

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”

**ESTUDIO CIEGO ALEATORIZADO Y CONTROLADO DE LA EFICACIA DE UN
APÓSITO BIOLÓGICO DÉRMICO EN EL TRATAMIENTO DE ÚLCERAS
VENOSAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DERMATOLOGÍA**

PRESENTA:

GISELA REYES MARTÍNEZ

TUTOR:

DR. JOSÉ CONTRERAS RUIZ

MÉXICO, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González en la Clínica Interdisciplinaria para el Cuidado de Heridas y Estomas de la División de Dermatología y en el laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Gisela Reyes Martínez con supervisión del Dr. José Contreras Ruiz y el Dr. Andrés Castell Rodríguez.

Este trabajo de Tesis con No. PROT-06-11-2011, presentado por el alumno Gisela Reyes Martínez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. José Contreras Ruiz, y la División de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha del 30 de julio para su impresión final.

División de Investigación Clínica
Dr. Octavio Sierra Martínez

Tutor principal
Dr. José Contreras Ruiz

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Dirección de Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. María Elisa Vega Memije
Subdirectora de Investigación y Enseñanza
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe de la División de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. José Contreras Ruiz
Coordinador de la Clínica Interdisciplinaria de Heridas y Estomas
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Andrés Castell Rodríguez
Jefe del Laboratorio de Inmunoterapia Experimental
Facultad de Medicina, UNAM

Estudio ciego aleatorizado y controlado de la eficacia de un apósito biológico dérmico en el tratamiento de úlceras venosas

Colaboradores:

Dr. José Contreras Ruiz

Firma: _____

Dr. Andrés Castell Rodríguez

Firma: _____

Mto. En B.E. Miguel Herrera Enríquez

Firma: _____

Dra. Alma Angélica Rodríguez Carreón

Firma: _____

Dra. Adriana Lozano Platonoff

Firma: _____

Enf. Ma. Rosy Fabián Victoriano

Firma: _____

Enf. Ximena Garrido Espinola

Firma: _____

INDICE

Glosario	8
Relación de figuras y tablas	9
Resumen.....	10
Abstract.....	12
Agradecimientos.....	14
1. Introducción	15
2. Antecedentes	16
2.1. Ingeniería de tejidos.....	17
2.2. La úlcera venosa de miembros inferiores.....	19
2.3 Estudios realizados con apósitos biológicos.....	23
3. Justificación	28
4. Hipótesis	29
5. Objetivos	29
5.1. Objetivo General.....	30
5.2. Objetivos Particulares	30
6. Material y Métodos.....	30
6.1. Tipo de estudio.....	30
6.2. Ubicación temporal y espacial.....	30
6.3. Criterios de selección de la muestra.....	30
6.4. Variables.....	31
6.5. Tamaño de la muestra.....	33
6.6. Descripción de procedimientos.....	34
6.7. Análisis estadístico.....	36
6.8. Descripción operativa del estudio.....	37
7. Resultados	40
8. Discusión	45
9. Conclusiones	48
10. Perspectivas	49
11. Bibliografía	50
12. Anexos	57

GLOSARIO

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

ITB: Índice tobillo brazo

ABI: Anckle braquial index

FDA: Food and Drug Association

CICHE: Clínica Interdisciplinaria para el Cuidado de Heridas y Estomas

IL-8: Interleucina 8

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF: Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular

IL-1: Interleucina 1

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

FGF: Factor de crecimiento derivado de fibroblastos

IL-2: interleucina 2

IL-3: interleucina 3

DE: Desviación estándar

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

Tx: tratamiento

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Apósito dérmico

Figura 2. Pacientes incluidos en el estudio

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes en ambos grupos

Gráfica 1. Promedio de reducción semanal en ambos grupos

Figura 3. Pacientes del grupo de apósito dérmico

Figura 4. Pacientes del grupo de apósito hidrocoloide

RESUMEN

Introducción: La úlcera venosa venosa es una patología con gran impacto en la salud pública. No existe un tratamiento ideal por lo que el uso de apósitos biológicos son una alternativa sin embargo son de costo elevado. El apósito biológico fabricado con fibroblastos y fibrina puede ser una alternativa eficaz en el tratamiento de esta patología con un costo de producción menor.

Objetivo: Comparar la eficacia de un apósito dérmico fabricado *in vitro* a partir de fibroblastos en una matriz de fibrina contra apósito hidrocoloide en pacientes con úlceras venosas de miembros pélvicos de la Clínica Interdisciplinaria del Cuidado de Heridas y Estomas en el Departamento de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

Material y método: Se realizó un estudio clínico ciego, aleatorizado, controlado, analítico, longitudinal y prospectivo donde se comparó el uso de un apósito dérmico fabricado con fibroblastos y fibrina con el apósito hidrocoloide. El apósito dérmico es elaborado en el Laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. De forma aleatorizada se incluyó a los pacientes a uno de los dos grupos, se aplicó el tratamiento y se realizó medición inicial y semanal durante 8 semanas.

Resultados: Al momento tenemos incluidos 27 pacientes con diagnóstico de úlcera venosa de miembros pélvicos, de los cuáles 12 se encuentran en el grupo de apósito dérmico y 14 en el de apósito hidrocoloide. Se eliminaron 4 pacientes, 1 del grupo de apósito dérmico que falleció por causas ajenas al tratamiento; y 3 pacientes del grupo de apósito hidrocoloide por falta de apego al tratamiento. En este momento, de los 12 pacientes del grupo de apósito dérmico, 9 ya completaron las 8 visitas, y de los 14 pacientes del grupo con apósito hidrocoloide, 9 ya completaron las 8 visitas. De los 18 pacientes que ya completaron el seguimiento, 12 son hombres y 6 mujeres, representando el 66.66% y 33.33% respectivamente. La media de edad de los pacientes fue de 57.18 años y la media del tiempo de evolución fue de 59 meses. La media de reducción con el apósito hidrocoloide fue de 4.07 cm² (IC 95% 2.25- 7.21), mientras que en el grupo de apósito dérmico de 5.90 cm² (IC 95% 3.54-8.12), no hubo diferencias significativas

entre ambos grupos ($p=0.31$). La velocidad de cierre fue mayor en el grupo de apósito dérmico en comparación con el grupo hidrocoloide (2.08 vs 0.94) aunque no hubo diferencias significativas. Las características del lecho de la úlcera mejoraron con el apósito dérmico con aumento en el tejido de granulación, disminución en la cantidad de fibrina y de exudado. Hubo mejoría del dolor y el único efecto adverso fue infección en un paciente.

Discusión y conclusiones: Al momento el apósito dérmico no ha demostrado ser mejor que el apósito hidrocoloide debido a que el número de pacientes que han completado el protocolo, sin embargo, se ha observado en el grupo de pacientes tratados con apósito dérmico que la velocidad de cierre es mayor y se mejoran las características del lecho de la herida aumentando el tejido de granulación y disminuyendo la fibrina y el exudado. Se considera una opción eficaz y segura en el tratamiento de úlceras venosas.

Palabras Clave: úlceras venosas, ingeniería de tejidos, sustituto dérmico

Abstract

Introduction: Venous leg ulcers is a pathology with great impact in public health, however the ideal dressing is yet to be discovered and the tissue-engineered skin bioconstructs are an alternative, nonetheless they are expensive. The dermic bioconstruct elaborated with fibroblasts and fibrin could be a cheaper and effective option to treat this pathology.

Objective: to compare the effectiveness of dermic bioconstruct elaborated with fibroblasts and fibrin with hydrocolloid dressing in the treatment of venous leg ulcers in the Interdisciplinary Wound and Ostomy Care Center at the Department of Dermatology of the “Dr. Manuel Gea González” General Hospital in Mexico City.

Material and method: a randomized, blind, controlled, analytic, longitudinal and prospective clinical trial was conducted to compare the use of a dermic bioconstruct elaborated with fibroblasts and fibrin with hydrocolloid dressing in venous leg ulcers. Then dermic bioconstruct was elaborated in the Experimental Immunotherapy Laboratory at UNAM Faculty of Medicine. In a randomized way the patients was included in one of the two groups, we applied the treatment and weekly measuring during eight weeks was done.

Results: 27 patients are included at this moment, 12 in the dermic dressing and 14 in the hydrocolloid dressing. 4 patients was eliminated, one in the dermic dressing group because he died and 3 in the hydrocolloid group because failure to comply the visits. 9 patients in each group have completed the visits, 12 were men and 6 women. The mean age of the subjects was 57.18 years and the mean evolution time was 59 months. The mean surface reductions with the hydrocolloid dressing was 4.07 cm² (IC 95% 2.25- 7.21) and 5.90 cm² (IC 95% 3.54-8.12) in the dermic dressing, there was no statistical significance between both groups (p=0.31). The speed rate closure was greater in the dermic dressing group than hydrocolloid (2.08 vs 0.94) although there was no statistical significance. The bed wound characteristics were improved with the dermic dressing, increasing the granulation tissue, decreasing fibrin and exudative. Dermic dressing improved wound pain and the only adverse effect was infection in one patient.

Discussion: In this moment the dermic dressing has not demonstrated to be better than hydrocolloid, because of we have not complete the patients sample, nonetheless, in the dermic dressing group the speed rate closure is greater than hydrocolloid group, and the bed wound characteristics are improved. We considered that dermic dressing is an effective and safe option to treat venous leg ulcers.

Key words: venous leg ulcers, bioengineered skin; dermal substitute

Agradecimientos

Agradezco al Dr. José Contreras Ruiz, a Angie, Adri, Xime y Rosy; por su tiempo y dedicación en la realización de este protocolo y por su entusiasmo en continuar realizando investigación en nuestro hospital para ofrecerles a nuestros pacientes la mejor calidad de vida.

Agradezco infinitamente al Dr. Andrés Castell, a Mike, Judith y a todos los que trabajan en el laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por permitirme aplicar en nuestros pacientes el fruto de su conocimiento y trabajo diario, ya que sin ustedes no hubiera sido imposible realizar este trabajo.

Agradezco a mis padres por todas sus enseñanzas, su apoyo incondicional y su amor infinito, ustedes me motivan y me dan la fuerza para seguir luchando por mis sueños día a día.

Agradezco a Carlos y Marga por ser los mejores hermanos del mundo, es una bendición saber que cuento con ustedes incondicionalmente.

A Jorge, por ser mi compañía, mi apoyo y el amor de mi vida. Gracias por estar a mi lado en todo momento.

A mis compañeros Mariana, Clos, Nacho y Mauricio porque en ustedes encontré una gran amistad que deseo conservar siempre. Y a todos mis compañeros residentes, especialmente a Lore y a quienes han participado activamente en este trabajo.

A mis maestros DermaGea por todas sus enseñanzas académicas y para la vida, es para mí un gran orgullo formar parte de esta familia de gente tan profesional y con gran calidad humana.

1. INTRODUCCION

La incidencia de úlceras venosas en México es desconocida pues no existen estadísticas adecuadas. Sin embargo, tomando el ejemplo de Canadá, se calcula que la incidencia en la población general es de 1.8 por 1000 habitantes.^{1,84} La prevalencia en los Estados Unidos se calcula en 0.06 a 2%⁸⁵ o 2.5 millones de personas por año.^{2,40}

Hasta el momento no existe un tratamiento ideal para el tratamiento de las úlceras venosas, el tratamiento convencional es el uso de compresión, además del manejo local de la herida que incluye la desbridación del tejido necrótico, el control de la carga bacteriana mediante antisépticos y el manejo del exudado con apósitos adecuados como son los hidrocoloideos. En las úlceras que no responden al manejo convencional se pueden utilizar apósitos biológicos.³

Los apósitos biológicos funcionan como sustitutos cutáneos temporales que proporcionan una cobertura al lecho de la herida evitando tanto la pérdida de fluidos y electrolitos como una barrera para impedir la colonización bacteriana, además se ha postulado que libera factores de crecimiento que estimulan la cicatrización. Mediante ingeniería de tejidos se ha logrado fabricar diferentes apósitos constituidos por células (queratinocitos, fibroblastos o ambos) incluidos en una matriz extracelular que puede ser de colágena, silicón o diversos polímeros, sin embargo, su costo de producción es muy elevado. Por este motivo la investigación se ha enfocado en buscar una matriz extracelular con la cual se optimicen los costos y tenga mayor disponibilidad para la población.^{3,46-49} En el laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la UNAM, se ha logrado perfeccionar la técnica de elaboración de un apósito dérmico a base de fibroblastos inmersos en una matriz de fibrina, con lo que disminuye de forma importante su costo.

Este estudio tiene como objetivo el comparar la eficacia de un apósito dérmico fabricado *in vitro* a partir de fibroblastos en una matriz de fibrina contra el apósito hidrocoloide en pacientes con úlceras venosas de miembros pélvicos.

2. ANTECEDENTES

En los últimos 50 años uno de los principales logros de la medicina ha sido la posibilidad de restaurar o mejorar la función de algunos tejidos y órganos lesionados por enfermedades o traumatismos con la cirugía de trasplante a partir de órganos y tejidos extraídos de donantes. En la actualidad estas técnicas han comenzado a ser no sólo complementadas, sino incluso sustituidas exitosamente mediante ingeniería de tejidos, con lo cual se hace posible la producción de tejidos que sustituyan a los lesionados, abriendo también la oportunidad de fabricar nuevos órganos.¹ A partir de un pequeño fragmento de tejido se puede lograr restaurar la funcionalidad parcial o total de los tejidos u órganos dañados. Cuando una enfermedad o lesión daña tejidos enteros, se pueden aislar, cultivar, y amplificar suficientemente poblaciones celulares en el laboratorio, de acuerdo a las necesidades de cada caso y luego ser trasplantadas a las zonas afectadas para reparar las partes lesionadas. En el caso de la piel esto es posible, ya que con diferentes diseños se ha logrado que con una muestra del tamaño de un cm² se pueda cultivar suficiente piel de repuesto para recubrir todo el cuerpo de una víctima de quemaduras graves.²

La piel constituye el órgano más grande del cuerpo humano, protegiéndolo del medio ambiente y jugando además un papel importante en otras funciones vitales como metabólicas (síntesis de vitamina D, reserva de grasas, eliminación de desechos, equilibrio hidroelectrolítico), nervioso (asiento de receptores nerviosos: tacto, temperatura, presión, dolor) y psicológica (expresión de emociones, contacto afectivo, autoimagen, cosmética).³ Dada la importancia funcional y estructural de la piel es clara la necesidad de crear un sustituto cutáneo ante las lesiones y daños que pueden producirse por enfermedades, accidentes, traumatismos o cirugías extensas. Por ello, durante varios años se han realizado múltiples intentos de obtener un medio natural o artificial capaz de sustituir la piel dañada o perdida, pero sólo los grandes avances hechos en biología celular en el siglo XX permitieron, a partir de la década de los años 50, que se iniciaran y se desarrollaran diversas técnicas que permitieran alcanzar ese objetivo. Dentro de todas las técnicas ensayadas

destacan las desarrolladas a partir de cultivos de células *in vitro*, haciendo posible que las células aisladas de un organismo puedan sobrevivir y multiplicarse por largo tiempo o por tiempo indefinido.

2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

Las primeras referencias para el cultivo de piel hacen alusión al cultivo celular en forma de explantes celulares.⁴ Aun cuando este tipo de técnica no permitía una proliferación epitelial suficiente, se pudo demostrar que los cultivos celulares obtenidos eran válidos y trasplantables en animales, y el rápido desarrollo de nuevas técnicas hicieron posible realizar los cultivos a partir de células disgregadas, estableciéndose diversos modelos⁵, pero en líneas generales, las colonias obtenidas por estos métodos no permitían la realización de subcultivos celulares por sobrecrecimiento de los fibroblastos o paradójicamente por ausencia de los mismos.⁵

Mediante el cultivo de células, se puede obtener en un período relativamente corto una gran extensión de piel útil para trasplante. Es importante el desarrollo de una base dérmica (compuesta por una matriz extracelular conteniendo fibroblastos dérmicos). La fibrina, proteína derivada del fibrinógeno sanguíneo, aunque no es un compuesto natural de la dermis, es la base para la reparación de heridas⁶, ya que actúa como hemostático, y en un primer momento es la matriz extracelular provisional necesaria para que las células inicien el proceso reparador. Para poder solucionar el tiempo crítico que transcurre desde el momento de la toma de la muestra hasta obtener el epitelio trasplantable, se utilizan actualmente productos comerciales derivados de las investigaciones de la ingeniería de tejidos, los cuáles pueden ser clasificados de la siguiente manera:⁷⁻¹²

- a) Estructura anatómica
 - Dermo-epidérmicos
 - Epidérmicos
 - Dérmicos

- b) Duración de la cobertura:
 - Permanente
 - Semi-permanente
 - Temporales
- c) Tipo de biomaterial
 - Biológicos: autólogos, alogénicos, xenogénicos
 - Sintéticos: biodegradables, no-biodegradables.
- d) Composición del sustituto de piel con respecto al componente celular:
 - Celular
 - Acelular
- e) Biomaterial primario con componente celular:
 - *In vitro*
 - *In vivo*

Ejemplos de estos apósitos dérmicos son Dermagraft, Transcyte, Alloderm y Dermalogen que son polímeros de diferente composición (ácido poliglicólico, colágena tipo I) mezclados con fibroblastos los cuales funcionan como sustitutos cutáneos temporales que proporcionan una cobertura al lecho de la herida evitando tanto la pérdida de fluidos y electrolitos como una barrera para impedir la contaminación.^{13,14} También existen otros productos de origen natural que son heterólogos (ej. piel de cerdo o membrana amniótica) con los cuales se pueden cubrir de manera temporal heridas y quemaduras de segundo y tercer grado.^{15,16} Por otro lado, también se han usado homoinjertos (piel de cadáver) como cobertura temporal con buenos resultados, con la ventaja de que pueden utilizarse frescos o conservados.¹⁷ Aún más, también se pueden realizar injertos autólogos en pacientes seleccionados, es decir el donador y el receptor es el mismo individuo.¹⁷

Recientemente, se han empleado apósitos biológicos fabricados con fibroblastos y queratinocitos o epidermis artificial para el tratamiento de heridas de diferentes etiología, entre los cuales están Apligraf, Orcel e Integra. También se han aplicado con éxito láminas epiteliales cultivadas *in vitro* para el tratamiento de quemaduras y problemas estéticos de enfermedades cutáneas crónicas o extensas que requieren

una amplia sustitución de tejido para su corrección. Así, estas láminas epidérmicas se han utilizado en el tratamiento de úlceras cutáneas crónicas en pacientes diabéticos^{18,19}, en la sustitución de nevos gigantes^{20,21} en epidermólisis bulosa^{22,23}, en lesiones de la mucosa oral y uretral^{24,25} y en la hipomelanosis extensa.^{26,27}

Múltiples estudios avalan el uso de estos sustitutos de piel que actúan como apósitos biológicamente activos, que son temporales²⁸ y proveen a la herida factores de crecimiento, citocinas y matriz extracelular para las células hospedera mientras inician y regulan la cicatrización de la herida. Existen reportes de tolerancia inmunológica de fibroblastos alogénicos²⁹ y su sobrevivencia en el hospedero hasta por tres semanas³⁰. También se ha reportado la preservación de los fibroblastos alogénicos y su proliferación hasta por 2 meses en el hospedero sin signos de rechazo inmunológico³¹⁻³⁷.

Además, se ha postulado que los fibroblastos senescentes de las heridas crónicas no responden a las citocinas que sintetizan los neutrófilos activados. Al no responder a estas citocinas que tienen acción bactericida, induce una colonización bacteriana característica de las úlceras crónicas que puede llegar incluso a la formación de biopelículas. Al mismo tiempo, se inhibe la migración de queratinocitos, impidiendo así el cierre de la úlcera. Los apósitos biológicos suplen la actividad de reclutamiento celular mediante la producción de citocinas, de esta manera los neutrófilos acuden al sitio de la herida destruyendo bacterias y permitiendo la reepitelización.³⁸

El campo abierto por estas investigaciones y el uso de apósitos dérmicos es cada vez mayor en la práctica médica y su uso se ha generalizado. Su empleo es exigido con mayor frecuencia, siendo un área en continua expansión.

2.2 LA ÚLCERA VENOSA DE MIEMBROS INFERIORES

En general, las úlceras en las piernas tienen origen venoso en 80% y el resto corresponden a las arteriales y de otras etiologías.³⁹

En el sistema venoso la sangre fluye del sistema superficial al sistema profundo, este proceso disminuye la presión venosa superficial. La integridad de las válvulas es esencial para prevenir el reflujo durante la relajación de los músculos gastrocnemios (gemelos), protegiendo a las venas superficiales y los capilares de la presión venosa.⁴⁰ Las úlceras venosas tienen su origen en la hipertensión del sistema venoso. En la mayoría de los casos la hipertensión venosa está causada por el reflujo ocasionado por insuficiencia de las válvulas. Otras causas son la obstrucción a la salida del flujo como en la trombosis venosa y la disfunción muscular de los gastrocnemios que impiden el fenómeno de bomba en los vasos sanguíneos en la pierna.⁴¹

Como resultado de la hipertensión venosa gradual se produce la dilatación del sistema de la vena safena interna, después de la externa y sus tributarias y de ahí se transmite a las venas superficiales con la consecuente repercusión en la irrigación de la piel. La región maleolar interna es el sitio típico para la presentación de úlceras debido a la elevada presión de las venas perforantes que es directamente transmitida al lecho capilar de la piel de esa región, por lo que en esta área el aporte de sangre arterial se vuelve relativamente pobre y con el tiempo los tejidos se tornan atróficos e isquémicos. Existen además úlceras de etiología mixta, en las cuales también hay insuficiencia arterial que favorece isquemia tisular y necrosis.^{42,43} Un índice fácil de aplicar y que permite evaluar la presencia de enfermedad arterial es el ITB (índice tobillo-brazo o ABI del inglés ankle-braquial index). Este se obtiene de la relación de la presión sistólica medida a nivel de tobillo entre la presión sistólica en brazo. El valor normal es de 1 ± 0.2 , una cifra por debajo indica insuficiencia arterial y un valor mayor se traduce en presencia de calcificaciones en el sistema arterial.¹⁸

El tratamiento convencional de estas úlceras consiste en eliminar la causa de la misma a través de la correcta compresión. Para ello se utilizan vendajes o medias compresivas. El manejo local de la herida incluye la desbridación del tejido necrótico, el control de la carga bacteriana mediante el uso de antisépticos y el

manejo del exudado con apósitos adecuados. (ejem: hidrogeles, hidrocoloides, espumas, alginato de calcio, hidrofibras, entre los principales). En las úlceras que no hay respuesta al manejo convencional se pueden utilizar factores de crecimiento, sustitutos de piel e injertos, entre otros. En aquellos casos donde la hipertensión venosa ocasiona falla terapéutica a pesar de compresión adecuada se utiliza la cirugía angiológica.

Aún cuando la úlcera haya cicatrizado, se requieren de cuidados constantes a fin de impedir la recurrencia. El proceso molecular de cicatrización involucra la participación de los fibroblastos, la síntesis, secreción y distribución de la colágena. Además, se requiere la participación de otras sustancias que son secretadas por macrófagos, linfocitos, fibroblastos, por ejemplo, citocinas (IL8, $TNF\alpha$, factor de crecimiento vascular endotelial y factor de crecimiento de los fibroblastos) que estimulan a las células endoteliales del tejido dañado para su proliferación.⁴⁴

Para “construir” un tejido es elemental tener las células que constituyen el tejido y el sustrato sobre el cual se desarrollen. Así, para obtener un tejido *in vitro* es importante manejar un número elevado de células, lo cual constituye un reto, ya que usualmente una muestra de tejido es muy pequeña y el número inicial de células funcionales muy reducido, por lo que el problema fundamental es expandir las células en cultivo para obtener un número considerable y suficiente de las mismas. En cuanto al segundo requerimiento, también un reto es la “construcción” de una matriz extracelular idónea para el tejido que se quiere restaurar, para proporcionar la estructura necesaria para que las células tengan una disposición tridimensional que les permita tanto crecer como desarrollar las funciones fisiológicas que le son propias, además de proveer características similares a las del tejido dañado que va a sustituir.⁴⁵

A lo largo del tiempo se han creado numerosos sustitutos cutáneos biológicos y sintéticos para aportar una cobertura a tejidos lesionados incluyendo úlceras

venosas⁴⁶⁻⁴⁹, sin embargo, casi todos están hechos con base en una matriz de colágena lo que hace que se incremente el costo del tratamiento de forma importante.

Una alternativa para sustituir a la colágena como andamio para los fibroblastos es la fibrina, sin embargo ha sido poco explorada. Se ha demostrado que la fibrina mejora las heridas especialmente cuando están asociadas con sitios anatómicos difíciles o con poco movimiento. La evidencia sugiere que mejora la hemostasia y tiene un efecto protector resultando en la disminución de infección bacteriana. La fibrina asociada a fibronectina, ha demostrado ser una matriz adecuada para el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos tanto *in vitro* como *in vivo*, y puede incrementar la motilidad celular en la herida. Es importante destacar que cuando se utiliza a la fibrina como matriz para el desarrollo de queratinocitos y fibroblastos las ventajas son equiparables al tratamiento con injertos cutáneos. La fibrina también ha demostrado ser un vehículo adecuado para factores de crecimiento exógeno, que pudieran facilitar aún más la cicatrización de las heridas.^{50,51}

Es importante destacar que la fibrina es un insumo barato, que se obtiene de los bancos de sangre y que ya cuenta con las pruebas necesarias para descartar infecciones virales. Además puede ser almacenado en congelación y ponerse en cuarentena para evitar la transmisión del VIH durante el período de ventana. Puede también ser utilizado posterior a la aplicación de azul de metileno para la inactivación viral sin cambiar sus propiedades como matriz dérmica; esto hace a la fibrina un producto extremadamente seguro para su uso en humanos^{51,52}.

En el laboratorio de Ingeniería Tisular e Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM se han conseguido establecer y optimizar las técnicas de aislamiento y expansión celular en la construcción de piel con una dermis basada en fibroblastos incluidos en una matriz de fibrina, sin embargo, la utilización clínica de tejidos contruidos *in vitro* en nuestro país no ha sido explorada.

2.3 ESTUDIOS REALIZADOS CON APÓSITOS BIOLÓGICOS

Existen varios estudios que apoyan la eficacia del uso de apósitos biológicos dérmicos y piel artificial en el tratamiento de úlceras venosas, quemaduras y en úlceras pie diabético. El primer sustituto de piel fabricado por bioingeniería y aprobado por la FDA para el tratamiento de úlceras de pie diabético y úlceras venosas (1998) se comercializa con el nombre de Apligraf y está fabricado a partir de fibroblastos de neonato en una matriz de colágena bovina tipo I y una capa de queratinocitos humanos.⁵³ Se desconoce su mecanismo de acción, y se postula que su eficacia se debe principalmente a la producción de citocinas y factores de crecimiento a partir de los fibroblastos injertados, ya que en una úlcera crónica están deficientes.⁵⁴ Apligraf se ha utilizado en úlceras de más de un mes de evolución y como sustituto de piel en pacientes postoperados sin presentar efectos adversos ni rechazo, ya que las células del constructo no sobreviven después de 1 a 2 meses *in vivo*^{33,55} Ha sido también utilizado con éxito en el tratamiento de úlceras secundarias al uso de hidroxiurea, por avulsión traumática, úlceras por presión, sarcoidosis ulcerativa que no responde a tratamientos con esteroides, morfea ampollosa, ectropión cicatrizal, epidermólisis ampollosa y quemaduras, entre otros.^{2,40,53,56-61}

El primer análisis que demostró la eficacia de Apligraf se realizó en 1998 por Falanga⁴⁸, en un estudio multicéntrico que incluyó 293 pacientes con aplicación seriada del Apligraf hasta en 5 ocasiones, demostrando una eficacia en la velocidad de cierre de 63% en pacientes injertados vs 49% en aquellos que sólo se les aplicó compresión; y encontraron que la mediana de cierre fue de 61 días con Apligraf en comparación con 181 días en pacientes tratados con compresión (P=0.003). También observaron que el injerto cutáneo fue más efectivo en el tratamiento de úlceras de mayor tamaño (> 10 cm) y con más tiempo de evolución (> 6 meses). Los efectos adversos fueron similares en ambos grupos y no presentaron evidencia clínica ni de laboratorio de rechazo. Existen estudios clínicos controlados que demuestran que el uso de Apligraf es más efectivo y menos costoso que el tratamiento convencional,⁶²⁻⁶⁴ además de mejorar la calidad de vida en pacientes con úlceras venosas y disminuir el dolor.⁶⁵

En 1999, Falanga y cols. publican un estudio que incluyó a 120 pacientes con úlceras venosas de difícil cierre con más de 1 año de duración.⁶⁶ El estudio fue prospectivo, aleatorizado y controlado. Los pacientes fueron tratados con Apligraf más compresión, y el grupo control únicamente con compresión. Los pacientes fueron evaluados hasta el cierre del 100% de la herida. Encontraron que el tratamiento con el injerto de piel fue significativamente más efectivo que el grupo control en el porcentaje de pacientes curados a los 6 meses (47% vs 19%; $p < 0.005$) y la media de tiempo de cierre completo ($p < 0.005$). El análisis con el método de regresión multivariada, ajustado a factores que generalmente influyen en el cierre de la herida (duración, área, profundidad, localización, lecho de la herida e infección), demostró que los pacientes tratados con el injerto de piel tienen dos veces mayor probabilidad de cierre completo a los 6 meses ($p < 0.005$), y más del 60% de alcanzar el cierre completo en comparación con el grupo control ($p < 0.01$).

Martson y cols.⁶⁷ realizaron un estudio con Dermagraft, un apósito dérmico fabricado con fibroblastos de prepucio criopreservados en una matriz de polímero bioabsorbible (ácido poliglicólico y ácido poliláctico) comparado con terapia convencional, en pacientes con pie diabético encontrando una diferencia significativa en la tasa de curación (30% Dermagraft vs 18% control $P = 0.065$), así como un cierre completo más rápido ($P = 0.04$). Los pacientes no han presentado rechazo al injerto y se postula que es debido a que los fibroblastos dérmicos son relativamente no antigénicos ya que no expresan marcadores HLA-DR.

En el 2004, Omar y colaboradores⁶⁸ realizan un estudio con Dermagraft en 18 pacientes con úlcera venosa, 10 fueron tratados con Dermagraft y compresión y 8 pacientes sólo con compresión. El 50% de los pacientes con Dermagraft y 12.5% de los tratados con compresión presentaron cierre completo de la úlcera a las 12 semanas. La tasa de curación del área total de la úlcera y la tasa lineal de curación fue significativamente mayor en pacientes tratados con Dermagraft ($P = 0.001$ y $P = 0.006$ respectivamente).

Otro apósito creado por ingeniería de tejidos es OrCell el cual está hecho a base de fibroblastos alogénicos y queratinocitos obtenidos de neonato. Los fibroblastos son cultivados en una esponja de colágena bovina de tipo I, con una cobertura de gel de colágena no porosa sobre la cual están adheridos los queratinocitos. El producto tiene licencia para ser utilizado desde 2001 para tratar quemaduras y epidermólisis ampollosa distrófica. Este apósito disminuye la cicatriz y acorta el período de curación⁶⁹. Por estar compuesto de células alogénicas, el producto se reabsorbe en 7 a 14 días y no se encuentran DNA celular 14 a 21 días posterior a la aplicación.

Otro producto utilizado ampliamente es la plantilla de regeneración dérmica Integra, que consiste en un componente dérmico poroso hecho a base de colágena bovina tipo I y el glucosaminoglucano condroitin-6-sulfato de tiburón, depositado en una pseudoepidermis de silicón.⁷⁰ El componente dérmico contiene fibroblastos los cuáles contribuyen a la formación de neodermis mientras que el componente pseudoepidérmico protege la herida de la pérdida de humedad y de la contaminación bacteriana. Este apósito ha sido ampliamente utilizado en quemaduras de espesor total con muy buenos resultados llegando a ser el estándar de oro de los sustitutos dérmicos⁷¹⁻⁷⁴. Se ha utilizado también en úlceras crónicas⁷⁵. Se ha demostrado muy bajo riesgo de transmisión de enfermedades y de respuesta inmunológica.^{76,77}

Un asunto importante relacionado al implante alogénico es el rechazo inmunológico. Con Dermagraft se han colocado aproximadamente 90 000 implantes en más de 25 000 pacientes sin un solo caso de rechazo. En 50 pacientes se hizo una evaluación de linfocitos B y en 25 pacientes de linfocitos T, después de recibir múltiples aplicaciones y ninguno produjo activación de las células; tampoco se encontraron células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas y endoteliales) en el área injertada.³⁸ Un estudio realizado en 8 pacientes con aplicación de Apligraf analizó la presencia de DNA alogénico en el sitio receptor, y encontraron que 2 meses después de la aplicación de injertos en ninguno de los pacientes persistió el DNA concluyendo que las células alogénicas de los sustitutos dérmicos no sobreviven de forma permanente, lo cual no permite que exista rechazo y por otro

lado, apoya las teorías de que existen otros mecanismos de acción de los injertos para el cierre de las úlceras como liberación de citocinas, soporte estructural y proveer un ambiente húmedo a la herida.⁷⁸

En cuanto al uso de apósitos biológicos e hidrocoloides, en un estudio comparativo en el cuál se evaluaron 47 pacientes con úlceras venosas se demostró que la tasa de curación, el porcentaje de reducción en el tamaño inicial de las úlceras, y la progresión radial hacia el cierre de la herida fue significativamente mayor en los pacientes tratados con el aloinjerto.⁷⁹ Es importante mencionar, que no existen estudios reportados en la literatura que comparen apósitos biológicos de fibroblastos en matriz de fibrina con apósitos hidrocoloides.

En un metaanálisis realizado por Palfreyman y cols.⁸⁰ concluyen que no existen pruebas de que cualquier apósito de la herida sea mejor que un apósito simple para la cicatrización de la úlcera de la pierna. Hay muchas clases de apósitos que se utilizan para el tratamiento de las úlceras venosas, generalmente debajo de las vendas de compresión, sin embargo, hubo pruebas de beneficio adicional asociado con los apósitos de la herida, con excepción de los apósitos simples, cuando se utilizan debajo de la compresión. No hubo pruebas de diferencia en las tasas de cicatrización entre otros apósitos, pero la mayoría de los estudios son demasiado pequeños como para permitir descartar las diferencias importantes. Concluyen que los apósitos simples, no adhesivos, de bajo costo, deben utilizarse debajo del tratamiento de compresión a menos que tengan prioridad otros factores, como la preferencia del paciente. Cabe mencionar que en este metaanálisis no incluyeron la comparación de apósitos dérmicos con hidrocoloides.

En lo que se refiere a un apósito dérmico con una base de fibrina existe un estudio realizado en el 2006 por Llamas y colaboradores⁵², quienes desarrollaron un modelo de piel completa (dermis y epidermis) para el tratamiento de quemaduras severas. Las células (fibroblastos y queratinocitos) fueron obtenidas

mediante biopsias de piel y una doble digestión enzimática. Posterior al período de expansión, los fibroblastos fueron sembrados en una dermis artificial a base de plasma humano. Las biopsias fueron obtenidas de 20 pacientes (13 quemados, 5 con nevos gigantes, 1 con enfermedad de injerto contra huésped, 1 con neurofibromatosis). Se obtuvieron cerca de 97,525 cm² de piel cultivada por ingeniería. El constructo cutáneo fue aplicado en los pacientes con un cierre del 10 a 90% en pacientes con quemaduras severas, y de 70 a 90% en el resto de los pacientes. La epitelización fue permanente en todos los casos. Durante el período de seguimiento, no hubo presencia de pérdida del epitelio, formación de ampollas o retracción de la piel. Los resultados estéticos y funcionales fueron bien aceptados. Concluyen que la piel artificial es útil como tratamiento definitivo en pacientes con lesiones dérmicas severas, y que puede ser fabricado en un laboratorio y posteriormente ser distribuido a gran número de centros hospitalarios.

En cuanto al apósito dérmico fabricado por investigadores de la UNAM, se basa en el modelo de Llames y cols,⁵² pero sin queratinocitos (únicamente fibroblastos en una base de fibrina). Ellos han tratado 5 pacientes, 2 presentaban úlceras de pie diabético, uno con una úlcera varicosa, uno con una úlcera necrótica por inmovilización inadecuada de una fractura luxación y otro más por una amputación de miembro superior izquierdo por necrosis y datos de infección con tejido muscular expuesto.^{81,82}

A todos los pacientes se les desbridó el tejido necrótico y se les aplicó el apósito dérmico de forma semanal. Como controles fueron utilizadas heridas cutáneas de los mismos pacientes que no se cubrieron con el equivalente dérmico. Se evaluaron los tiempos de cicatrización y la medida de las heridas. En cuanto a los resultados, a los 8 días de tratamiento el tamaño de las heridas disminuyó en un 25 % y a los 15 días hasta en un 60 % comparado con los controles. Al mes del tratamiento el 100 % de las heridas cerraron con una buena reepitelización. No hubo efectos indeseables asociados al tratamiento con los

equivalentes dérmicos. En conclusión los equivalentes dérmicos son una buena alternativa para el tratamiento de heridas cutáneas debido a la rapidez de cicatrización y la disminución en el costo de tratamiento, sin embargo, se requieren estudios con un mayor número de pacientes para demostrar su eficacia.

3. JUSTIFICACION

Las úlceras venosas afectan al 1% de la población mundial, una cifra que se incrementa conforme aumenta la esperanza de vida.⁸³

La incidencia de úlceras venosas en México es desconocida pues no existen estadísticas adecuadas. Sin embargo, tomando el ejemplo de Canadá, se calcula que la incidencia en la población general es de 1.8 por 1000 habitantes.⁸⁴ La prevalencia en los Estados Unidos se calcula en 0.06 a 2%⁸⁵ o 2.5 millones de personas por año.⁴⁰ En un estudio de Gelfand et al.⁸⁶ en 29,189 pacientes demostraron que en la semana 12, el 45.2% los pacientes habían sanado y que para la semana 24 esto aumentó sólo al 65.6%. Estos investigadores demostraron que los factores más importantes para predecir un mal pronóstico son úlceras de mayor tamaño (>6cm) y tiempo de evolución (> 6 meses).⁸⁷

De acuerdo a estas cifras es muy grande la demanda en atención médica por diagnóstico de estos padecimientos y reflejan la gran magnitud e importancia de este problema de salud en la población.

El tratamiento convencional de las úlceras venosas es el uso de compresión. El manejo local de la herida incluye la desbridación del tejido necrótico, el control de la carga bacteriana mediante antisépticos y el manejo del exudado con apósitos adecuados como son los hidrocoloides. En las úlceras que no respondan al manejo convencional se pueden utilizar apósitos biológicos.

La aplicación de apósitos biológicos ha demostrado ser una excelente herramienta en el tratamiento de úlceras venosas a nivel mundial, sin embargo, su

costo de producción es muy elevado por la infraestructura y el material con el cual se elaboran.^{48,88}

El desarrollo de un apósito dérmico a partir de fibroblastos cultivados *in vitro* basados en una matriz de fibrina disminuirá el costo del tratamiento sin modificar su eficacia.

Además, cabe destacar que es el primer apósito dérmico fabricado en nuestro país y por investigadores del Laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM; por lo tanto, su aplicación y difusión es una gran aportación para la investigación en México.

4. HIPOTESIS

Si los apósitos dérmicos con base de fibrina poseen células y factores de crecimiento similares a los que se encuentran en la dermis normal, entonces es de esperar que al ser aplicados en úlceras venosas la velocidad de cierre de la lesión será mayor en comparación con aquellas en las que se aplicarán parches hidrocoloides.

Los centímetros que disminuye el área de la herida tratada con el apósito dérmico fabricado *in vitro* es mayor a los centímetros que disminuye el área de la herida tratada con el hidrocoloide.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL:

Comparar la eficacia de un apósito dérmico fabricado *in vitro* a partir de fibroblastos en una matriz de fibrina contra apósitos hidrocoloides en pacientes con úlceras venosas de miembros pélvicos.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Comparar el tiempo de cicatrización con el apósito biológico dérmico con el apósito hidrocoloide en el tratamiento de pacientes con úlceras venosas.
2. Comparar la efectividad terapéutica del apósito biológico dérmico con el apósito hidrocoloide en el tratamiento de pacientes con úlceras venosas.
3. Comparar la tolerabilidad terapéutica del apósito biológico dérmico con el apósito hidrocoloide en el tratamiento de pacientes con úlceras venosas.
4. Comparar la seguridad terapéutica del apósito biológico dérmico con el apósito hidrocoloide en el tratamiento de pacientes con úlceras venosas.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Tipo de Estudio

Estudio clínico ciego, aleatorizado y controlado, analítico, longitudinal, prospectivo.

6.2. Ubicación Temporal y Espacial

El estudio se realizó en la Clínica Interdisciplinaria para el Cuidado de Heridas y Estomas del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y el Laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Universo del estudio

Pacientes que acudan a la Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Heridas y Estomas (CICHE) de la división de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” con diagnóstico de úlcera venosa.

6.3. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión

1. Pacientes con diagnóstico clínico de úlcera venosa en miembros inferiores que acuden a la Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Heridas y Estomas (CICHE) de la división de dermatología. Hospital General Dr. Manuel Gea González.
2. Pacientes de ambos géneros.
3. Que firmen carta de consentimiento informado.
4. Pacientes mayores de 18 años
5. Úlceras sin tejido necrótico y con más del 80% de tejido de granulación.
6. Pacientes con Índice tobillo brazo de 1 ± 0.2

Criterios de Exclusión

1. Pacientes con infección local agregada.
2. Pacientes Diabéticos.
3. Pacientes que por sus creencias religiosas no acepten la aplicación de injertos.
4. Pacientes a los que se les administre inmunosupresores o bajo inmunosupresión por otra causa.
5. Pacientes con úlceras que se extiendan por debajo de la fascia muscular
6. Pacientes que estén siendo tratados con vasoconstrictores.
7. Pacientes con úlceras de superficie total mayor a 20 cm^2
8. Embarazo

Criterios de Eliminación

1. Pacientes que dejen de acudir a 2 citas consecutivas
2. Embarazo durante el ensayo clínico

6.4. Variables

a) Independientes

Número de tratamiento experimental. Tratamiento bajo investigación, consiste en la aplicación del apósito biológico dérmico fabricado con fibroblastos cultivados *in vitro* en una matriz de fibrina, seguido de vendaje compresivo, el cambio del apósito se realiza una vez por semana hasta el final del estudio o lograr la cicatrización.

Número de tratamiento control. Tratamiento que se utiliza con fines de comparación, consiste en la aplicación de parche hidrocoloide seguido de vendaje compresivo, el cambio del apósito se realiza de 24 a 72 hrs dependiendo la cantidad de exudado.

Edad. Años

Sexo. Hombre o Mujer.

Tiempo de evolución. Meses. Variable.

Area afectada basal. Medición de la úlcera en cm².

b) Dependientes.

Área semanal. Determinación semanal del área de la úlcera en cm².

Islas de epitelio. Porcentaje de islas de epitelio en la herida. Medida en porcentaje de 0 a 100%.

Tejido de granulación. Porcentaje de tejido de granulación en la herida. Medida de porcentaje de 0 a 100%.

Fibrina. Porcentaje de fibrina en la herida. Medida en porcentaje de 0 a 100%.

Necrosis. Porcentaje de tejido necrótico en la herida. Medida en porcentaje de 0 a 100%.

Largo. Longitud de la herida medida cada semana. Medida en porcentaje de 0 a 100%.

Ancho. Longitud de la herida medida cada semana. Medida en porcentaje de 0 a 100%.

Cantidad de exudado. Cantidad de exudado que presenta la herida. Se asignó el valor de 0 a herida seca, 1 a herida húmeda, 2 a herida con exudado moderado y 3 a herida con exudado abundante.

Tipo de exudado. Características morfológicas del exudado. Se asignó el valor de 0 sin exudado, 1 seroso o serohemático, 2 seropurulento y 3 francamente purulento.

Fiebre. Presencia de fiebre secundaria a la herida (>38.3°C). Se asigna el valor de 0 si está ausente o 1 presente.

Eritema perilesional. Eritema perilesional >2 cm. Se asigna el valor de 0 si está ausente o 1 si está presente.

Olor. Presencia de fetidez en la herida de acuerdo al evaluador. Se asigna el valor de 0 si está ausente y 1 si está presente.

Intensidad del olor. Caracterizar el olor fétido de acuerdo a la percepción del médico como 0=sin olor, 1= olor que se percibe de cerca, 2=olor que se percibe de lejos, 3=olor en toda la habitación, 4=olor que sale de la habitación.

Borde de la úlcera. Características cualitativas del borde de la herida. Se asignó el valor de 0= Efecto de borde presente (como playa), 1= Borde adherido pero sin efecto de borde (como barranco), 2= Borde inflamado o irritado, 3= Borde socavado.

Maceración. Presencia de maceración alrededor de la úlcera. Ausente o presente, Variable: Escala.

Edema. Presencia de aumento de volumen (edema) en la extremidad afectada. Se asignó valor de 0=ausencia, 1= Mínimo, 2= Leve (1+), 3= Moderado (2+), 4= Severo (3+)

Cultivo. Determinar si se realizó tomade cultivo en la visita. Si o No.

Escala visual análoga del dolor. Escala por la cual el paciente determina del 1 al 10 la intensidad del dolor de la herida.

6.5. Tamaño de la Muestra

Con un valor alfa de 0.05 y un poder del 80%, considerando lo reportado por Robert G y colaboradores⁵⁰ que con el hidrocloide el promedio de cierre a las 6 semanas es de 0.87 cm (DE 0.418), mientras que con un injerto epidérmico criopreservado fue de 1.03 cm (DE 1.03).

$$(S_1^2 + S_2^2) \left(\frac{1.96 + 0.84}{[x_1 - x_2]^2} \right) = (0.174 + 1.0609) \left(\frac{2.8^2}{[0.87 - 1.7]^2} \right) = 14.24$$

Considerando una pérdida de 30% en el seguimiento, el tamaño de muestra se aumentará a 19 pacientes por grupo.

6.6. Descripción de procedimientos

Los apósitos biológicos se elaborarán en el laboratorio de Ingeniería Tisular e Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, mediante el siguiente procedimiento.

Protocolo para construcción de apósito dérmico en base de fibrina⁵².

1. OBTENCIÓN DE MUESTRA CELULAR

1.1 OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS. Los fibroblastos fueron obtenidos de una paciente de 4 años de edad con quemaduras de segundo y tercer grado, sin otros antecedentes de importancia, a quien se le aplicó un apósito dérmico autólogo. En quirófano bajo condiciones asépticas se toma con dermatomo una muestra de piel de aproximadamente 1cm² de superficie y de espesor parcial, inmediatamente se coloca en medio de cultivo suplementado con antibiótico para cultivo celular (anfotericina Beta y estreptomycin GIBCO) y se transportan al laboratorio.

1.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA. En el laboratorio dentro de la campana de flujo laminar se retira el medio de transporte y la muestra se transfiere a un tubo de centrifuga de 50 ml nuevo, en el se coloca alcohol al 70% (puede utilizarse cloruro de benzalconio 0.01%) y se lava el espécimen durante 30-60 segundos, se retira el alcohol y se dan 3 - 5 lavados con HBSS (Solución salina balanceada de Hanks) estéril de 3 minutos cada uno, posteriormente se retira la solución de lavado y el tejido es transferido a una caja de Petri estéril donde se fragmento con una navaja de bisturí en pedazos de 1-2 mm², los fragmentos de piel son transferidos a un nuevo que contiene medio de digestión (DMEM/ antibiótico 1% / colagenasa IV 20mg/ml) y se deja incubar durante 5 - 18 hrs en baño maría con agitación a 37°C hasta que la dermis se haya digerido completamente. Posteriormente se colecta el sobrenadante, se filtra a través de una maya de nylon con poro de 100um para retirar restos tisulares.

1.3. CULTIVO CELULAR. La suspensión celular obtenida previamente se lava dos veces con medio de crecimiento (DMEM/SFB 10% / anti biot 1%) por centrifugación con 10 minutos a 1200 rpm. Se desecha el sobrenadante y el botón celular se re-suspende en 1ml de medio, posteriormente se determina densidad y viabilidad con la técnica de azul tripano.

La suspensión celular se siembra en botellas de cultivo de 25 cm² con medio de crecimiento y se deja en cultivo hasta que alcance confluencia. Los fibroblastos se pueden expandir en una proporción hasta 1:5, dependiendo de las necesidades y la cantidad de células cultivadas se pueden tomar algunas muestras para congelación (DMEM/SFB 20%/DMSO 10%).

2. CONSTRUCCIÓN DE LA LÁMINA DERMICA.

La fibrina será obtenida de plasma, el cuál será donado por el departamento de Banco de Sangre del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Al plasma se le realizarán los estudios necesarios para descartar la presencia de enfermedades infecto-contagiosas.

Para la construcción se estima el número de fibroblastos necesarios dependiendo de la superficie requerida a construir, de acuerdo a la siguiente proporción

Plasma humano	10ml
NaCL 0.9%	12ml
Ac. Tranexámico	400ul
Suspensión celular	2ml (50-100 mil células/placa de 75cm ²)
CaCL 1%	2ml (Se coloca hasta el final ya que este promueve la

Finalmente se deja incubar durante 60min en la incubadora de CO₂, y una vez solidificada la lámina dérmica, se deja en cultivo con 10ml medio de crecimiento hasta su utilización.

3. ENVIO DEL APÓSITO DÉRMICO AL HOSPITAL

El montaje y la preparación de las láminas para trasplante se realizará fijando estas a un soporte sólido (gasa no vaselinada estéril), mediante el empleo de pequeñas gotas de Histoacryl en el borde de la lámina. Las láminas de piel cultivada se envían enrolladas sobre sí mismas dentro de un tubo cónico estéril lleno de DMEN a temperatura ambiente. Junto a las láminas se enviará el formulario con las instrucciones para su correcto uso.

4. CONTROL DE CONTAMINACIÓN.

El medio de cultivo sobrenadante de la lámina que se va a enviar se colecta y transfiere a una nueva placa de cultivo de 5 cm de diámetro y se deja cultivando durante 48 hrs, posteriormente se toma una muestra y se determina por microscopia y por inmunodetección la presencia de bacterias o endotoxinas por medio del kit de detección mycokill (PAA). Dicha detección se hace antes de que se envíe la muestra a la institución hospitalaria.

Los constructos cutáneos se harán llegar a la Clínica de Heridas donde participarán 2 médicos y 2 enfermeras. El médico será el encargado de la aplicación de los constructos cutáneos y de supervisar, capacitar y certificar al personal de enfermería para su aplicación, así como de la selección de los pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión que se deben cumplir.

6.7. Análisis Estadístico

La información recabada será recolectada en hojas de recolección de datos. La asignación aleatoria se realizará generando números aleatorios mediante Excel XR. Se utilizará el paquete estadístico denominado "Biomedical Computer Programs, D-Series"

Las variables nominales y ordinales se resumirán en frecuencias absolutas y proporciones. Se realizará prueba de Kolmogorov-Smirnoff para determinar la distribución de las variables cuantitativas. Si tienen distribución normal, se

resumirán en medias y desviaciones estándar, de no tener distribución normal, se resumirán en mediana y valores mínimo y máximo.

Por tener dos o más muestras, se utilizará estadística inferencial. Se comparará cada una de las variables de desenlace entre los grupos de tratamiento. Para la comparación de variables nominales, se realizará prueba de χ^2 . En el caso de las variables cuantitativas, por ser un tamaño de muestra menor de 60, se realizará prueba T de Student en caso de tener distribución normal, de no tenerla, se realizará la prueba U de Mann-Whitney.

En el análisis multivariado se realizará T^2 de Hotelling para comparar el promedio de cierre de las heridas en cada grupo de tratamiento.

6.8. Descripción Operativa del Estudio

A) Reclutamiento de los pacientes.

El médico encargado seleccionará casos de úlcera venosa en miembros inferiores de la consulta externa que cumplan los criterios de inclusión. A los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión, se le informará sobre los objetivos del proyecto, y una vez que haya aceptado participar, deberá firmar la carta de consentimiento informado (anexo 1).

B) Asignación

Asignación de los tratamientos. La asignación de los tratamientos se realizará de una forma aleatorizada utilizando una lista secuencial elaborada en base a una tabla de números aleatorios (aleatorizados).

C) Seguimiento y procedimiento general.

La aplicación de los apósitos y la posterior evaluación de los tratamientos se llevarán a cabo por diferente persona, de esta manera el estudio estará cegado al evaluador. Se realizará los siguientes procedimientos:

VISITA INICIAL

1. Se llenará hoja de recolección de datos inicial (anexo 2).
 2. Toma de fotografía.
 3. Medición clínica de la herida.
 4. Aplicación de tratamiento asignado.
- 5.1 En caso de pacientes incluidos en el grupo de Apósito biológico se llevará acabo el siguiente procedimiento:
7. Desbridar el lecho de la herida en caso necesario.
 8. Sacar el constructo cutáneo del tubo de la siguiente manera:
 - Romper la cinta de “Parafilm” que está adherido al tapón del tubo.
 - Girar el tapón del tubo.
 - Utilizar unas pinzas estériles, de preferencia sin dientes, para extraer el constructo cutáneo.
 9. Una vez que el constructo cutáneo es retirado del tubo, con cuidado hay que desdoblarlo sobre la mano cubierta con un guante estéril.
 10. Notar que el constructo cutáneo viene adherido a un “tul” mediante un pegamento orgánico de color azul. El constructo cutáneo está en la parte inferior cuando del lado derecho y lejos del observador hay un corte en una esquina del tul. (Figura 1.)
 11. No intente separar el “tul” del constructo cutáneo porque éste se destruirá. El tul esta estéril y viene junto con el constructo para facilitar el manejo del constructo.
 12. Colocar el constructo cutáneo sobre el lecho de la úlcera.

Figura 1. Apósito dérmico.



5.2 En caso de ser paciente incluido en el grupo de apósito hidrocoloide llevar a cabo el siguiente procedimiento:

1. Desbridar el lecho de la herida en caso necesario.
2. De forma estéril sacar el apósito de su envoltura.
3. Cortar el apósito del tamaño de la úlcera.
4. Retirar el plástico que cubre el área de aplicación del apósito.
5. Colocar apósito sobre el lecho de la úlcera.

6. Aplicación de gasas y vendaje compresivo con Elastomedic 10 cm x 5 m colocada desde la punta de los dedos a la rodilla.

Instrucciones al paciente.

En caso de ser pacientes de Constructo cutáneo se indicará mantener el área ocluida hasta su siguiente cita (cada 8 días), únicamente con cambio de vendaje compresivo.

En caso de ser paciente de Parche hidrocoloide se capacitará para el aseo con agua y aplicación del apósito en el sitio de la úlcera cada 48 hrs, con posterior aplicación de gasas y vendaje compresivo.

En ambos casos se dará cita para evaluación semanal.

EVALUACIÓN SEMANAL

1. Retiro del vendaje compresivo

2. Retiro de las gasas previo uso de agua limpia o solución fisiológica para desprenderlas.
3. Lavado de la herida sin tallar solo con agua o solución fisiológica.
4. Toma de fotografía con colocación de dos etiquetas graduadas (una horizontal y una vertical) al lado de la úlcera.
5. Medición del largo, ancho como se describió previamente
6. En caso necesario, debridar la úlcera para remover tejido necrótico o hiperqueratósico.
7. Llenado de las formas de evaluación semanal. (Anexo 3)
8. Aplicación del tratamiento asignado.
9. Cobertura con gasas de la zona ulcerada
10. Vendaje compresivo

La vigilancia y el control clínico se llevarán a cabo durante 8 semanas o bien hasta declararse éxito terapéutico.

EVALUACIÓN FINAL

Ésta se realizará a las 8 visitas. Antes de dar de alta a los pacientes se llevarán a cabo los siguientes procedimientos:

1. Fotografía del área ulcerada
2. Limpieza de la herida previamente descrita
3. Toma de fotografía
4. Llenado de la última forma de reporte de caso y efectos adversos.
5. Se revisará que todo el expediente esté completo y lleno.

7. RESULTADOS

Al momento tenemos incluidos 27 pacientes con diagnóstico de úlcera venosa de miembros pélvicos, de los cuáles 12 se encuentran en el grupo de apósito dérmico y 14 en el de apósito hidrocoloide.

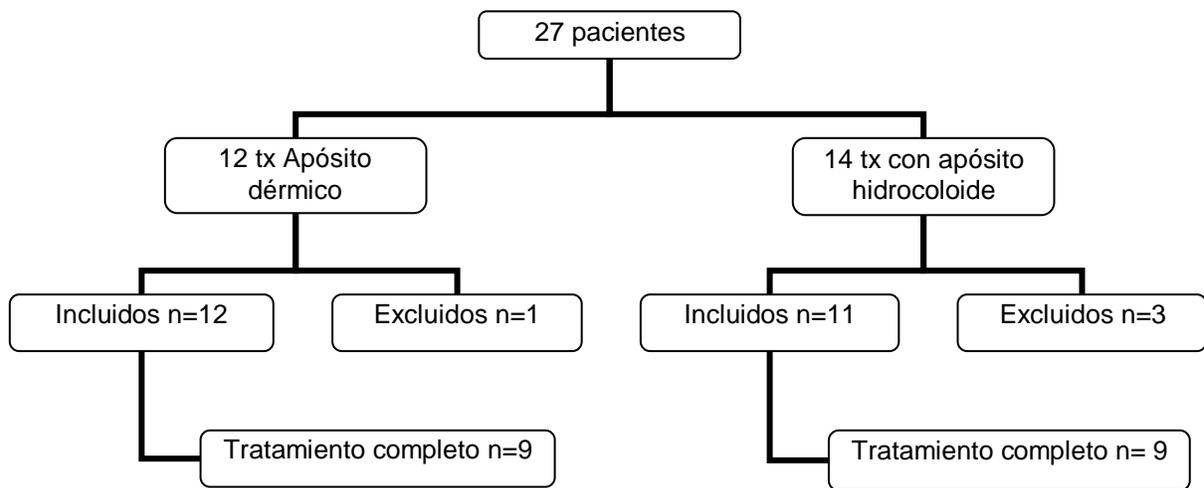
Se eliminaron 4 pacientes, 1 del grupo de apósito dérmico que falleció por causas ajenas al tratamiento (insuficiencia cardiaca descompensada y neumonía); y 3

pacientes del grupo de apósito hidrocoloide por falta de apego al tratamiento (dejaron de asistir a más de dos consultas consecutivas).

En este momento, de los 12 pacientes del grupo de apósito dérmico, 9 ya completaron las 8 visitas, y de los 14 pacientes del grupo con apósito hidrocoloide, 9 ya completaron las 8 visitas.

En la Figura 2 se muestra la distribución de los pacientes por grupo.

Figura 2. Pacientes en el estudio.



De los 18 pacientes que ya completaron el seguimiento, 12 fueron hombres y 6 mujeres, representando el 66.66% y 33.33% respectivamente. De los pacientes incluidos y que completaron las 8 visitas 9 estuvieron en el grupo del apósito dérmico y 9 en el grupo de apósito hidrocoloide.

La media de edad de los pacientes fue de 57.18 años con un rango de 42 a 82 años. La media del tiempo de evolución fue de 59 meses con un rango de duración de 1 a 360 meses.

La tabla 1 muestra las características demográficas de ambos grupos.

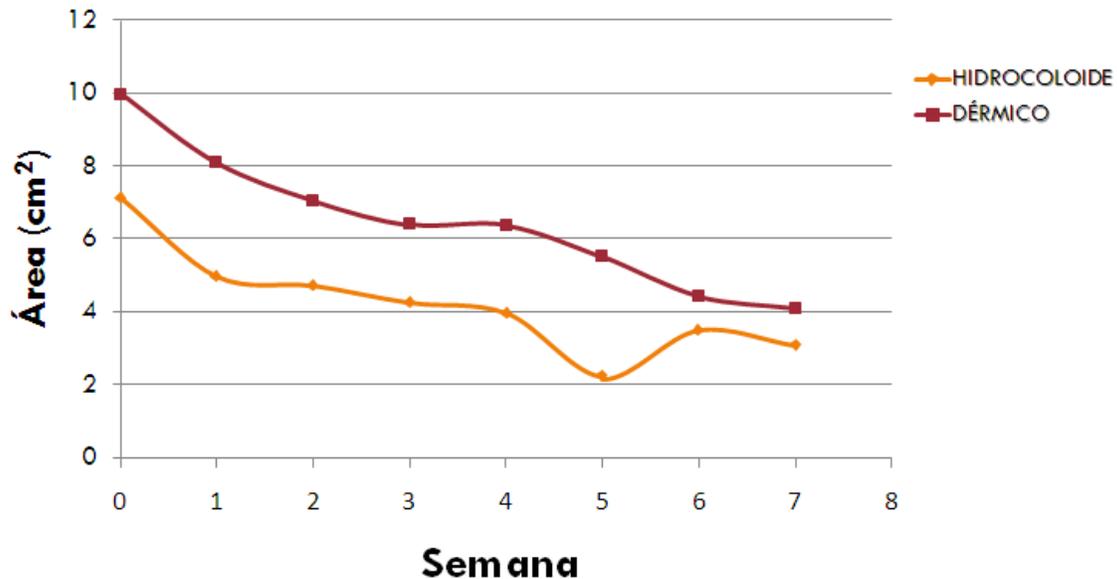
Tabla 1. Características demográficas de los pacientes en ambos grupos.

	APOSITO DÉRMIICO	APOSITO HIDROCOLOIDE	Valor p
Género			
Masculino	6 (33.3%)	6 (33.3%)	
Femenino	3(16.6%)	3 (16.6%)	
Edad (años)	61	62	0.38
Rango	(42-81)	(52-82)	
Duración (meses)	93	29	0.18
Rango	(2-360)	(1-84)	
Área inicial (cm ²)	10	7.16	0.45
Mediana	8.83 (2.79-230)	5.38 (2.55-11.37)	
Comorbilidades	<ul style="list-style-type: none"> - Osteoartosis - Insuficiencia hepática - Insuficiencia cardiaca - Trombosis venosa profunda - Hiperplasia prostática benigna - Hipertensión arterial sistémica - Artritis reumatoide - Linfoma no Hodgkin 	<ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión arterial sistémica - Dermatitis por contacto - Enfermedad ácido péptica - Obesidad mórbida - Osteoartritis - Insuficiencia cardiaca 	

El área basal en el grupo de apósito hidrocoloide en cm² fue de 7.16 y de 10 en el apósito dérmico sin diferencia estadística en ambos grupos (p=0.281); y a las 7 semanas de 3.09 cm² en el grupo de apósito hidrocoloide y 4.10 en el de apósito dérmico, tampoco hubo diferencia significativa (p=0.463). La media de reducción con el apósito hidrocoloide fue de 4.07 cm² (IC 95% 2.25- 7.21), mientras que en el grupo de apósito dérmico de 5.90 cm² (IC 95% 3.54-8.12), no hubo diferencias significativas entre ambos grupos (p=0.31).

Al analizar el área de la úlcera, la media de reducción fue de 71.4% con el apósito dérmico vs 68% con el apósito hidrocoloide ($p=0.726$), en cuanto a la velocidad de cierre por semana en cm^2 fue de 2.08 en el grupo de apósito dérmico vs 0.94 en el grupo de apósito hidrocoloide (Gráfica 1).

Gráfica 1. Promedio de reducción semanal en ambos grupos.



En cuanto a las características clínicas de la úlcera los parámetros evaluados fueron la presencia de tejido de granulación, fibrina, islas de epitelio y necrosis. El tejido de granulación mejoró en promedio 8.22% en el apósito dérmico comparado con el hidrocoloide ($p=0.592$); la cantidad de fibrina disminuyó un 8.57% más en el grupo de apósito dérmico ($p=0.676$). En cuanto a las islas de epitelio no hubo diferencia en ambos grupos, y ningún paciente presentó necrosis del lecho durante el tratamiento. En cuanto a la cantidad de exudado en el grupo de apósito hidrocoloide al inicio del estudio el 100% de los pacientes tenían exudado leve y a las 7 semanas el 28.5% incrementó el exudado a moderado, el 71.5% continuó leve, mientras que en el grupo de apósito dérmico el 100% inició con exudado leve, y a las 7 semanas el 75% no tenía exudado y el 15% continuó leve. En ambos grupos hubo cierre completo de la úlcera en 2 pacientes (Figuras 3 y 4).

El dolor se evaluó en una escala de intensidad del 1 al 10 y se observó que los pacientes con apósito hidrocoloide disminuyeron 2.71 puntos en la escala (de 5.7 a 3) mientras que en el grupo de apósito dérmico fue de 3.14 puntos (de 4.7 a 1.43), sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p=0.284$).

Figura 3. Pacientes del grupo de apósito dérmico. **A.** Paciente al inicio del tratamiento y **B.** Paciente al final del tratamiento (cierre a las 4 semanas). **C.** Paciente al inicio del tratamiento y **D.** Paciente al final del tratamiento (cierre a las 7 semanas).

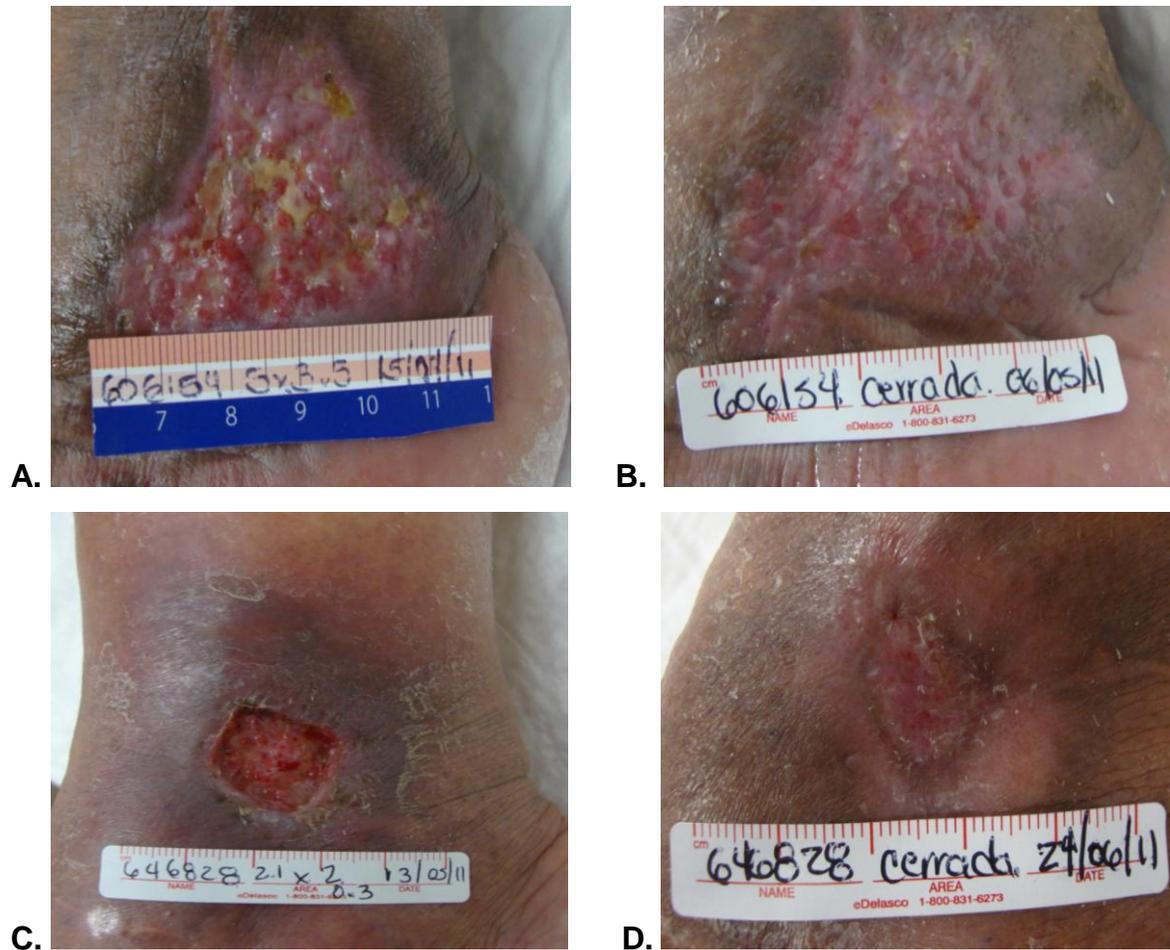
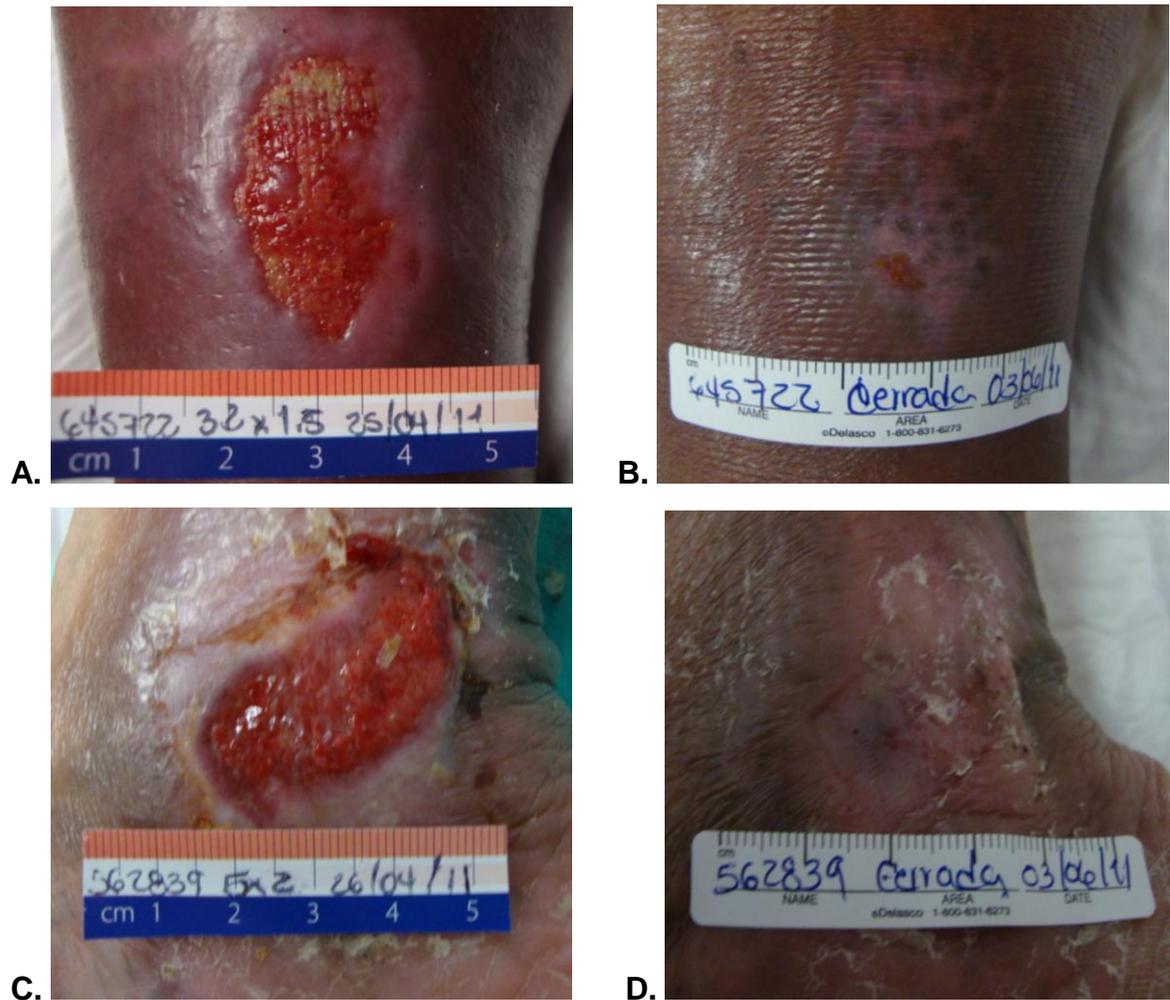


Figura 4. Pacientes del grupo de apósito hidrocólicoide. **A.** Paciente al inicio del tratamiento y **B.** Paciente al final del tratamiento (cierre a las 7 semanas). **C.** Paciente al inicio del tratamiento y **D.** Paciente al final del tratamiento (cierre a las 6 semanas).



8. DISCUSION

La úlcera venosa de miembros inferiores es un padecimiento frecuente y representa un problema de salud en nuestro país. El manejo convencional es mediante la compresión con medias o vendaje, además de la limpieza y desbridación. Sin embargo, no existe aún el tratamiento ideal que favorezca la cicatrización de este tipo de heridas crónicas.

Los apósitos dérmicos se han utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de heridas cutáneas como quemaduras, úlceras de pie diabético y úlceras venosas, sin embargo, su costo es muy elevado por la infraestructura y los insumos para su producción ya que la mayoría están elaborados con colágena y esto los ha hecho un recurso de poco acceso para los pacientes.

Por este motivo, se han buscado alternativas en la elaboración de estos apósitos con material de bajo costo como la fibrina, la cual puede obtenerse del plasma de pacientes que donan en los bancos de sangre.

En un estudio realizado en el 2006 por Llames y colaboradores⁵², desarrollaron un modelo de piel completa (dermis y epidermis) para el tratamiento de quemaduras severas, neurofibromatosis, nevos congénitos y enfermedad injerto contra huésped. El constructo cutáneo fue aplicado en los pacientes con un cierre del 10 a 90% en pacientes con quemaduras severas, y de 70 a 90% en el resto de los pacientes. La epitelización fue permanente en todos los casos. Durante el período de seguimiento, no hubo presencia de pérdida del epitelio, formación de ampollas o retracción de la piel. Los resultados estéticos y funcionales fueron bien aceptados.

Con base en este protocolo de estudio se ha perfeccionado la técnica de elaboración de un apósito dérmico fabricado con fibroblastos en una matriz de fibrina en el Laboratorio de Inmunoterapia Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, el cual se ha aplicado en un número reducido de pacientes con quemaduras, pie diabético y úlceras venosas. Sin embargo, es necesario realizar protocolos con una muestra suficiente de pacientes para evaluar su eficacia y seguridad.

En nuestro estudio la úlcera venosa fue más frecuente en el sexo masculino, sin que esto fuera estadísticamente significativo, y en el resto de las características demográficas tampoco hubo diferencias significativas. El tiempo de evolución fue

mayor en el grupo de apósito dérmico, aunque sin diferencia significativa, por lo cual es posible que esto haya influido en el tiempo de cicatrización.

Ambos grupos demostraron reducción en la superficie de la úlcera al final del tratamiento. No existieron diferencias significativas en este porcentaje. En el grupo de pacientes del apósito dérmico la reducción porcentual del área de la herida fue mayor que en el grupo de apósito hidrocoloide aunque sin diferencia significativa, además se observó mejoría en las características del lecho de la herida como aumento en el tejido de granulación y de islas de epitelio y disminución en la cantidad de fibrina y de exudado.

También se observó que en los pacientes con apósito dérmico disminuyó el dolor durante el tratamiento, lo cual ya se ha reportado en otros estudios con apósitos celulares⁶⁵.

Como efectos secundarios se reportan 2 casos de infección en el grupo de apósito hidrocoloide y 1 en el grupo de apósito dérmico, y dermatitis por contacto en 1 paciente del grupo hidrocoloide y ninguno del apósito dérmico.

9. CONCLUSIONES

Al momento no existe ningún estudio con un grupo de más de 20 pacientes y comparativo al cuál se le haya aplicado este apósito dérmico, ni otros apósitos fabricados con fibrina y fibroblastos, por lo tanto este es el primer estudio que cumple estos dos requisitos, aunque al momento no se ha completado la muestra y los resultados aún no son concluyentes.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados actuales se ha visto que con el apósito dérmico la velocidad de cierre es mayor, y existe una mejoría en las características del lecho de la herida aumentando el tejido de granulación, disminuyendo la cantidad de fibrina y no favorece la presencia de tejido necrótico.

El único efecto adverso que se ha presentado con el apósito dérmico es la infección en un paciente, sin embargo, también se presentó en el grupo de apósito hidrocoloide en un número mayor de pacientes.

10. PERSPECTIVAS

La úlcera venosa es un problema de salud pública cuyo impacto en la población económicamente activa es muy alto. Es de gran importancia llevar a cabo investigación de nuevos tratamientos que optimicen el tiempo y los recursos para curar a estos pacientes.

No existe a la fecha un tratamiento idóneo que cumpla los dos requisitos de ser efectivo y de bajo costo, por lo tanto el apósito de fibroblastos y fibrina puede ser un tratamiento eficaz.

Se deberá completar el número de muestra de pacientes para poder obtener resultados concluyentes, sin embargo, al momento se sugiere que el apósito dérmico puede ser una alternativa en el tratamiento de úlceras venosas.

Es probable que el beneficio obtenido con el apósito dérmico en el tratamiento con úlceras venosas se pueda extrapolar a otro tipo de heridas en la piel como quemaduras, úlceras de pie diabético y de otras etiologías, por lo que se deberá continuar su estudio y aplicación clínica y así difundir este producto fabricado por investigadores de nuestro país.

11. BIBLIOGRAFIA

- (1) Wong, D. J. and Chang, H. Y. Skin tissue engineering. Stembook . 2009. StemCell Ed. 23-11-2010. Ref Type: Electronic Citation
- (2) Hayes DW, Jr., Webb GE, Mandracchia VJ, John KJ. Full-thickness burn of the foot: successful treatment with Apligraf. A case report. *Clin Podiatr Med Surg.* 2001;18:179-188.
- (3) Gartner LP, Hiatt JL. *Texto Atlas de Histología.* 2a ed. Mexico: McGraw Hill Interamericana; 2002.
- (4) Navsaria HA, Sexton C, Bouvard V, Leigh IM. Growth of keratinocytes with a 3T3 feeder layer: basic techniques. In: Leigh IM, Watt FM, eds. *Keratinocyte Methods.* Cambridge: Cambridge University Press; 1994:2-12.
- (5) Karasek MA. Growth and differentiation of transplanted epithelial cell cultures. *J Invest Dermatol.* 1968;51:247-252.
- (6) Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738-746.
- (7) Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns.* 2007;33:405-413.
- (8) Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med.* 2005;9:592-608.
- (9) Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg.* 2002;55:185-193.
- (10) Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1018-1029.
- (11) MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature.* 2007;445:874-880.
- (12) Patel M, Fisher JP. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. *Pediatr Res.* 2008;63:497-501.
- (13) Kremer M, Lang E, Berger AC. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix(Integra artificial skin). *Br J Plast Surg.* 2000;53:459-465.
- (14) Rennekampff HO, Hansbrough JF, Woods V, Jr., Kiessig V. Integrin and matrix molecule expression in cultured skin replacements. *J Burn Care Rehabil.* 1996;17:213-221.

- (15) Ley-Chavez E, Martinez-Pardo ME, Roman R, Oliveros-Lozano FJ, Canchola-Martinez E. Application of biological dressings from radiosterilized amnios with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients. *Ann Transplant.* 2003;8:46-49.
- (16) Wang HJ, Chou TD, Tsou TL et al. The application of new biosynthetic artificial skin for long-term temporary wound coverage. *Burns.* 2005;31:991-997.
- (17) Vloemans AF, Middelkoop E, Kreis RW. A historical appraisal of the use of cryopreserved and glycerol-preserved allograft skin in the treatment of partial thickness burns. *Burns.* 2002;28 Suppl 1:S16-S20.
- (18) Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet.* 2005;366:1736-1743.
- (19) Saap LJ, Falanga V. Debridement performance index and its correlation with complete closure of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 2002;10:354-359.
- (20) Earle SA, Marshall DM. Management of giant congenital nevi with artificial skin substitutes in children. *J Craniofac Surg.* 2005;16:904-907.
- (21) Gallico GG, III, O'Connor NE, Compton CC, Remensnyder JP, Kehinde O, Green H. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84:1-9.
- (22) Carter DM, Lin AN, Varghese MC, Caldwell D, Pratt LA, Eisinger M. Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17:246-250.
- (23) Wollina U, Konrad H, Fischer T. Recessive epidermolysis bullosa dystrophicans (Hallopeau-Siemens)--improvement of wound healing by autologous epidermal grafts on an esterified hyaluronic acid membrane. *J Dermatol.* 2001;28:217-220.
- (24) Atala A. Tissue engineering in urology. *Curr Urol Rep.* 2001;2:83-92.
- (25) de LM, Albanese E, Megna M et al. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplantation.* 1990;50:454-459.
- (26) Chen YF, Yang PY, Hu DN, Kuo FS, Hung CS, Hung CM. Treatment of vitiligo by transplantation of cultured pure melanocyte suspension: analysis of 120 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:68-74.
- (27) Kumagai N, Uchikoshi T. Treatment of extensive hypomelanosis with autologous cultured epithelium. *Ann Plast Surg.* 1997;39:68-73.

- (28) Supp DM, Boyce ST. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol*. 2005;23:403-412.
- (29) Coulomb B, Friteau L, Baruch J et al. Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101:1891-1903.
- (30) Morimoto N, Saso Y, Tomihata K et al. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *J Surg Res*. 2005;125:56-67.
- (31) Bell E, Sher S, Hull B. The living skin-equivalent as a structural and immunological model in skin grafting. *Scan Electron Microsc*. 1984;1957-1962.
- (32) Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering for skin: an update. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39:1007-1010.
- (33) Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering and the development of Apligraf a human skin equivalent. *Adv Wound Care*. 1998;11:1-8.
- (34) Griffiths M, Ojeh N, Livingstone R, Price R, Navsaria H. Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue Eng*. 2004;10:1180-1195.
- (35) Hebda PA, Dohar JE. Transplanted fetal fibroblasts: survival and distribution over time in normal adult dermis compared with autogenic, allogenic, and xenogenic adult fibroblasts. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;121:245-251.
- (36) Sandulache VC, Zhou Z, Sherman A, Dohar JE, Hebda PA. Impact of transplanted fibroblasts on rabbit skin wounds. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129:345-350.
- (37) Sher SE, Hull BE, Rosen S, Church D, Friedman L, Bell E. Acceptance of allogeneic fibroblasts in skin equivalent transplants. *Transplantation*. 1983;36:552-557.
- (38) Mansbridge J. Commercial considerations in tissue engineering. *J Anat*. 2006;209:527-532.
- (39) Valencia IC, Falabella A, Kirsner RS, Eaglstein WH. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:401-421.
- (40) Brem H, Kirsner RS, Falanga V. Protocol for the successful treatment of venous ulcers. *Am J Surg*. 2004;188:1-8.
- (41) Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Smith PD, Nicolaidis AN, Boisseau MR, Eklof B. Chronic venous disease. *N Engl J Med*. 2006;355:488-498.

- (42) Fry J, Williams K, Lancaster-Smith M. *Enfermedades vasculares periféricas*. España: Manual Moderno; 1984.
- (43) Ross R, Garrido A. *Úlceras cutáneas rebeldes*. España: Salvat; 1985.
- (44) Leskowitz S, Sunshine G, Benjamin E. *Immunology: a short course*. 3rd ed. USA: American Association for Clinical Chemistry.; 1997.
- (45) Macri L, Clark RA. Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009;22:83-93.
- (46) Campitiello E, Della CA, Fattopace A, D'Acunzi D, Canonico S. The use of artificial dermis in the treatment of chronic and acute wounds: regeneration of dermis and wound healing. *Acta Biomed*. 2005;76 Suppl 1:69-71.
- (47) Dolynchuk K, Hull P, Guenther L et al. The role of Apligraf in the treatment of venous leg ulcers. *Ostomy Wound Manage*. 1999;45:34-43.
- (48) Falanga V, Margolis D, Alvarez O et al. Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group. *Arch Dermatol*. 1998;134:293-300.
- (49) Trent JF, Kirsner RS. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent. *Int J Clin Pract*. 1998;52:408-413.
- (50) Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108:1713-1726.
- (51) Llames SG, Del RM, Larcher F et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*. 2004;77:350-355.
- (52) Llames S, Garcia E, Garcia V et al. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*. 2006;7:47-53.
- (53) Zaulyanov L, Kirsner RS. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clin Interv Aging*. 2007;2:93-98.
- (54) Falanga V, Isaacs C, Paquette D et al. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J Invest Dermatol*. 2002;119:653-660.
- (55) Griffiths M, Ojeh N, Livingstone R, Price R, Navsaria H. Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue Eng*. 2004;10:1180-1195.

- (56) Brem H, Balledux J, Bloom T, Kerstein MD, Hollier L. Healing of diabetic foot ulcers and pressure ulcers with human skin equivalent: a new paradigm in wound healing. *Arch Surg*. 2000;135:627-634.
- (57) Culican SM, Custer PL. Repair of cicatricial ectropion in an infant with harlequin ichthyosis using engineered human skin. *Am J Ophthalmol*. 2002;134:442-443.
- (58) Falabella AF, Schachner LA, Valencia IC, Eaglstein WH. The use of tissue-engineered skin (Apligraf) to treat a newborn with epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*. 1999;135:1219-1222.
- (59) Falabella AF, Valencia IC, Eaglstein WH, Schachner LA. Tissue-engineered skin (Apligraf) in the healing of patients with epidermolysis bullosa wounds. *Arch Dermatol*. 2000;136:1225-1230.
- (60) Maier JP, Lippitt C, Mooney EK. Use of tissue-engineered skin in the dermal atrophy patient with traumatic avulsion injuries. *Ann Plast Surg*. 2002;49:67-72.
- (61) Martin LK, Kirsner RS. Ulcers caused by bullous morphea treated with tissue-engineered skin. *Int J Dermatol*. 2003;42:402-404.
- (62) Curran MP, Plosker GL. Bilayered bioengineered skin substitute (Apligraf): a review of its use in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *BioDrugs*. 2002;16:439-455.
- (63) Fivenson D, Scherschun L. Clinical and economic impact of Apligraf for the treatment of nonhealing venous leg ulcers. *Int J Dermatol*. 2003;42:960-965.
- (64) Schonfeld WH, Villa KF, Fastenau JM, Mazonson PD, Falanga V. An economic assessment of Apligraf (Graftskin) for the treatment of hard-to-heal venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2000;8:251-257.
- (65) Mathias SD, Prebil LA, Boyko WL, Fastenau J. Health-related quality of life in venous leg ulcer patients successfully treated with Apligraf: a pilot study. *Adv Skin Wound Care*. 2000;13:76-78.
- (66) Falanga V, Sabolinski M. A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers. *Wound Repair Regen*. 1999;7:201-207.
- (67) Marston WA, Hanft J, Norwood P, Pollak R. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care*. 2003;26:1701-1705.
- (68) Omar AA, Mavor AI, Jones AM, Homer-Vanniasinkam S. Treatment of venous leg ulcers with Dermagraft. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;27:666-672.

(69) Still J, Glat P, Silverstein P, Griswold J, Mozingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns*. 2003;29:837-841.

(70) Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*. 1980;14:65-81.

(71) Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Jr., Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. 1981;194:413-428.

(72) Heimbach D, Luterman A, Burke J et al. Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial. *Ann Surg*. 1988;208:313-320.

(73) Heimbach DM, Warden GD, Luterman A et al. Multicenter postapproval clinical trial of Integra dermal regeneration template for burn treatment. *J Burn Care Rehabil*. 2003;24:42-48.

(74) Heitland A, Piatkowski A, Noah EM, Pallua N. Update on the use of collagen/glycosaminoglycate skin substitute-six years of experiences with artificial skin in 15 German burn centers. *Burns*. 2004;30:471-475.

(75) Silverstein G. Dermal regeneration template in the surgical management of diabetic foot ulcers: a series of five cases. *J Foot Ankle Surg*. 2006;45:28-33.

(76) Anthony ET, Syed M, Myers S, Moir G, Navsaria H. The development of novel dermal matrices for cutaneous wound repair. *Drug Discov Today*. 2006;3:81-86.

(77) Kim PJ, Dybowski KS, Steinberg JS. Feature: A closer look at bioengineered alternative tissues. *Podiatry Today*. 2006;19:38-55.

(78) Phillips TJ, Manzoor J, Rojas A et al. The longevity of a bilayered skin substitute after application to venous ulcers. *Arch Dermatol*. 2002;138:1079-1081.

(79) Teepe RG, Koch R, Haeseker B. Randomized trial comparing cryopreserved cultured epidermal allografts with tulle-gras in the treatment of split-thickness skin graft donor sites. *J Trauma*. 1993;35:850-854.

(80) Palfreyman SJ, Nelson EA, Lochiel R, Michaels JA. Dressings for healing venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;3:CD001103.

(81) Alvarez Perez, J., Herrera Enriquez, M., Hernandez Tellez, B., Sampedro Carrillo, E., Castell Rodriguez, P., and Castell Rodriguez, A. Utilización de equivalentes cutáneos para el tratamiento de úlceras de diversa etiología. XXIII Congreso Nacional de Anatomía. XXIII Congreso Nacional de Anatomía , 79. 2010. Irapuato Guanajuato Mexico. 4-10-2010.
Ref Type: Conference Proceeding

(82) Herrera Enriquez, M., Alvarez Perez, J., Hernandez Tellez, B., Sampedro Carrillo, E., Castell Rodriguez, P., and Castell Rodriguez, A. Utilización de equivalentes cutáneos para el tratamiento de úlceras de diversa etiología. XXXIII Congreso Nacional de Histología. XXXIII Congreso Nacional de Histología , 285. 2010. Cuernavaca, Morelos. XXXIII Congreso Nacional de Histología. 27-10-2010. Ref Type: Conference Proceeding

(83) Trent JT, Falabella A, Eaglstein WH, Kirsner RS. Venous ulcers: pathophysiology and treatment options. *Ostomy Wound Manage*. 2005;51:38-54.

(85) Nelzen O, Bergqvist D, Lindhagen A. Venous and non-venous leg ulcers: clinical history and appearance in a population study. *Br J Surg*. 1994;81:182-187.

(86) Gelfand JM, Hoffstad O, Margolis DJ. Surrogate endpoints for the treatment of venous leg ulcers. *J Invest Dermatol*. 2002;119:1420-1425.

(87) Gelfand JM, Hoffstad O, Margolis DJ. Surrogate endpoints for the treatment of venous leg ulcers. *J Invest Dermatol*. 2002;119:1420-1425.

(88) Langer A, Rogowski W. Systematic review of economic evaluations of human cell-derived wound care products for the treatment of venous leg and diabetic foot ulcers. *BMC Health Serv Res*. 2009;9:115.

12. ANEXOS

Anexo 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mayor al mínimo de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21:

Me explicaron que tengo una úlcera venosa también conocida como úlcera varicosa y se me propone participar en el proyecto para estudiar un apósito biológico, o sea una cobertura para mi herida hecha de células vivas, como alternativa de tratamiento a mi enfermedad.

Se me explicó que dependiendo de un sorteo puedo participar ya sea en el grupo que recibe el manejo específico que se le da a todos los pacientes con mi padecimiento, o bien en un grupo que además del tratamiento específico, se me aplicará el apósito biológico. El participar en cualquiera de los dos grupos no afecta necesariamente el curso de mi enfermedad y se pretende evaluar si el apósito con células vivas es mejor que el tratamiento específico comúnmente utilizado.

Si acepto participar, acudiré una vez por semana durante 8 semanas a revisión en la cual me realizarán limpieza de la herida y cambio de apósito, tomarán mediciones y toma de fotografías de la úlcera.

Los beneficios consisten en probar la efectividad y seguridad de un nuevo tratamiento para las úlceras venosas a base de un apósito biológico, además de que se me proporcionará un cuidado estrecho de mi enfermedad.

Se me explicó que como efectos secundarios en cualquiera de los dos tratamientos pueden encontrarse infección, irritación en el sitio de la herida y dolor, que en caso de ser presentados serán tratados por los médicos responsables del protocolo sin costo para mí.

Puedo preguntar hasta aclarar todas mis dudas y mi decisión respecto al estudio no modificará la manera en que se me atiende en Dermatología o en el hospital.

Al ser incluido en el protocolo las consultas, el apósito y el material con el que se me realizará la curación no tendrán ningún costo, ni tampoco la atención en caso de presentar algún efecto secundario.

Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en el momento que yo lo decida sin que esto modifique mi atención por parte del médico o del hospital.

Autorizo la publicación de los resultados del estudio a condición de que en todo momento se mantenga el secreto profesional y que no se publique mi identidad.

En caso de que presente algún malestar debido al tratamiento, se me brindará la oportunidad de cambiar a otro, o en su caso, abandonar el estudio y así poder recibir la mejor alternativa para mi tratamiento.

El apósito será proporcionado de forma gratuita por parte del hospital y del Laboratorio de Inmunoterapia de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Con la fecha _____, comprendí de lo que se trata el estudio: **ESTUDIO CIEGO ALEATORIZADO Y CONTROLADO DE LA EFICACIA DE UN APÓSITO BIOLÓGICO DÉRMICO EN EL TRATAMIENTO DE ÚLCERAS VENOSAS** y acepto participar.

Nombre del paciente o responsable legal: _____

Firma o huella del paciente o responsable legal: _____

Nombre del testigo #1: _____

Dirección: _____

Firma o huella del testigo #1: _____

Relación que guarda con el paciente: _____

Nombre del testigo #2: _____

Dirección: _____

Firma o huella del testigo #2: _____

Relación que guarda con el paciente: _____

Nombre del Investigador Responsable y Principal: Dr. José Contreras Ruiz / Gisela Reyes Martínez

Firma del Investigador Responsable o Principal: _____

Se entrega original al paciente y se conserva una copia como parte del protocolo, en caso de duda comunicarse con la Dr. María Elisa Vega Memije, subdirección de Investigación al tel. 40003000 ext. 3217.

En caso de cualquier problema fuera de horas hábiles, acudir al servicio de urgencias con su carnet del hospital y la presente carta.

Anexo 2: RECOLECCIÓN DE DATOS INICIAL

PROYECTO DE INVESTIGACION: ESTUDIO CIEGO, ALEATORIZADO Y CONTROLADO DE LA EFICACIA DE UN APÓSITO BIOLÓGICO DÉRMICO EN EL TRATAMIENTO DE ÚLCERAS VENOSAS.

INDICACIONES: El presente formato deberá ser llenado por un médico autorizado para la investigación, y se aplicará a todos los pacientes canalizados por el médico tratante con el diagnóstico de ÚLCERA VENOSA DE MIEMBROS INFERIORES. Este cuestionario tiene como finalidad recolectar datos de los sujetos del ensayo clínico.

Número de paciente _____ Fecha _____
Iniciales del paciente _____ Visita _____
Expediente hospital _____ Teléfono _____

I.- Generales

1) Edad	(años)	
2) Género	0=Masculino, 1= Femenino	

II.- Aleatorización

3)Tipo de tratamiento	0= apósito hidrocoloide 1=apósito biológico	
-----------------------	---	--

III.- Antecedentes

4) Tiempo de evolución de la úlcera	(meses)	
5) Índice tabáquico	#cigarrillos x #años / 20	

Anote a continuación los medicamentos y dosis que se encuentre tomando el paciente:

MEDICAMENTO	DOSIS	INDICACIÓN

(Si falta espacio anótelos atrás)

IV.- Tamaño de la herida

6)Medición fotográfica	Medir usando Image J	cm2
7) Largo	Medir la mayor longitud de la úlcera*	cm
8) Ancho	Medir el mayor ancho de la úlcera* perpendicular al largo	cm

V.- Características de la herida (cuantitativa)

Escriba en porcentaje la cantidad total de cada uno de los siguientes (el total debe sumar 100%):

9) Islas de epitelio	Piel rosa o blanca dentro de la úlcera no adherida al borde	%
10) Granulación	Rojo	%
11) Fibrina	Amarillo	%
12) Necrosis/escara	Café/Negra	%
13) Otra	(Hueso expuesto, tendón, músculo, material osteosíntesis y prótesis)	%

VI.- Exudado

14) Cantidad	0= Herida seca 1= Húmeda o leve (normal)	
--------------	---	--

	2= Moderada 3= Severa	
15) Tipo	0= Sin exudado 1= Seroso a serohemático 2= Seropurulento (pus líquido) 3= Francamente purulento (pus espeso)	

VII.- Infección

16) Fiebre secundaria a la herida (>38.3 °C)	0= Ausente, 1= Presente	
17) Eritema perilesional >2cm (celulitis)	0= Ausente, 1= Presente	
18) Olor (de acuerdo al evaluador)	0= Ausente, 1= Presente	

Olor (de acuerdo al paciente): Pida al paciente que anote en la escala visual análoga (Hoja EVA olor) su valoración donde 0 equivale a sin olor alguno y 10 como el peor olor que el paciente haya experimentado. Usted como médico anote 0=sin olor, 1= olor que se percibe de cerca, 2=olor que se percibe de lejos, 3=olor en toda la habitación, 4=olor que sale de la habitación.

19) Escala visual análoga (olor)		
----------------------------------	--	--

VIII.- Piel circundante

Por favor marque la opción más significativa solamente a menos que se especifique lo contrario.

20) Borde (cualitativo)	0= Efecto de borde presente (como playa) 1= Borde adherido pero sin efecto de borde (como barranco) 2= Borde inflamado o irritado 3= Borde socavado	
21) Maceración	0= Ausente 1= Presente	
22) Maceración (cuantitativa)	Medir en mm el máximo de tejido macerado a partir del borde	
23) Edema	0= Ninguno 1= Mínimo 2= Leve (1+) 3= Moderado (2+) 4= Severo (3+)	

IX.- Cultivo

Marque la casilla después de tomar el cultivo

24) Se tomó el cultivo	SI	NO
------------------------	----	----

X.- Dolor en la herida

Pida al paciente que anote en la escala visual análoga (Hoja EVA dolor) su valoración donde 0 equivale a sin dolor y 10 el peor dolor posible.

25) Escala visual análoga (dolor)		
-----------------------------------	--	--

Anexo 3: RECOLECCIÓN DE DATOS EVALUACION SEMANAL

Número de paciente _____
 Iniciales del paciente _____
 Expediente hospital _____

Fecha _____
 Visita _____
 Teléfono _____

I.- Tamaño de la herida

1) Medición fotográfica	Medir usando Image J	cm ²
2) Largo	Medir la mayor longitud de la úlcera*	cm
3) Ancho	Medir el mayor ancho de la úlcera* perpendicular al largo	cm

III.- Características de la herida (cuantitativa)

Escriba en porcentaje la cantidad total de cada uno de los siguientes (el total debe sumar 100%):

4) Islas de epitelio	Piel rosa o blanca dentro de la úlcera no adherida al borde	%
5) Granulación	Rojo	%
6) Fibrina	Amarillo	%
7) Necrosis/escara	Café/Negra	%
8) Otra	(Hueso expuesto, tendón, músculo, material osteosíntesis y prótesis)	%

VI.- Exudado

14) Cantidad	0= Herida seca 1= Húmeda o leve (normal) 2= Moderada 3= Severa	
15) Tipo	0= Sin exudado 1= Seroso a serohemático 2= Seropurulento (pus líquido) 3= Francamente purulento (pus espeso)	

VII.- Infección

16) Fiebre secundaria a la herida (>38.3 °C)	0= Ausente, 1= Presente	
17) Eritema perilesional >2cm (celulitis)	0= Ausente, 1= Presente	
18) Olor (de acuerdo al evaluador)	0= Ausente, 1= Presente	

Olor (de acuerdo al paciente): Pida al paciente que anote en la escala visual análoga (Hoja EVA olor) su valoración donde 0 equivale a sin olor alguno y 10 como el peor olor que el paciente haya experimentado. Usted como médico anote 0=sin olor, 1= olor que se percibe de cerca, 2=olor que se percibe de lejos, 3=olor en toda la habitación, 4=olor que sale de la habitación.

19) Escala visual análoga (olor)		
----------------------------------	--	--

VIII.- Piel circundante

Por favor marque la opción más significativa solamente a menos que se especifique lo contrario.

20) Borde (cualitativo)	0= Efecto de borde presente (como playa) 1= Borde adherido pero sin efecto de borde (como barranco) 2= Borde inflamado o irritado 3= Borde socavado	
21) Maceración	0= Ausente 1= Presente	

22) Maceración (cuantitativa)	Medir en mm el máximo de tejido macerado a partir del borde	
23) Edema	0= Ninguno 1= Mínimo 2= Leve (1+) 3= Moderado (2+) 4= Severo (3+)	

IX.- Cultivo

Marque la casilla después de tomar el cultivo

24) Se tomó el cultivo	SI	NO
------------------------	----	----

X.- Dolor en la herida

Pida al paciente que anote en la escala visual análoga (Hoja EVA dolor) su valoración donde 0 equivale a sin dolor y 10 el peor dolor posible.

25) Escala visual análoga (dolor)		
-----------------------------------	--	--

EFECTOS ADVERSOS

FIEBRE :	37.7 – 38.5° C	38.6 – 39.5° C	39.6 – 40.5° C	>40° C
ALÉRGIA SISTÉMICA:	Edema	Broncoespasmo, no requiere terapia parenteral	Broncoespasmo, requiere terapia parenteral	Anafilaxis
ALERGIA CUTÁNEA:	Eritema	Descamación seca, vesiculación, prurito	Descamación húmeda, ulceración	Dermatitis exfoliativa, necrosis que requiere de intervención quirúrgica
INFECCIONES (SITIO):	Infección menor	Infección moderada	Infección severa	Choque séptico