (ma- ture)+++ Fibrosis++ Myxoid matrix+	With no evident changes
MSt	Ulcer with scab	Macrophages+++	Granulation tissue +++ Myxoid matrix+++	Degeneration++
MEc	Fibrosis ++	Macrophages ++	Granulation tissue ++ Myxoid matrix++	Degeneration+

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.*²⁶ 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. 2nd 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, TÜMURKAAN N, NSALDI S, GÜNAY C, ÜSTEK Z, 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. LEOR J, 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,²⁴ y Stuart *et al.*²⁵ 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.*²⁶ 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- α . *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, UMASHANKAR 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 polyelectrolyte 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*. 5th ed. London UK: Pharmaceutical Press, 2006.
19. HERDT TH. *Fisiología y metabolismo gastrointestinal*. En: CUNNINGHAMJG, KLEINBG, editores. *Fisiología Veterinaria*. 4^a ed. Barcelona, España: Elsevier España, 2009: 300-310.
20. CARPENTER WC. *Formulario de animales exóticos*. 3^a 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.