

Equivalentes cutáneos para prevenir infecciones en heridas en la piel

La piel es uno de los órganos más grandes de nuestro cuerpo. Si no lo sabías, es porque a pesar de ser tan visible esta capa que nos cubre casi por completo continúa siendo una gran desconocida.

María Isabel Patiño Vargas

Microbióloga y bioanalista, doctora en Ciencias Básicas Biomédicas. Integrante del Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares —GITTC— de la Universidad de Antioquia y del grupo Biomedical Engineering —BME— de la Universidad de Groningen misabel.patino@udea.edu.co.

Luz Marina Restrepo Múnera

Bióloga, doctora en Ciencias
Profesora jubilada de la Facultad de Medicina, investigadora del Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares —GITTC— de la Universidad de Antioquia

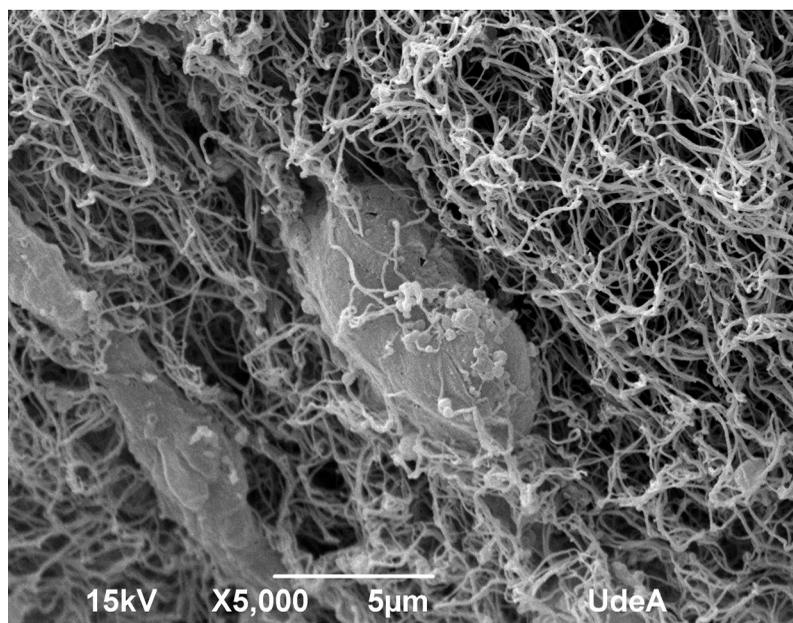
Geles de fibrina con fibroblastos en su interior visualizados por microscopía electrónica de barrido. Foto: cortesía del proyecto.

Además de protegernos del ambiente, la piel es una barrera de defensa frente a los agentes infecciosos o patógenos que pueden poner en peligro nuestra salud. Es la encargada de mantener el equilibrio de fluidos en el cuerpo, previene la pérdida de agua y electrolitos cuando es necesario, regula nuestra temperatura corporal y nos alerta del peligro al percibir la presión y el dolor.

Estructuralmente, la piel se compone de tres capas principales: la más externa, llamada epidermis, tiene varias capas de células denominadas queratinocitos, que están unidas entre sí como ladrillos conformando un muro. Bajo la epidermis está la dermis, compuesta principalmente de matriz extracelular, la cual comprende un conjunto de proteínas como el colágeno y la elastina, que protegen el cuerpo contra lesiones mecánicas al darle resistencia y elasticidad a la piel; los fibroblastos son el principal tipo de células que alberga la dermis, y su tarea es elaborar y segregar los componentes de la matriz extracelular para mantener la integridad estructural de los tejidos. Finalmente, la capa más interna, llamada hipodermis o capa subcutánea, se compone principalmente de adipocitos, que son células especializadas en el almacenamiento de grasa como reserva de energía.

La mayoría de nosotros alguna vez ha sufrido rozaduras, raspaduras o se ha arrancado una partecita de la piel; estas lesiones, por lo general, son superficiales y se curan espontáneamente. Sin embargo, algunas heridas, como las causadas por traumatismos mecánicos, accidentes con objetos afilados, intervenciones quirúrgicas o quemaduras, comprometen su integridad estructural y son más difíciles de sanar. Colombia es uno de los países con el mayor número de pacientes con lesiones por quemaduras en Latinoamérica. Hasta hace poco se desconocía la prevalencia de las heridas en la piel en nuestro país, pero un estudio del año 2017, que se llevó a cabo en once departamentos, reportó una prevalencia total de heridas en la piel del 5,2 %, siendo las más comunes las lesiones por presión, las lesiones relacionadas con adhesivos médicos y las heridas que se presentan en el pie de los pacientes diabéticos (herida por pie diabético).

Como se mencionó, una de las funciones principales de la piel intacta es evitar que las bacterias que se encuentran normalmente en su superficie lleguen a la parte interna. En las heridas, una vez que los microorganismos acceden y crecen dentro de la piel dañada, estos pueden multiplicarse en la capa más interna (subcutánea), aumentando el daño del tejido y retrasando la recuperación. En los pacientes con quemaduras mayores del 50 % de la superficie corporal total, las infecciones son muy frecuentes debido a que no cuentan con tejido sano suficiente para cubrir los daños. La principal complicación de estas in-



Geles de fibrina con fibroblastos en su interior visualizados por microscopía electrónica de barrido. Foto: cortesía del proyecto.

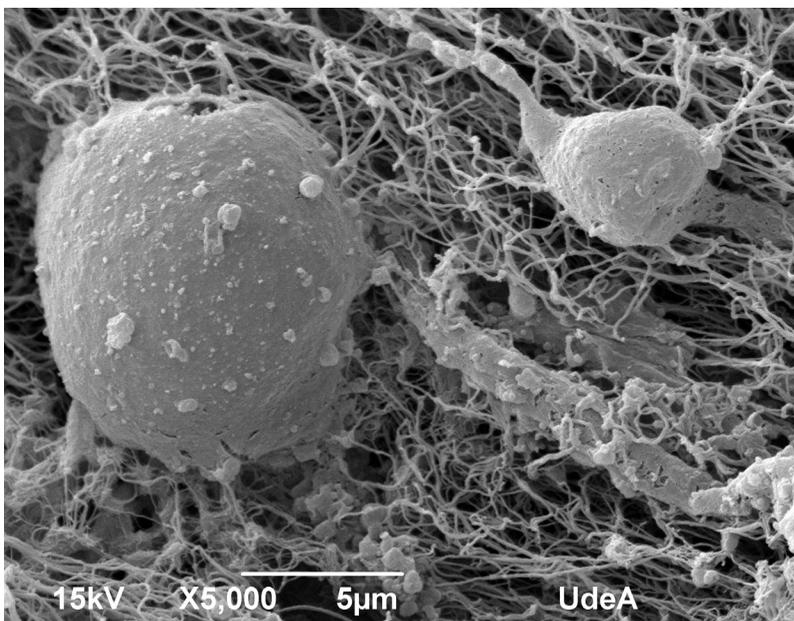
fecciones ocurre cuando se originan por bacterias resistentes a los antibióticos. En estos casos, las bacterias tienen la capacidad de evadir el tratamiento y propagarse con mayor rapidez, lo que podría evolucionar a un estado séptico (infección en todo el cuerpo) con un alto riesgo de mortalidad.

Por lo anterior, las infecciones en las heridas en la piel se consideran un problema de salud pública latente, y se hace necesario el desarrollo de estrategias novedosas que no se basen en los antibióticos utilizados tradicionalmente, que permitan prevenir las infecciones y combatir la resistencia bacteriana.

Uno de los enfoques para tratar y prevenir las infecciones en las heridas en la piel está representado por los modelos conocidos como equivalentes cutáneos o modelos tridimensionales de piel. Se trata de tejidos construidos en laboratorio, en este caso con células y fibrina, los cuales pueden ser modificados por ingeniería genética para que adquieran la capacidad de producir en grandes cantidades unas pequeñas proteínas conocidas como péptidos antimicrobianos, que contribuyen a la defensa natural de la piel. El Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares de la Universidad de Antioquia, en un esfuerzo colaborativo con el Departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Groningen, desarrolló un equivalente de piel que produce uno de estos péptidos conocido como péptido antimicrobiano LL-37, compuesto por 37 aminoáci-

dos (unidades estructurales de las proteínas). Este pequeño péptido ha demostrado ser capaz de destruir diferentes tipos de bacterias y de interaccionar y perforar las membranas bacterianas, lo que lo hace diferente de los antibióticos tradicionales, ya que estos últimos matan a las bacterias al inhibir procesos celulares específicos como la síntesis de proteínas bacterianas y la replicación del material genético. Por lo tanto, la inducción de resistencia bacteriana a los antibióticos a través del LL-37 es poco probable, pues los cambios en la estructura de la membrana celular de las bacterias ocurren raramente. La síntesis y secreción de LL-37 se observa principalmente en las células epiteliales, como los queratinocitos que se mencionaron antes, pero la producción de este péptido no se ha identificado en los fibroblastos. Por lo tanto, estimular la producción del LL-37 en las células que son utilizadas en la construcción de los equivalentes cutáneos hace que estos equivalentes puedan usarse, a su vez, para prevenir infecciones en heridas cutáneas.

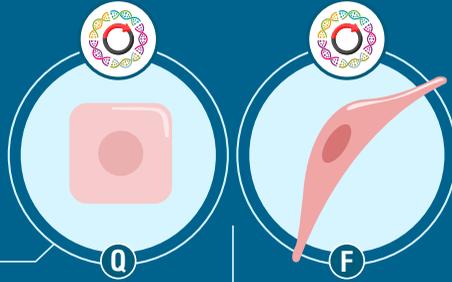
Para fabricar estos equivalentes capaces de combatir las heridas en la piel, tomamos queratinocitos y fibroblastos de piel humana, y por ingeniería genética los modificamos en el laboratorio; para ello, se introdujo dentro de estas células la información genética del péptido LL-37, la cual está contenida en el gen de la ca-



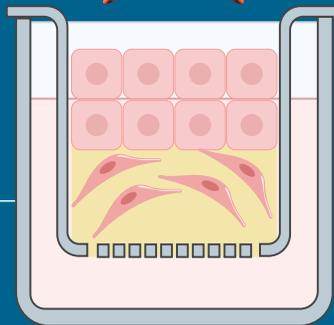


Poliplex + gen CAMP

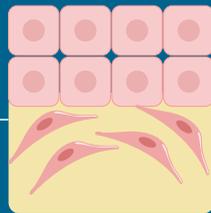
Queratinocitos (Q)
y fibroblastos (F)
modificados



Equivalente
cutáneo con
producción de
LL-37



Aplicación del
equivalente sobre
la herida



Herida en la piel
contaminada por
bacterias



EQUIVALENTES CUTÁNEOS

Los equivalentes cutáneos, elaborados con fibroblastos y queratinocitos modificados por poliplexes, podrían ser aplicados sobre las heridas en la piel para prevenir la contaminación por bacterias al disminuir su proliferación

Poliplexes: complejos formados por la interacción entre ácidos nucleicos con carga negativa y polímeros catiónicos (con carga positiva) basados en polietilenimina



LL-37 ataca las bacterias destruyendo su membrana

telicidina humana (CAMP). Para transportar este gen al interior de las células tuvimos que utilizar un vector químico (poliplexes en este caso) cuya estructura ayuda a encapsular y proteger la información del gen CAMP a través de interacciones entre las cargas negativas del gen y las cargas positivas del químico empleado. El resultado es la formación de unas partículas pequeñas que son capaces de penetrar las células (queratinocitos y fibroblastos) y llegar hasta el núcleo, que es el sitio donde las células guardan la información genética.

Luego de confirmar que las células tenían en su interior la información genética que les adicionamos y verificar si eran capaces de producir el péptido LL-37, estas se utilizaron para la construcción de los equivalentes cutáneos modificados. Primero, se elaboró una especie de gelatina (gel de fibrina) con fibroblastos dentro de ella, y posteriormente se depositaron los queratinocitos sobre el gel. Después de 21 días en cultivo en el laboratorio observamos que las capas superficiales correspondientes a lo que podría ser la epidermis se habían desarrollado, por lo que evaluamos cómo era su forma y si producían el péptido LL-37. Encontramos que los equivalentes modificados tenían características del tejido muy similares a las de la piel normal. Además, localizamos la presencia del LL-37 tanto en las capas dérmicas como epidérmicas, lo que se evidencia con una coloración especial y particular en las células que lo producen. Este hallazgo demostró que los fibroblastos también estaban produciendo nuestro péptido de interés, es decir, el LL-37.

Para responder el interrogante de si estos equivalentes cutáneos tendrían actividad antimicrobiana, pusimos a prueba equivalentes cutáneos tanto modificados con el gen de interés como no modificados, a través de la exposición a cepas de bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), que son reconocidas como los principales agentes causantes de infección y retraso en la cicatrización de heridas.

Observamos que los equivalentes modificados afectaron el crecimiento bacteriano después de 24 horas de exposición, lo cual se evidenció por la disminución en el número de bacterias que eran capaces de crecer después de estar en contacto con los equivalentes cutáneos modificados y que producían el péptido LL-37. Este crecimiento se mide en «unidades formadoras de colonia».

Con esta investigación aprovechamos la ingeniería genética para mejorar las actividades celulares existentes en los equivalentes cutáneos, desarrollando por primera vez equivalentes tridimensionales de piel humana que pueden actuar como «biorreactores» o fábricas para producir y secretar péptidos antimicrobianos, en este caso en particular el péptido LL-37. Esta plataforma permitirá disponer de sistemas de control *in situ* de las infecciones en las heridas en la piel, además de favorecer su cubrimiento y posterior cicatrización. X

Glosario

Modificación genética-ingeniería genética: proceso que emplea tecnologías de laboratorio para alterar la composición del ADN de un organismo. Eso puede incluir la eliminación o la adición de un nuevo segmento de ADN.

Plásmido: molécula de ADN circular que está separada físicamente del ADN cromosómico y se replica de manera independiente. Se encuentra comúnmente en las bacterias y es utilizada para insertar nuevas secuencias genéticas a las células.

Vector no viral: son todos aquellos métodos utilizados para introducir material genético en las células, que suponen la síntesis de una molécula determinada y no están basados en virus. Se consideran más seguros que los métodos virales, ya que presentan menor potencial inmunogénico.