

ARTÍCULO ORIGINAL

# Tratamiento de las úlceras con hemoinjerto-autólogo

## Cura avanzada de heridas.

AUTORES:

DRES. A. CONDE, E. DI CHIANO, A. OLIVERA, C. SIMKIN, RICARDO J SALVA.\*

Correspondencia: acondecvasc@hotmail.com

Recibido: junio 2011

Aceptado: julio 2011

### Resumen

**Introducción:** La utilización de distintos factores de crecimiento biológicos en las heridas, estimulan al crecimiento celular y a la vascularización. La cicatrización de las mismas con estos factores han constituido, en los últimos tiempos, un importante avance en la búsqueda de la curación de heridas. Nuestro trabajo se orienta a comprobar el efecto de dicho factores, (Platelet Derived Growth Factor) en el tratamiento de úlceras crónicas. Los factores de crecimiento son sustancias, la mayoría de origen protéico, que al igual que las hormonas y los neurotransmisores intervienen en la comunicación intercelular.

**Material y Método:** Se realizaron 33 procedimientos en 12 pacientes. El 68% en pacientes de sexo femenino y el 22% en pacientes de sexo masculino, con una edad promedio de 67 años. Se excluyeron aquellos pacientes con co-morbilidad agregada (HIV neoplásicas, enfermedades sistémicas graves, cardiopatías severas, pacientes pusilánimes y conflictivos). Todos los pacientes evaluados eran portadores de insuficiencia venosa crónica con úlceras de mala evolución. Se les realizó laboratorio completo y un eco-doppler venoso de miembros inferiores. Se procede a la extracción de sangre (dependiendo de la superficie ulcerosa a tratar), con un mínimo de 20 cm<sup>3</sup>. La sangre fue centrifugada. Se procedió a separar el tapón plaquetario, se provocó lisis plaquetaria y, posteriormente, con citrato de calcio se le dio forma de cápsula de petri denominándolo "parche". Se realizó antisepsia de lecho ulceroso con lavado de solución isotónica de ClNa. Se procedió a la colocación del parche de PDGF; cubriéndose la curación cada 10-14 días.

**Resultados:** Todos los pacientes presentaron disminución del dolor de la zona tratada en las primeras 24 horas posteriores al tratamiento. Cierre completo de úlceras en un 40% de los casos con un promedio de tres procedimientos. Cierre completo de úlceras en un 20% de los casos con un promedio de dos procedimientos.

**Palabras claves:** Homoinjerto autólogo. Úlceras. Factores de crecimiento plaquetario.

### Abstract

#### Treatment of Ulcers with Autologous Graft-Heme

**Introduction:** The utilization of different factors of biological growth in the wounds stimulate the cellular growth as well as the vascularization. The cicatrization of them with these

\*SERVICIO DE CIRUGÍA VASCULAR. "SECCIÓN FLEBOLOGÍA". HOSPITAL. HIGA. PEDRO FIORITO. AVELLANEDA, PROVINCIA DE BUENOS AIRES

factors is, during the last time, an important progress in the research of the healing of wounds. Our present work is aimed at the effect of these mentioned factors (Platelet Derived Growth Factor) in the treatment of the chronic ulcers. The growth factors are substances; most of them from protein source that like the hormones and the neurotransmitters, take part in the intercellular communication.

**Material and Method:** 33 proceedings have been carried out in 12 patients. The 68% of patients were female and the 22% were male, with a mean age of 67 years. Those patients with added co-morbidity (neoplastic HIV, systemic serious diseases, severe cardiopathies, faint of heart and conflicted patients) have been excluded. All the patients that have been evaluated were carriers of chronic venous insufficiency with ulcers of bad evolution. A completed laboratory studies were carried out to them as well as a venous eco- Doppler of their inferior limbs. Then the blood collection was done (depending on the ulcer surface to be dealt), with a minimum of 20 cm<sup>3</sup>. The blood was centrifuged. Then the platelet plug was separated, the platelet lyses was provoked and then as it was shaped, with calcium citrate, as if it were a Petri ship called "patch". Antisepsis of the ulcer bed was done with a washing of isotonic solution of CINA. Then the placement of the "PDGF patch" was fulfilled, doing the healing every 10-14 days.

**Results:** All the patients have presented diminution of the pain of the treated area in the first 24 hours after the treatment. Complete closure of the ulcers in a 40% of the cases with an average of three proceedings. Complete closures in a 20% of the cases with an average of two proceedings.

**Key words:** Homoiingerto autologous- Ulcers- Platelet growth factors.

## Introducción

La primera mención de la existencia de sustancias aisladas y caracterizadas como factores de crecimiento fueron las de el factor de crecimiento epidérmico "EGF" (*Epidermal Growth Factor*) y la describieron el mismo grupo de científicos que descubrió el denominado NGF (*Nerve Growth Factor*). Fue el grupo de investigación científica encabezado por la Dra. Rita Levi Montalcini y colaboradores de New York. Dicho trabajo se publicó publicado en los anales de la academia científica de New York a principios de 1960; a partir de sus investigaciones llevadas a cabo con glándulas salivales, más específicamente las sub-maxilares de ratones de laboratorio<sup>(1)</sup>.

Esas sustancias aisladas poseían actividad mitogénica y actualmente se conoce que además presentan, la capacidad de estimular la división celular la proliferación y la angiogénesis, a la vez que promueven el quimiotactismo (atracción intercelular durante el proceso inflamatorio), entre otras propiedades<sup>(2)</sup>.

Principalmente, estos factores son secretados en forma autócrina como también así parácrina generándose de esta manera, sistemas de señales ultracortas las cuales actúan sobre las mismas células secretantes o sobre las células vecinas, regulando de esta manera, su función celular.

A. Knighton, Fiegel y colaboradores se les atribuye haber sido los primeros en clasificar y utilizar los fac-

tores de crecimiento plaquetario en el tratamiento de heridas crónicas<sup>(3)</sup>. Heridas crónicas que presentaban evolución tórpida.

A partir de aquí se desprende que los efectos beneficiosos del EGF de plaquetas en el tratamiento de las heridas crónicas, presentaba buena aceptación clínica por parte de los lechos de las heridas y/o úlceras tratadas con las propiamente dichas<sup>(4)</sup>.

## Material y métodos

La cicatrización es un proceso inmunológico, celular y molecular. El mismo es seriado y se realiza de forma continua, siendo la curación de las heridas como así el cierre de toda úlcera, el estadio final de dicho proceso<sup>(5)</sup>.

Para cumplirlo se utilizan múltiples factores de crecimiento y citoquinas<sup>(5) (6)</sup>.

Las mismas acuden al sitio lastimado para mediar la respuesta inflamatoria local; promover el crecimiento de nuevas células, disminuir la contracción y la formación de tejido cicatrizal en exceso<sup>(5) (6)</sup>.

Los factores de crecimiento son sustancias, la mayoría de origen protéico, que al igual que las hormonas y los neurotransmisores intervienen en la comunicación intercelular<sup>(1)(2)(6)(7)</sup>.

Entre sus funciones comprobadas podemos citar:

1. Estimulación de la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis.
2. Promoción de la diferenciación celular.
3. Apoptosis o suicidio celular programado.

Ejercen sus funciones a muy baja concentración dentro de los líquidos corporales, concentraciones tan pequeñas como del orden de los pico gramos<sup>(8)</sup>.

Las dos acciones biológicas más importantes del *EGF* en la reparación de tejidos son: la proliferación celular y la citoprotección. Ésto significa que la estimulación agonista de *EGFR* (Factor Estimulante de la Liberación) puede cambiar hacia programas mitogénicos y pro-supervivencia que concertadamente se traducen en un incremento en el número de la población celular<sup>(9)</sup>.

También el binomio *EGF-EGFR* se encarga de la estimulación de la locomoción en las células epiteliales y fibroblásticas a través de un complejo sistema enzimático de fosforilación y posterior activación de segundos mensajeros intra-celulares<sup>(9)</sup>. Este impulso promotogénico inducido por el complejo *EGF-EGFR* sobre los keratinocitos es de extraordinaria importancia para la re-epitelización<sup>(10)</sup>. También se ha observado que el *EGF* puede controlar la extensión, la unión o la separación de los fibroblastos en forma directa o indirecta por medio de las modificaciones de la composición de la matriz extracelular del tejido lesionado<sup>(11)</sup>.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGF*) se expresa en la mayoría de los tipos celulares humanos<sup>(12)</sup>, incluidos aquellos que juegan papeles esenciales en la reparación de heridas, tales como: fibroblastos, células endoteliales y keratinocitos<sup>(12)(13)</sup> (no diferenciados, marginales, centrales, folículos pilosos, conductos sudoríparos y glándulas sebáceas). Las acciones mitogénicas, motogénicas y citoprotectoras inducidas por el *EGF* conllevan a la curación que, en términos generales, se pueden sintetizar en diferentes etapas como: (a) estimulación de la migración de células productivas hacia el área lesionada y su alojamiento allí, (b) estimulación del desarrollo de tejido de granulación que incluye la acumulación, maduración y angiogenesis de novo de la matriz extracelular, (c) estimulación de la contracción de heridas por estimulación de la activación y proliferación de fibroblastos, (d) estimulación de una nueva afloración del área dañada a través de la migración y la proliferación de células epiteliales<sup>(13)(14)</sup>.

La acción de los factores de crecimiento depende de la presencia de receptores específicos en casos particulares de membrana de células blancas.

Se acepta que cinco grandes familias de factores de crecimiento participen en la cicatrización de heridas<sup>(3)(6)(8)</sup>:

1. *Epidermal Growth Factor (EGF)* Factor de Crecimiento Epidérmico: *EGFa VGF* (Vascular Endotelial Growth Factor) *TGFaa*.
2. *Transforming Growth Factor B (TGFb)*: Factor de Crecimiento Transformador Tipo B: *TGFb*, *TGFbb*, *TGFbbb*.
3. *Fibroblast Growth Factor (FGF)*: Factor de Crecimiento de Fibroblasto *FGFa: FGFb KGF* (*Keritino-cute Growth Factor*).
4. *Insulin Growth Factor (IGF)*: Factores de Crecimiento Insulino – Similes *IGF1 IGF2*.
5. *Platelet Derived Growth Factor (PDGF)*: *AA, AB;BB*, Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas: *PDFG, VEFG*.

### **PDGF (Platelet Derived Growth Factor)**

Los factores de crecimiento celular son polipéptidos, capaces de inducir a concentraciones bajas, crecimiento celular específico. Tiene un peso molecular de 30000 daltons y están formados por dos polipéptidos denominados A y B de 16 y 14 kd respectivamente; unidos por puentes disulfuro: la reducción de la estructura dimérica conlleva a la desaparición de su acción biológica. Éstas, a su vez, pueden constituir homodímeros (AA o BB) o heterodímeros (AB) según que tipo de gen la codifique. En la actualidad, se han identificado un *PDGFC* y un *PDGFD*. Las cadenas Tipo B poseen el papel principal en la cicatrización.

Las células endoteliales, los macrófagos fibroblastos y las células musculares lisas de la capa media en crecimiento también liberan factores mitogénicos celulares. Existen estímulos que favorecen a la liberación de los factores de crecimiento como es el caso de los polimorfonucleares que aumentan la liberación del factor de crecimiento del endotelio en cultivo de células.

Los receptores de *PDGF* son tirosinquinazas conociéndose dos tipos: alfa que se unen tanto a las cadenas A como B y beta que se unen solamente a la cadena B.

### **Propiedades de los pdgf<sup>(13)(14)(15)(16)(17)</sup>**

1. Quimiotactismo: para monocitos neutrófilos y fibroblastos.
2. Proliferación: de fibroblastos células musculares lisas y células endoteliales.
3. Inducción de la matriz extracelular: producción de ácido hialurónico y fibrinonectina.
4. Estímulo de la producción de metaloproteinasas: angiogenesis y remodelación de la cicatriz<sup>(16)(17)</sup>.

**Técnica de obtención de los F.C.P.**

Para la obtención de los *F.C.P.*, se realiza la extracción de sangre, preferiblemente, mediante un sistema con palomita y tubos de vacío estériles de 4.5 cc. que contengan citrato sódico al 3.8%. La cantidad de sangre necesaria dependerá de las áreas a tratar, generalmente, esta cantidad oscila entre 20 y 40 cc., es decir un total de 6 a 10 tubos.

Estos tubos con la sangre extraída se agitan ligeramente para formar una buena mezcla con el citrato sódico y de esta forma evitar la coagulación sanguínea.

Posteriormente se colocan los tubos en número par y simétricamente en una centrifugadora digital de cabezales oscilantes; se centrifugan durante 8 minutos, 1800 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la centrifugación, podremos observar en estos tubos una separación de porciones que quedan organizadas de la siguiente manera:

A-Una porción clara superior que corresponde a las plaquetas. Su cantidad es variable de unos individuos a otros y suele ser la mitad del contenido aproximadamente (2cc., es decir, el 45%).

B-Una porción estrecha intermedia que corresponde a la serie blanca de 1 mm. de grosor aproximadamente.

C-Una porción roja, inferior que corresponde a la serie roja y a un 45% del total aproximadamente (Fig.1).

Es importante destacar que todos aquellos tubos que después de centrifugados presenten un aspecto turbio deben ser desechados, ya que en ellos se ha producido una hemólisis debido a extracción defectuosa de la sangre por lesión del vaso sanguíneo en el momento de la extracción, lo que produce una liberación excesiva de tromboplastina tisular.

Utilizaremos la porción superior, correspondiente a

la serie plaquetaria, la cual dividiremos en tres fracciones iguales que numeramos de 1 a 3 comenzando por la porción superior, es decir, por la más lejana a la serie roja. Cada una de estas fracciones suele suponer un total de 0.5 a 1 cc. (Fig. 2).

**-Fracción 1:** Tercio superior: Es la más pobre en plaquetas y por consiguiente también pobre en factores de crecimiento; la definiremos como *P.P.G.F* (*Plasma Poor in Grow Factors*) o plasma pobre en plaquetas.

**-Fracción 2:** Tercio intermedio: Presenta una proporción de plaquetas muy similar a la que existe en sangre periférica y la definiremos como *P.G.F* (*Plasma Grow Factors, Plasma con Factores de Crecimiento*).

**-Fracción 3:** Tercio inferior: Se encuentra inmediatamente por encima de la serie blanca. Corresponde a la porción más rica en plaquetas y por lo tanto en factores de crecimiento plaquetarios, y la definiremos como *P.R.G.F* (*Plasma Rich in Grow Factors*), Plasma Rica en Factores de Crecimiento.

A continuación separaremos el plasma obtenido en estas tres fracciones con una pipeta estéril extraemos la primera fracción o tercio superior (Fracción 1), de aproximadamente 0.5 cc. Esta porción es pobre en plaquetas y factores de crecimiento por lo cual, no la utilizaremos.

Posteriormente tomaremos, la Fracción 2 y con la pipeta la pasamos a un tubo estéril; a continuación la Fracción 3 que es la más rica en plaquetas y factores de crecimiento que pasamos también a un tubo estéril.

Una vez obtenidas las Fracciones 2 y 3 (*P.G.F* y *PR.G.F*) se procede a la activación del fibrinógeno. Para ello, se añaden 0.05 cc. de cloruro cálcico al 10% por cada 1 cc. de plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento.

Si deseamos formar un coágulo, esperaremos entre

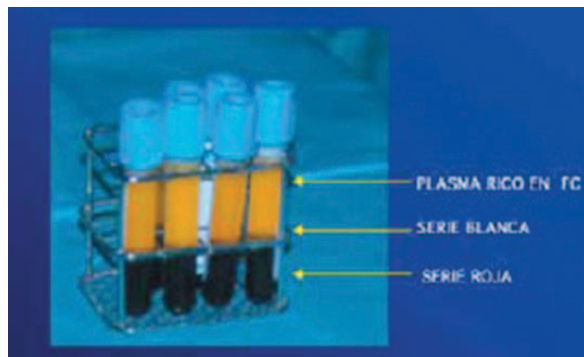


Fig. 1-a: Sangre centrifugada y dividida en sus tres porciones: Plaquetas, Serie blanca, Serie roja.

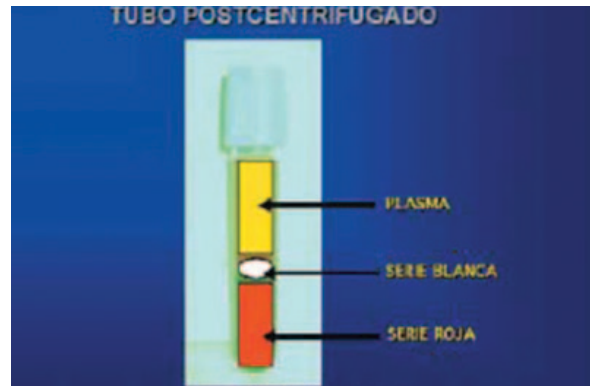


Fig. 1-b: Representación esquemática.

5 a 8 minutos. El tiempo varía en relación al número de plaquetas presentes que dependerá de las variaciones personales de cada paciente. Si deseamos obtener un coágulo en menos tiempo, es necesario equilibrar la temperatura de las fracciones a la temperatura corporal (37°); para ello podemos utilizar un recipiente con agua caliente y sumergir la mezcla con lo que obtendremos el coágulo en un período de 2 a 3 minutos. Este coágulo lo podremos fijar en una determinada área mediante suturas.

La Fracción 2 aislada puede utilizarse como antiinflamatorio o como mesoterapia local.

### Los procedimientos

Se realizaron 33 procedimientos en total sobre 15 lechos ulcerosos distribuidos en 12 pacientes.

El 68% de los mismos fue realizado en pacientes del sexo femenino y el restante 32% en pacientes del sexo masculino.

La edad promedio fue de 67 años, siendo el más joven de 38 años y el más grande de 85 años de edad.

Se excluyeron aquellos pacientes con co-morbilidad agregada: *HIV+*, enfermedades neoplásicas, enfermedades sistémicas graves, cardiopatías severas, pacientes pusilánimes y pacientes conflictivos.

Todos los pacientes evaluados eran portadores de insuficiencia venosa crónica, con úlceras de larga y mala evolución; entendiéndose como tal a las cuales no cerraron nunca dentro de un lapso de 6 meses con 3 tipos de tratamientos distintos.

Se les realizó laboratorio completo de rutina y ecodoppler color venoso bilateral de miembros inferiores.

Se procede a la extracción de sangre venosa, con un mínimo de 20 cm<sup>3</sup> y un máximo de 60, volumen que depende en proporción directa de la superficie ulcerosa a tratar.

La sangre es centrifugada tres veces de forma conse-

cutiva y a velocidades crecientes para poder así obtener una mejor separación de las tres fases.

Se procede a separar el tapón plaquetario, provocando la lisis plaquetaria y, posteriormente, agregando el citrato de calcio que le da forma dentro de la cápsula de *petri*, denominándolo ahora como “parche plaquetario, o parche de plaquetas”.

Se realiza antisepsia con iodopovidona de las zonas linderas al lecho ulceroso para que luego de un primer lavado superficial del lecho con solución isotónica de cloruro de sodio se realicen lavados por arrastre más intensos.

La cantidad y duración de los lavados por arrastre depende directamente con la superficie de la úlcera, de su lecho y con el detritus obtenidos durante los mismos.

Posteriormente se procede bajo estricta asepsia, a la colocación del “parche de plaquetas” (*PDGF*), cubriendo la mayor cantidad de superficie posible de la herida en cuestión.

Se cubre la curación con gasas estériles y un vendaje con vendas camiseta estériles para luego confeccionar primero un vendaje contentivo inelástico con vendas de bajo estiramiento, multicapas, finalizando el mismo con vendaje elastocompresivo convencional.

Las curaciones se realizaron semanalmente en el 86% de los casos, englobando el restante 14%, tiempos de recambio de curación según demanda y concurrencia al control por parte de los pacientes afectados al protocolo.

El promedio de recambio de curación en días fue de siete.

### Resultados

Todos los pacientes presentaron disminución del dolor de la zona tratada en las primeras 24 horas posteriores al tratamiento.

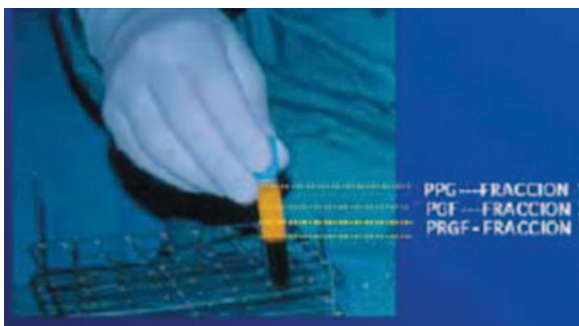


Fig. 2-a: Niveles de las tres fracciones de la porción plaquetaria.

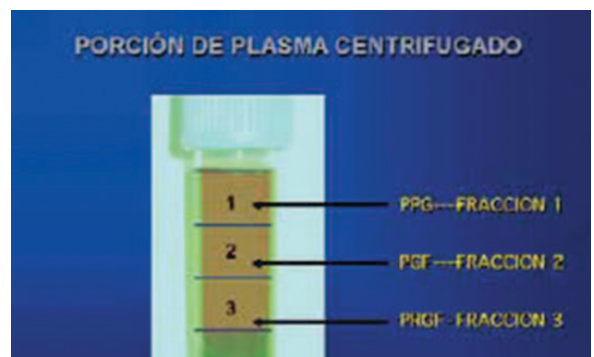


Fig. 2-b: Representación esquemática.

En todos los casos el objetivo clínico fue la disminución del edema con respecto al miembro contralateral.

Cierre completo de úlceras en un 40% de los casos con un promedio de tres procedimientos.

Cierre completo de úlceras en un 20% de los casos con un promedio de dos procedimientos.

Cierre completo de úlceras en un 10% de los casos con un procedimiento.

Cierre completo de las úlceras con más de cuatro procedimientos: se presentó en un 20%, el restante 10% fue 1 caso que cerró con 12 curaciones y otro caso que no se presentó a los controles finales al momento de realizar este trabajo por lo que se lo considera como que no cerró. El tiempo de curación, entendiéndose como tal el cierre de la herida o de la úlcera, fue bastante amplio. La que más rápido curó se cerró en siete días y la que más tarde curó lo hizo en noventa días. El tiempo promedio de curación en días fue de treinta y siete.

## Conflicto de intereses

El autor declara que no tiene ningún interés comercial, financiero ni de propiedad en cualquiera de los productos, como así tampoco en las compañías que se describen en este artículo.

## Conclusiones

La utilización del "parche de plaquetas" reduce la cantidad de secreciones y acelera el tiempo de cierre del lecho ulceroso en comparación con los métodos convencionales (cremas, pomadas, apósitos, azúcar, etc.).

Las úlceras tratadas con este parche presentaron una mejor aceptación por parte de los pacientes los cuales han experimentado una reducción de la inflamación local con el consiguiente descenso del dolor en el 100% de los casos.

Es un método económico de fácil obtención, de bajo costo y con resultados alentadores; pues al ser extraído de la propia sangre del paciente no genera ningún tipo de alergia y/o fenómeno de hipersensibilidad.

Los factores de crecimiento derivados de las plaquetas obtenidas de la sangre de los pacientes constituyen una herramienta muy poderosa, eficaz y sin efectos adversos; que se podrá utilizar en diferentes tejidos que involucren al proceso de la cicatrización.

Se debe considerar que para poder cicatrizar una úlcera, se debe reconocer previamente al factor etiológico de la misma y una vez identificado, realizar el tratamiento acorde a cada caso en particular.

## Bibliografía

1. Levy-Montalcini R, Cohen S. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann NY Acad Sci* 1960, Mar 29; 85:324-41.
2. Bennet, N.; Schultz, G., et al; Growth factor and wound healing : biomechanical properties of growth factors and their receptors. *Am. J.Surg.* 1993;165:728-737-
3. Knighton, D.R.; Fiegel, V.D.; Austin, L.; Et al; Classification and treatment of chronic non healing wounds.; *Ann Surg.*; 1986; 204:322-330.
4. Knighton DR, Ciresi, K.; et al. ;Stimulation of repair in chronic, non healing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg. Gynecol. Obstet.*; 1990, Jan; 170:(1); 56-60.
5. Werner, S.; Grose, R.; Regulation of wound healing by growth factors and cytokines; *Physiol. Rev.*; 2003; 83:835-870.
6. Bilevich, E, Cicatrizacion de heridas. Un enfoque practico; *Forum Fleb.Y Linf.*; 2007; 9:1, 30-36
7. Bennet, N.; Schultz, G., et al; Growth factors and wound healing: biomechanical properties of growth factors and their receptors.; *Am.J.Surg.*; 1993;165:728-737.
8. Bobrovsky, E.; Matteacchio, A; Et al.; Factores de crecimiento en la cicatrizacion.; XV Congreso Argentino e internacional de Flebología y Linfología; Mendoza, Argentina; mayo 2003.
9. Yarden Y. ;The Epidermal Growth Factor family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities .*Eur. J. Cancer* 2001;37supl 4:3-8.
10. Citri, A.; Yarden Y.; Epidermal Growth Factor (EGF) →ERBB signaling: towards the systems level; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*; 2006;7: 505-516 .
11. Wells A. EGF receptor *Int. J Biochem. Cell Biol* :1999;31:643-29
12. Tokumaru S., Higashiyama S, Endo T; Nakagawa T., et al Ectodomain Shedding of Epidermal Growth Factor Receptor ligands is Required for keratinocytes Migration in Cutaneous Wound Healing; *Jour. Cell Biol.*; 2000; 151(2):209-220
13. Pilcher BK, Dumin JA, Sudebeck BD, Krane SM, Welgus HG , Parks WC The activity of collagenase -1 for keratinocyte migration on a type 1 collagen matrix . *J Cell Biol* 1997; 137:1445-1457
14. Eppley, B.L.; et at.; "Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wounds healing". *Plastic And Reconstructive Surgery*; 2004.114:1502-1508.
15. Wells A , Geiffith LG ,and Lauffenbrger DA. Biophysical integration of effect of epidermal growth factors and fibronectin on fibroblast migration . *Biophysical Journal* 1999;76:2817-2823
16. Knighton DR, et al. Role of platelets and fibrin in the healing sequense: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 1982; 196:379-88.
17. Bennett NT, et al. Growth factors and wound healing: bio-chemicals properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165:728-37.